

## BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E ATIVIDADE LEISHMANICIDA

BIOPROSPECTION OF ESSENTIAL OIL FROM *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip.: CHEMICAL CHARACTERIZATION, TOXICITY AND LEISHMANICIDAL ACTIVITY

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v11.e3.a2023.pp2810-2819> Recebido em: 12.02.2023 | Aceito em: 08.04.2023

Milena de Jesus Marinho Garcia de Oliveira<sup>a</sup>, Milena de Jesus Marinho Garcia de Oliveira<sup>a</sup>, Vitória Rauane Simplício Sobrinho<sup>a</sup>, Otávio de Oliveira Magalhães<sup>a</sup>, Virianna Larissa Santos de Azevêdo<sup>a</sup>, Larissa Barbosa Cerquinho<sup>a</sup>, Karen Fernanda Castro Silva<sup>a</sup>, Aldilene da Silva Lima<sup>b</sup>, Marcos Bispo Pinheiro Câmara<sup>c</sup>, Cláudia Quintino da Rocha<sup>c</sup>, Rita de Cássia Mendonça de Miranda<sup>a</sup>, Amanda Silva dos Santos Aliança<sup>a</sup>, Joicy Cortez de Sá Sousa<sup>a</sup>

Universidade CEUMA<sup>a</sup>  
Universidade Estadual do Maranhão<sup>b</sup>  
Universidade Federal do Maranhão<sup>c</sup>  
\*E-mail: rita.miranda@ceuma.br

### RESUMO

As leishmanioses são consideradas doenças parasitárias negligenciadas de grande relevância a saúde pública pelo seu espectro clínico e endêmico. Os quimioterápicos utilizados no tratamento estão frequentemente associados aos efeitos adversos de toxicidade. Os medicamentos fitoterápicos são considerados fármacos candidatos ao tratamento, na busca de substâncias menos tóxicas. O objetivo foi realizar a bioprospecção do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip. (OEPb), por meio da caracterização química e avaliação do potencial leishmanicida e citotóxico. Para tal, realizou-se a obtenção do óleo pelo processo de hidrodestilação, seguida de caracterização química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), testes leishmanicidas *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, avaliação da toxicidade em células de macrófagos RAW 264.7 e em modelo alternativo *in vivo* utilizando larvas de *Tenebrio molitor*. Mediante análise química verificou-se que o OEPb possui como constituinte majoritário o citral, isto é, uma mistura de monoterpenos, geranial (33,9%) e neral (26,7%). Na investigação biológica o OEPb apresentou atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub>=145,54 µg.mL<sup>-1</sup> após 48 h de tratamento), baixa citotoxicidade *in vitro* (CC<sub>50</sub>=238,69 µg.mL<sup>-1</sup> e IS=1,62) e *in vivo* apresentou baixo escore de sofrimento de larvas de *T. molitor*. Tais resultados demonstram que o OEPb apresenta potencial biológico leishmanicida, fortalecendo a continuidade da investigação para a obtenção de compostos químicos alvos no desenvolvimento de novos medicamentos, com eficiência leishmanicida ou coadjuvante a terapêutica já preconizada.

**Palavras-chave:** *Pectis brevipedunculata*; óleo essencial; Leishmanicida; Toxicidade.

### ABSTRACT

Leishmaniasis are considered neglected parasitic diseases of great relevance to public health due to their clinical and endemic spectrum. Chemotherapy agents used in the treatment are often associated with adverse effects of toxicity. Herbal medicines are considered candidate drugs for treatment, in the search for less toxic substances. The objective was to carry out the bioprospecting of the essential oil of *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip. (OEPb), through chemical characterization and evaluation of leishmanicidal and cytotoxic potential. To this end, the oil was obtained through the hydrodistillation process, followed by chemical characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), *in vitro* leishmanicidal tests against promastigotes of *L. amazonensis*, evaluation of toxicity in cells of RAW 264.7 macrophages and in an alternative *in vivo* model using *Tenebrio molitor* larvae. Through chemical analysis, it was verified that OEPb has citral as the major constituent, that is, a mixture of monoterpenes, geranial (33.9%) and neral (26.7%). In the biological investigation, OEPb showed *in vitro* leishmanicidal activity against *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub>=145.54 µg.mL<sup>-1</sup> after 48 h of treatment), low *in vitro* cytotoxicity (CC<sub>50</sub>=238.69 µg.mL<sup>-1</sup> and IS=1.62) and *in vivo* showed low suffering score of *T. molitor* larvae. These results demonstrate that OEPb has a leishmanicidal biological potential, strengthening the continuity of research to obtain target chemical compounds in the development of new drugs, with leishmanicidal efficiency or as an adjunct to the therapy already advocated.

**Keywords:** *Pectis brevipedunculata*; Essential Oil; Leishmanicidal; Toxicity.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, devido a sua ampla distribuição (África, América Latina, Ásia e Europa), com uma estimativa de 700 000 a 1 milhão de novos casos ocorrendo anualmente (JESUS et al., 2021; WHO, 2022). Trata-se de uma antropozoonose, negligenciada, complexa e espectral, causada por diversas espécies de protozoários *Leishmania* spp. De acordo com a espécie infectante e o desdobramento imunológico de cada indivíduo, pode evoluir com diferentes formas clínicas, dentre elas, cutânea, mucocutânea e visceral (BRASIL et al., 2023).

