**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS**

**Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos**

**Estudo químico e avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* do
óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae)**

Erika Yamamichi

Versão corrigida

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Profa. Dra. Dominique C H Fischer

**São Paulo
2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo químico e avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* de
***Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae)**

Erika Yamamichi

Versão corrigida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Dominique C H Fischer

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Yamamichi, Erika
Y19e Estudo químico e avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro*
do óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae) /
Erika Yamamichi. -- São Paulo, 2014.
111p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Fischer, Dominique Corinne Hermine

1. Insumos farmacêuticos 2. Farmacognosia I. T. II. Fischer,
Dominique Corinne Hermine, orientador.

615.19

CDD

Erika Yamamichi

Estudo químico e avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae)

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
Orientador/Presidente

1°. examinador

2°. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

À minha família pelo apoio, ensinamentos
e incentivos dedicados a mim durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do Curso, junto ao Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e sua Secretaria, pelas orientações e auxílios prestados ao longo do período do curso.

À Coordenação e à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo auxílio durante o período do Mestrado.

À Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer, pela atenção, orientação, paciência, ensinamento e apoio durante o período do Mestrado, contribuindo para o meu aprendizado como pesquisadora.

À Dra. Ingrid Elida Collantes Diaz, pesquisadora da Universidade Paulista, pelo apoio, paciência, ensinamento, incentivo e auxílios diversos, ao longo do trabalho.

À Dra. Carmem Lucia Queiroga e ao Dr. Adilson Sartoratto, pesquisadores do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), pela colaboração na análise do óleo volátil.

Ao Dr. André G. Tempone, pesquisador do Instituto Adolfo Lutz, e à doutoranda Daniela Soares Corrêa, pela colaboração na realização dos ensaios da atividade anti-protozoária *in vitro*.

Ao Dr. Luis Antonio Biasi, pesquisador do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, e à doutoranda Marília Pereira Machado pela autorização de coleta e colaboração na obtenção dos espécimes estudados.

Ao técnico de laboratório, Sr. Roberto de Jesus Honório, por todo auxílio prestado para a realização do trabalho experimental.

Aos professores da disciplina de Farmacognosia e aos colegas de pós-graduação, pela colaboração ao longo da realização deste trabalho.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

YAMAMICHI, E. Estudo químico e avaliação de atividade antiprotozoária *in vitro* do óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae). 2014. 111f. Dissertação de mestrado - Orientador: Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer. e-mail: erikay@usp.br

RESUMO

O número de pessoas infectadas por protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, no mundo, permanece preocupante, havendo cerca de 12 milhões de casos de leishmaniose e 7 a 8 milhões referentes à doença de Chagas. Face ao grave quadro destas doenças e às limitações da terapêutica atual, a busca de novos fármacos é urgente. Considerada uma das principais estratégias disponíveis, a pesquisa a partir de espécies vegetais contendo constituintes bioativos é promissora fonte de moléculas potencialmente ativas. Neste contexto, espécies do gênero *Lavandula* mostraram atividade anti-*Leishmania in vitro*, tendo motivado a seleção de *L. angustifolia* (Lamiaceae). Embora tenham sido comprovadas diversas atividades farmacológicas desta espécie, a atividade antiprotozoária frente aos agentes avaliados ainda não havia sido estudada. Além disto, a produção em larga escala e o seu uso bastante difundido no mundo, sobretudo nas indústrias cosméticas, de perfumes e de domissanitários, despertou interesse. O presente trabalho visou à análise da composição do óleo volátil de uma variedade de *L. angustifolia* aclimatada ao Brasil e à avaliação de sua atividade antiprotozoária *in vitro*, frente a cepas de *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* e