A forma cutânea é a mais comum mundialmente, com uma incidência de 1,5 a 2,0 milhões de casos (WHO, 2022). No Brasil a espécie *Leishmania amazonensis* é uma importante causadora das formas cutânea e mucocutânea, provocando lesões crônicas, eritematosas, papulares e/ou ulcerativas únicas ou múltiplas, indolores, presentes na pele e/ou mucosas, algumas vezes com destruição facial e sendo responsável por alta taxa de mortalidade em humanos (DE ALMEIDA et al., 2021; FARIAS et al., 2021).

Os fármacos de eleição para o tratamento das leishmanioses são os antimonial pentavalentes ( $Sb^V$ ), seguidos da anfotericina B e sua forma lipossomal AmBisome, além de miltefosine, paromomicina e pentamidina. No entanto, a alta toxicidade para humanos e os casos de resistência parasitária tem dificultado o uso destas medicações (MORAES-NETO et al., 2019). A limitada disponibilidade de recursos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose tem provocado uma busca urgente por métodos de controles mais eficazes. Nesse cenário, as plantas emergem como uma fonte potencial de moléculas com ação leishmanicida, sendo realizadas pesquisas com extratos, compostos fracionados e óleos essenciais (OEs). Estes, são misturas de compostos terpenoides, voláteis, presentes no metabolismo vegetal, utilizados pelas plantas como defesa contra-ataque de herbívoros/patógenos ou como atrativos de insetos polinizadores (DHAKAD et al., 2017).

Produtos naturais obtidos de plantas, representam fontes promissoras de compostos químicos com um rol de atividades biológicas importantes (BHUIYAN et al., 2020; JESUS et al., 2021). Famílias como a Asteraceae contribuem com muitos ativos moleculares, tornando-a uma interessante fonte de novos compostos (CARVALHO et al., 2018; MONDÊGO-OLIVEIRA et al., 2021). Asteraceae é uma das maiores família de plantas, de

distribuição cosmopolita, compreendendo cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies. *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. [sin. *P. rubiácea* Baker], (Asteraceae) é uma erva terrestre endêmica, com ocorrência de Norte a Sudeste do Brasil, sendo nativa de ecossistema seco ou semi-árido (FERNANDES, 2021; ROLNIK, STOCHMAL e OLAS, 2022). Ela é conhecida no Brasil como grama aromática ornamental, com alta produção de óleo essencial de forte odor de capim-limão (ROLNIK e OLAS, 2021).

Estudos etnobotânicos do gênero *Pectis*, relatam a utilização tradicional de algumas espécies, por meio de sucos, infusões ou chás, para distúrbios estomacais, hipertensão, quadros de gripe e resfriados (ALBURQUERQUE et al., 2020), além dos relatos das propriedades calmantes, analgésicas e vasodilatadoras (DE OLIVEIRA et al., 2011; MICHEL, 2020). O óleo essencial de *P. brevipedunculata* (OEPb) apresenta citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) como constituinte majoritário, que corresponde a uma mistura de neral e geranial, dois monoterpenos estereoisômeros (RIBEIRO, 2021). Alguns trabalhos (BERALDO-BORRAZZO et al., 2019; CAMARA et al., 2023) já investigaram o potencial anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngico, antiprotozoário e anti-ectoparasitos desta espécie vegetal.

Mediante os desafios no tratamento das leishmanioses e os estudos já relatados com a planta, o presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização química dos compostos presentes no OEPb, bem como para avaliar o potencial efeito leishmanicida e a sua toxicidade, almejando fortalecer a ideia desta planta como matéria prima para a obtenção de compostos químicos alvos no desenvolvimento de novos medicamentos, com eficiência leishmanicida e menor toxicidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta do material vegetal e Extração do Óleo Essencial*

Partes aéreas de *P. brevipedunculata* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil, coordenadas - 2°33'20.5" S / 44°18'32.7" W. Uma exsiccata da espécie foi encaminhada para identificação e depósito no Herbário Rosa Mochel da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil, sob o número 5287. A planta foi coletada de acordo com a Lei Brasileira de Proteção da Biodiversidade (SISGEN nº AAFB38B).

Para o estudo, amostras da planta foram coletadas

em julho de 2019, secas à temperatura ambiente, por 72 horas, no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFMA. Em seguida, para obtenção do óleo essencial, 100g do material vegetal foi submetido ao processo de hidrodestilação em aparelho Clevenger, por um período de 2 horas (MAIA e ANDRADE, 2009). O óleo obtido foi seco utilizando sulfato de sódio anidro (ISOFAR, RJ, Brasil) e o rendimento foi calculado em % m/v (mL/100 g) (RAPOSO et al., 2018).

### Caracterização Química

A caracterização química do óleo essencial de *P. brevipedunculata* (OEPb) foi realizada por Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM-QP2010 - Shimadzu Corporation, Japão), usando uma coluna capilar DB-5ms (30m x 0,25mm x 0,25 µm espessura do filme - J&W Scientific, EUA) e equipado com o software GC-MS-Solution contendo as bibliotecas Adams (2007), Mondello (2011) e NIST (2011). As amostras foram analisadas de modo isocrítico de acordo com as seguintes condições: temperatura de injeção de 250°C; programação de temperatura do forno de 35 °C por 6 min, rampa de aquecimento de 10 °C/min para 240°C restante por 10 min; o modo de injeção foi dividido para 1,0 µL de amostra (6,0 µL óleo: 500 µL n-hexano), razão divisão 1/30; ionização por impacto eletrônico no 70 eV; fonte de ionização e temperaturas da linha de transferência de 250 °C e 200°C, respectivamente.

Os espectros de massa foram obtidos por varredura automática a cada 0,3 s, com fragmentos de massa na faixa de 35-400 m/z. Dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por normalização de área de pico usando um GC/FID Série 2010, operado sob condições semelhantes do CG-EM. O índice de retenção foi calculado para todos os constituintes voláteis usando a série homóloga de n-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>, SIGMA-ALDRICH, EUA), de acordo com a equação linear de Van den Dool e Kratz (1963). Os componentes do óleo foram identificados comparando seus índices de retenção e espectros de massa (massa molecular e padrão de fragmentação) com aqueles existentes na biblioteca do sistema GC-MS Solution (LIMA et al., 2021).

### Atividade leishmanicida in vitro

Os parasitos *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125) oriundos de isolado clínico, foi cedido pelo Laboratório de Imunofisiologia da UFMA ao Laboratório de Patogenicidade Microbiana (LAPMIC) da Universidade CEUMA (UniCEUMA). Neste, as

formas promastigotas são periodicamente cultivadas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) a 26°C±1°C em meio *Schneider*, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina.

O potencial leishmanicida do OEPb foi testado em diluições seriadas (concentrações de 250 µg. mL<sup>-1</sup> a 15,63 µg. mL<sup>-1</sup>) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, na concentração 1.10<sup>6</sup> células. mL<sup>-1</sup>. Como controle negativo utilizou-se somente meio de cultivo e, como controles positivos, dois quimioterápicos de eleição: Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B. Os parasitos utilizados para o teste estavam em fase logarítmica de crescimento, foram plaqueados e tratados com as diferentes concentrações do OEPb, posteriormente incubados em estufa BOD a 26°C por 48h. Após o tempo de incubação, realizou a avaliação das formas viáveis de promastigotas, mediante contagem em câmara de Neubauer e ensaio colorimétrico MTT (Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (5mg. mL<sup>-1</sup>) (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2016) e contagem em câmara de Neubauer. Também foi avaliado os aspectos como: mobilidade, tamanho e forma dos parasitos. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos por no mínimo duas vezes. O percentual (%) de inibição de crescimento (IC) foi determinado pela razão do número de parasitos dos poços controle pelo número de parasitos dos poços tratados, sendo calculado o IC<sub>50</sub>.

### Citotoxicidade

A avaliação do efeito citotóxico do OEPb foi realizada utilizando células RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Penicilina e estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C ± 1°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O plaqueamento dos macrófagos foi realizado em placas de 96 poços, as células foram inseridas na concentração de 1x10<sup>6</sup> células por poço, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, foi adicionado o OEPb em diferentes concentrações (500 a 0,97 µg. mL<sup>-1</sup>), utilizando o método de diluição seriada. Como controle negativo e de contaminações, foi utilizado apenas o meio completo, controle positivo a Anfotericina-B e dimetilsulfóxido (DMSO) a 40%. A placa foi novamente incubada por mais 48 horas e, após esse período, foi realizada a viabilidade celular utilizando MTT (5mg. mL<sup>-1</sup>) (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2016). A leitura foi realizada em leitor de microplacas utilizando o filtro de 550nm de absorvância, com determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular

(CC<sub>50</sub>), seguido do índice de seletividade (IS), que corresponde a relação (CC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>). Os testes foram realizados em quadruplicata e repetidos duas vezes.

### **Toxicidade in vivo**

A toxicidade foi realizada com larvas do inseto *Tenebrio molitor*, família *Tenebrionidae*. As larvas com pesos próximos de 100 mg foram randomizadas em grupos de 10 larvas por grupo. Antes da inoculação do OEPb, as cutículas foram limpas com álcool 70%. Como controles foram utilizados, Glucantime® e Tampão fosfato-salino (PBS) 1%. Após todo procedimento de higienização das larvas, foi injetado 10µL de cada solução teste, nas respectivas concentrações, PBS (1%), Glucantime® (100µg. mL<sup>-1</sup>) e Óleo Essencial (0,5 mg. mL<sup>-1</sup>; 1,0 mg. mL<sup>-1</sup> e 2,0 mg. mL<sup>-1</sup>). Para aplicação, utilizou-se seringa de insulina estéril. A curva de sobrevivência foi determinada durante cinco dias pela ausência de movimento ou melanização total das larvas. Foi avaliado, ainda, o escore de severidade dos produtos naturais às larvas de *T. molitor*, com o intuito de perceber o grau de sofrimento por meio de pontuações (escore) através de parâmetros, como melanização, movimentação, reação a estímulo e sobrevivência (COLASSO et al., 2020).

### **Análise estatística**

Os índices IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram obtidos a partir de curva de regressão não linear. O índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão entre os índices CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>. Os resultados foram expressos com média e desvio padrão e considerados estatisticamente significantes quando p≤0,05. A análise estatística envolvendo os ensaios de

toxicidade em larvas de *T. molitor*, utilizou-se o teste de Log-Rank (Mantel-Cox), que acompanha as distribuições de sobrevivência do número amostral e randomizado em estudo e para avaliação da diferença entre o grau de severidade, ANOVA duas vias.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A flora brasileira detém um vasto patrimônio genético, sendo, portanto, uma fonte imensurável de compostos bioativos, que devem ser estudados de forma ética e consciente, no intuito de se obter moléculas alvos para o desenvolvimento de fármacos para inúmeras doenças (BHUIYAN et al., 2020), em especial as doenças negligenciadas como a leishmaniose (MORAES-NETO et al., 2019).

Ao entender a importância dos produtos naturais para a sociedade, investigou-se neste estudo o óleo essencial de *P. brevipedunculata* (OEPb). Este, apresentou um rendimento de 1,8%, semelhante ao encontrado em outras espécies do gênero *Pectis*, caracterizadas como de alto percentual de rendimento (HERBARIUM, 2022). Trinta e quatro constituintes foram identificados e quantificados por CG-EM e GC-FID, representando aproximadamente 99,6% do total do óleo. Os constituintes majoritários foram o geranial (33,9%) e neral (26,7%), seguidos de α-pineno (16,2%) e limoneno (8,1%), compreendendo um valor médio de 84,9% da composição do óleo. OEPb exibiu principalmente uma alta porcentagem de monoterpenos oxigenados (70%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (25,9%). Além disso, cerca de 2,0% da composição do OEPb corresponde ácidos graxos e derivados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rendimento e caracterização química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*

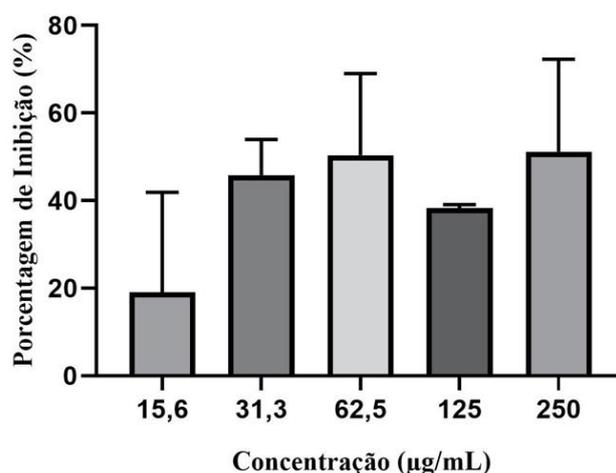
Rendimento (%)			1.8
Constituintes	RIC	RIL	(%)
$\alpha$ -Pineno	935	932 <sup>a</sup>	16.2
Sabineno	975	969 <sup>a</sup>	0.6
$\beta$ -Pineno	979	974 <sup>a</sup>	0.3
6-metil-5-Hepten-2-ona	988	986 <sup>b</sup>	1.0
Mirceno	992	988 <sup>a</sup>	0.3
Limoneno	1032	1024 <sup>a</sup>	8.1
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1050	1046 <sup>a</sup>	0.4
3-metil-1,2-Ciclohexanediona	1094	1089 <sup>a</sup>	0.3
Linalool	1102	1095 <sup>a</sup>	1.2
exo-Isocitral	1147	1140 <sup>b</sup>	0.2
(Z)-Isocitral	1165	1160 <sup>a</sup>	1.0
(E)-Isocitral	1183	1177 <sup>a</sup>	1.7
Terpinen-4-ol	1186	1180 <sup>a</sup>	0.2
$\alpha$ -Terpineol	1200	1195 <sup>b</sup>	0.3
Nerol	1228	1227 <sup>a</sup>	1.1
Neral	1244	1235 <sup>a</sup>	26.7
Geraniol	1253	1249 <sup>a</sup>	3.4
Carvenona	1261	1255 <sup>a</sup>	0.1
Geranial	1273	1264 <sup>a</sup>	33.9
1-Trideceno	1295	1290 <sup>a</sup>	0.2
2,4-Octanediol	1339	1339 <sup>a</sup>	0.2
trans-p-Ment-6-en-2,8-diol	1369	1371 <sup>a</sup>	0.1
2-Undecen-1-ol	1374	1370 <sup>b</sup>	0.3
Acetato de geranila	1379	1379 <sup>a</sup>	0.2
$\beta$ -Elemeno	1396	1389 <sup>a</sup>	0.3
(E)-Cariofileno	1430	1424 <sup>b</sup>	0.4
trans-Prenil limoneno	1467	1357 <sup>a</sup>	0.5
Germacreno D	1492	1484	0.1
$\alpha$ -Alaskeno	1520	1515 <sup>b</sup>	0.1
$\alpha$ -Muurolool (=Torreyol)	1649	1644 <sup>a</sup>	0.1
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)</b>			<b>25.9</b>
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>			<b>70.1</b>
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)</b>			<b>1.4</b>
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>			<b>0.1</b>
<b>Ácidos graxos e derivados (%)</b>			<b>2.0</b>
<b>Total (%)</b>			<b>99.5</b>

IRC - Índice de Retenção Calculado (DB-5ms column); RIL - Índice de Retenção da Literatura (coluna similar); <sup>a</sup>Adams (2007); <sup>b</sup>Mondello (2011). Negrito - principais constituintes

Em relação ao potencial leishmanicida, verificou-se que OEPb foi ativo contra as formas promastigotas de

*L. amazonensis*, com um IC<sub>50</sub> de 145,54  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  após 48 h de tratamento (Figura 1).

**Figura 1.** Atividade leishmanicida do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip., demonstrando inibição das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 48 horas de tratamento.



Amaral et al. (2006) propuseram uma classificação de acordo com a ação de produtos vegetais sobre os parasitos flagelados, com base nos valores de  $IC_{50}$ , tais como: altamente ativo ( $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ), ativo ( $100 < IC_{50} \leq 250 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ), moderadamente ativo ( $250 < IC_{50} \leq 500 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ) e inativo ( $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ).

O potencial leishmanicida de óleos essenciais tem sido descrito na literatura (ANDRADE et al., 2016; MOREIRA et al., 2017; MORAES NETO et al., 2019; MONDÊGO-OLIVEIRA et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2023), relatando inúmeras espécies de plantas e uma ampla faixa de  $IC_{50}$ . Dentre eles, ressalta-se a revisão de literatura realizada por Siqueira et al. (2023), que relataram o potencial leishmanicida de quarenta e oito espécies de plantas, pertencentes a dezesseis famílias, sendo as mais frequentes *Piperaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Myrtaceae* e *Verbenaceae*.

Andrade et al. (2016), avaliaram a atividade biológica de diferentes óleos essenciais sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como sua citotoxicidade e determinação do índice de seletividade, relatando diferentes  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$  e IS. Ressalta-se nesta pesquisa, a espécie *Melissa officinalis* que apresentou os seguintes valores,  $IC_{50} - 132,02 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ,  $CC_{50} - 297,45 \mu\text{g. mL}^{-1}$  e IS - 2,25. De modo semelhante, ao presente estudo a *M. officinalis* tem como compostos majoritários, geranial (52,2%) e neral (37,18%), apresentando também valor de  $IC_{50}$  próximo ao nosso estudo, porém com melhor índice de seletividade e também ativo conforme a classificação de Amaral et al. (2006).

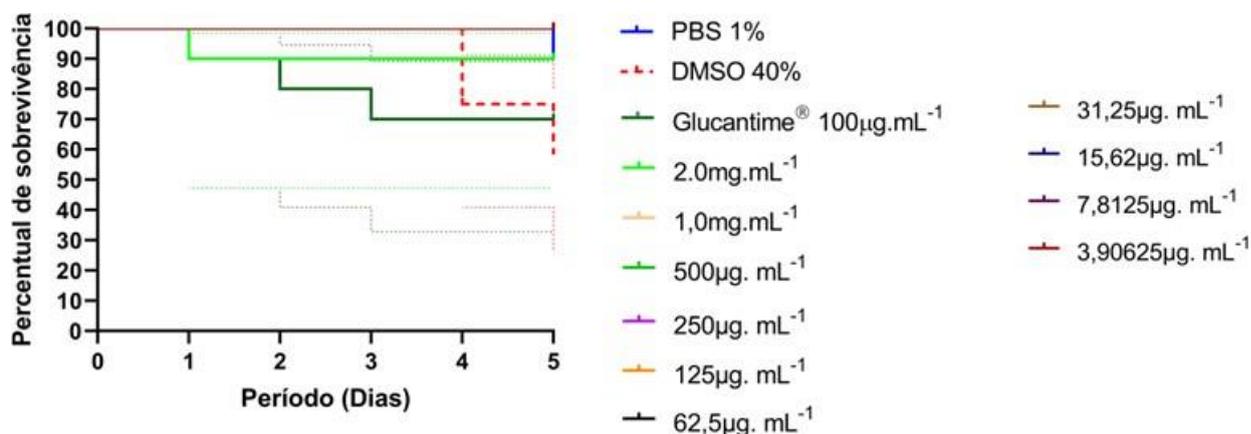
Estudos realizados por (OLOYEDE, 2009;

PEREIRA et al., 2004; NAIK et al., 2010; MATASYOH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011) demonstraram que os óleos constituídos de citral, ou seja, mistura dos monoterpenos geranial e neral, apresentam importantes atividades biológicas, dentre elas, leishmanicida, como é o caso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Estudo realizado por Machado et al. (2012) demonstraram a atividade leishmanicida de *C. citratus* e do citral sob *Leishmania* spp., com valores semelhantes de  $IC_{50}$ .

Na investigação de novos compostos bioativos, faz-se necessário a avaliação da atividade citotóxica desses compostos, sendo as linhagens de macrófagos bastante utilizadas para esta finalidade (RIBEIRO et al., 2014; DA SILVA et al., 2018; MORAES-NETO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021). Na busca por um produto natural com menor toxicidade e eficiência leishmanicida, testes citotóxicos foram realizados com a linhagem de macrófagos RAW 264.7 e O OEPb demonstrou um  $CC_{50} = 238,69 \mu\text{g. mL}^{-1}$  após 48 h de tratamento e IS de 1,62.

Um ensaio *in vivo* alternativo foi empregado usando larvas *T. molitor* expostas a diferentes concentrações do OEPb. O uso de modelos alternativos *in vivo* está em ascensão (COLASSO et al., 2020; MENDONÇA et al., 2020), especialmente depois das atualizações no regulamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Em cinco dias de observação das larvas expostas ao OEPb foi possível observar que as concentrações testadas do óleo foram menos tóxicas do que o medicamento de referência (Glucantime®) (Figura 2).

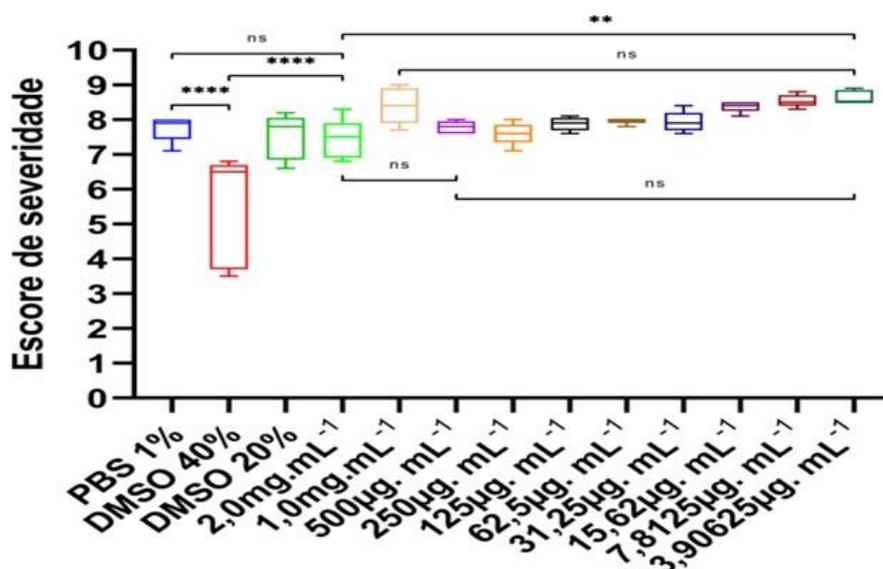
**Figura 2.** Curva de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (OEPb) Sch. Bip. OEPb em diferentes concentrações, medicamento de referência Glucantime®, antileishmania fármaco, fármaco citotóxico (DMSO – dimetilsulfóxido) e controle negativo PBS1% estéril. Legenda: O as larvas foram tratadas e avaliadas diariamente por um período de 5 dias. As linhas sólidas representam a sobrevivência ao longo tempo e o pontilhado linhas o simétrico 95% intervalo de confiança.



O medicamento de referência para o tratamento da leishmaniose cutânea (Glucantime®) apresentou alta toxicidade e sofrimento nas larvas de *T. molitor* em relação ao controle negativo. Quando as larvas

randomizadas foram expostas a OEPb, verificou-se baixo escore de severidade, baixo índice de sofrimento e mais alta porcentagem de sobrevivência de larvas de *T. molitor* (Figura 3).

**Figura 3.** Avaliação do escore de severidade das larvas de *Tenebrio molitor* tratadas com óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (OEPb) Sch. Bip. OEPb em diferentes concentrações, droga citotóxica (DMSO – dimetilsulfóxido) e PBS1% estéril, controle negativo. Resultados apresentados em dispersão, com média, mediana e desvio padrão. O escore varia entre zero e dez, onde os valores mais baixos significam a alto grau de Sofrimento. A diferença entre os t grupos testados foi considerada significativo quando  $p < 0,05$ , two-way ANOVA.



Várias concentrações de OEPb foram testadas e a curva de sobrevida demonstrou que OEPb apresentou baixotoxicidade em relação aos controles (Glucantime e DMSO 40%). Somente na concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> houve uma larva morta nas primeiras 24 horas e, nenhuma larva veio a óbito quando exposta a concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados sustentam a ideia da baixa toxicidade e pouca indução de sofrimento nas larvas expostas ao OEPb.

## CONCLUSÕES

Os relatos de resistência as drogas de primeira linha para o tratamento da leishmaniose têm despertado o

interesse da comunidade científica em busca de produtos bioativos oriundos de plantas. Nessa perspectiva, o óleo essencial do *Pectis brevipedunculata* Sch. Bip. (OEPb) demonstrou atividade antiparasitária *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, contudo com baixo índice de seletividade. Nos ensaios alternativos *in vivo* com larvas de *T. molitor* o óleo apresentou resultados mais promissores, demonstrando baixa toxicidade e mínima indução de sofrimento nas larvas. Desta forma, infere-se a necessidade da investigação continuada da bioprospecção do OEPb como matéria prima para fins de elaboração de novas drogas com eficiência leishmanicida ou coadjuvante aos fármacos de eleição.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Publishing: Carol Stream, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants and animals of an important seasonal dry forest in Brazil. **Ethnobiology and Conservation**, v. 9, p. 1–53, 2020.
- AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Rev. Bras. Farmacogn** 2006; 16 (Supl): 696-720.
- ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. **Essential oils: in vitro activity against Leishmania amazonensis, cytotoxicity and chemical composition**. BMC Complementary and Alternative Medicine volume 16, Article number: 444, 2016.
- BERALDO-BORRAZZO, J.; SANTOS, A. O. dos; FILHO, B. A. de A.; QUINTANS- JÚNIOR, L. J.; NAKAMURA, C. V. Atividade anti-protozoário in vitro do p -Cimeno sobre Leishmania amazonensis. **Luminária**, v. 21, n. 02, p. 6–16, 2019.
- BHUIYAN, F. R. et al. Plants Metabolites: Possibility of Natural Therapeutics Against the COVID-19 Pandemic. **Frontiers in medicine**, v. 7, n. August, p. 1–26, 2020.
- BRASIL, A. M. V.; FRANCO, A. M. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil em 2022. **Peer Review**, v. 5, n. 11, p. 294-305, 2023.
- CAMARA, M. B. P.; LIMA, A.S.; JUMBO, L. O. V.; TAVARES, C. P.; MENDONÇA, C. J. S., MONTEIRO, O. S.; ARAÚJO, S. H. C.; OLIVEIRA, E. E., NETO, J. S. L.; MAIA, J. G. S.; COSTA-JUNIOR, L. M. e ROCHA, C. Q. **Seasonal and Circadian Evaluation of the Pectis brevipedunculata Essential Oil and Its Acaricidal Activity against Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae)**. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-10, 2023.
- CARVALHO A. R. JR, DINIZ R. M., SUAREZ M.A.M., et al. **Use of Some Asteraceae Plants for the Treatment of Wounds: From Ethnopharmacological Studies to Scientific Evidences**. Front Pharmacol. 2018;9:784. Published 2018 Aug 21.
- COLASSO AHM, Barros TF, Figueiredo IF da S, Carvalho Junior AR, Fernandes ES, Uchoa MRB, e outros. **The latex of Euphorbia tirucalli inhibits staphyloxanthin production and protects Tenebrio molitor larvae against Staphylococcus aureus infection**. Nat Prod Res [Internet], 34(24):3536–9, 2020.
- DE ALMEIDA, J. V. et al. Diagnosis and identification of Leishmania species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2021.
- DHAKAD, P.K., Sharmal, P. K., Kumar, S. **A Análise sobre Estudos fitoquímicos e Potencial Biológico de**

**Citrullus colocynthis (L.) Schrad. (Cucurbitaceae).** Bioengenharia e Biociência 5 (4): 55-64, 2017.

FARIAS, F. J. A. S., da Silva, E. D. C., da Silva, S. A., Pinheiro, V. C. S., & Bezerra, J. M. T. (2021) Epidemiological profile of american tegumentary leishmaniasis in the state of Maranhão in recent years. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2(3).

FERNALD, M. L. A SYSTEMATIC STUDY OF THE UNITED STATES AND MEXICAN SPECIES OF PECTIS. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, No. 12 (1897), pp. Published by: Harvard University Herbaria Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/240222>. v. 12, n. 12, p. 57-86, 2022.

FERNANDES, J. Morfologia de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae): uma espécie proibida em produtos tradicionais fitoterápicos no Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, v. 18, n. 38, 2021.

HERBARIUM, G. A SYSTEMATIC STUDY OF THE UNITED STATES AND MEXICAN SPECIES OF PECTIS Author (s): M. L. Fernald Source: **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, No. 12 (1897), pp. Published by: Harvard University Herbaria Stable v. 12, n. 12, p. 57-86, 2022.

JESUS, A. J., Laurenti, D.M., Lopes, S.M. Ghilardi Lago JH, Domingos Passero, LF. Leishmanicidal **Activity and Ultrastructural Changes of Maslinic Acid Isolated from *Hyptidendron canum***. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 31;2021:9970983.

LIMA, A. S.; COSTA Jr., H. N. P.; COSTA Jr., L. M.; MONTEIRO, O. S.; MAIA, J. G. S.; ROCHA, C. Q. **Anthelmintic effect of essential rhizome oil from *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) introduced in Northeastern Brazil**. Acta Trop. 2021, 218, 105912.

MACHADO M, Pires AM, Dinis AM, Santos-Rosa M, Alves V, Salgueiro L, Knight C, MC Sousa. **Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*** 012 Mar;130(3):223-31. doi: 10.1016/j.exppara.2011.12.012. Epub 2012 Jan 2.

MAIA, O.G.S, ANDRADE, L.H.A. Database of the

amazon aromatic plants and their essential oils. **Quim Nova [Internet]**. 2009 [cited 2022 Jul 31];32(3):595-622.

MASSING, L. T.; SUEMITSU, C.; SARRAZIN, S. L. F.; TREMEA, A.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Oils Variability of *Pectis elongata* in the Amazon and an Overview of the Neotropical *Pectis* Species. **European Journal of Medicinal Plants**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 37-45, 2021. DOI: 10.9734/ejmp/2021/v32i130362.

MATASYOH, JC, KIPLIMO, JJ, Karubiu, NM eHailstorks, TP 2007. **Composição química atividade antimicrobiana e óleo essencial de tarconanto canforado**. Química de Alimentos, 101: 1183-1187

MENDONÇA, A.M.S., ROCHA, C.H.L., CAMPOS, C.D.L., BARROS-FILHO, A.K.D., SILVA, L.C.N., SANTOS, J.R.A., ROCHA, F.M.G., MONTEIRO, C.A. **Synergism between fluconazole and terminalia catappa extract and its use in the treatment of candida-infected tenebrio molitor larvae**. Dev. 6 (2020) 78929-78950.

MICHEL J.; ABD RANI N.Z.; HUSAIN K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. **Front Pharmacol**. 2020 Jun 5;11:852.

MONDÊGO-OLIVEIRA, R. *et al.* *Vernonia brasiliana* (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of *Leishmania infantum* promastigotes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111025, 2021.

MONDELLO, L.; *Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds: Mass Spectral Database, 2nd Sped.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011.*

MORAES-NETO, R.N., Setúbal, R.F.B., Higinio, T.M.M.I., M.C.A. Brelaz-De-Castro, L.C.N. Da Silva, COMO Dos Santos Aliança, **Asteraceae plantas como fontes de compostos contra leishmaniose e chagas doença**, Frente. Farmacol. 10 (2019) 1-20.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; VARANDAS, R.; COGO, J.; PEREGO, C. H.; RONCOLI, G.; SOUSA, M. C.; NAKAMURA, C. V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Natural Product Research**, 2017 VOL. 31, NO. 24, 2905-2908

MOSMANN T. Rápido colorimétrico ensaio para celular crescimento e sobrevivência: **Aplicativo para proliferação e ensaios de citotoxicidade. J Immunol Métodos.** 1983;65(1-2):55-63.

NAIK, M I, Fomda, B AJaykumar, E. e Bhat, J.A. **Antibacterial activity of lemongrass (Cymbopogon citratus) oil against some selected pathogenic bacteria.** Journal of Medicine Tropical, 535 – 538, 2010.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST); Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, v.2.0d); **The NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, USA, 2005.**

OLIVEIRA, M. T. R. **Secagem e qualidade do óleo essencial de Pectis brevipedunculata (gardner) Sch. Bip.** p. 197, 2011.

OLOYEDE, O. I. 2009. **Perfil químico e atividade antimicrobiana de folhas Cymbopogon citratus,** Jornal de Produtos Naturais,2: 98-103

PEREIRA, RS, Sumita, TC, Furlan, MR, Jorge, AOC e Ueno, M. 2004. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais em microrganismos isolados de infecções do trato urinário,** Revista de Publicações de Saúde,38(2): 326-8.

RAPOSO DE MELLO D. **Farmacopeia Brasileira. Farm Bras.** 5a edição. 2018; 2:1-523.

RIBEIRO T.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., VALADARES, D.G.; FRANCA, J.R.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; MARTINS V.T.; COSTA L.E.; ARRUDA A.L.A.; FARACO A.A.G.; COELHO E.A.F.; CASTILHO R.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants, **Exp. Parasitol.** 143 (2014) 60-68.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guid. Man.** 2016.

RODRIGUES, R.R.L.; NUNES, T.A.L.; ARAÚJO, A.R.; MARINHO FILHO, J.D.B., SILVA, M.V.; CARVALHO, F.A.A., PESSOA, O.D.L.; FREITAS, H.P.S.; RODRIGUES, K.A.F.; ARAÚJO, A.J., Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards Leishmania (Leishmania) amazonensis, **Int. Immunopharmacol.** 90 (2021) 107124.

ROLNIK, A; OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International journal of molecular sciences,** v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

ROLNIK, A.; STOCHMAL, A.; OLAS, B. The in vitro anti-platelet activities of plant extracts from the Asteraceae family. **Biomedicine and Pharmacotherapy,** v. 149, n. March, p. 112809, 2022.

SILVA, V.D.; ALMEIDA-SOUZA, F.; TELES, A.M.; NETO, R.; MONDEGO-OLIVEIRA, P.A.; MENDES FILHO, N.E.; TANIWAKI, N.N.; ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE K.S.; MOUCHREK FILHO, V.E. Chemical composition of Ocimum canum Sims. essential oil and the antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in Leishmania amazonensis promastigotes, **Ind. Crops Prod.** 119 (2018) 201-208.

SIQUEIRA, I.B., OLIVEIRA, Y.L.C., JAIN, S. et al. Update on Brazilian essential oils with leishmanicidal activity. **Phytochem Rev** (2023).

WHO, **Leishmaniasis fact sheet.** Geneva: World Health Organization; 2022.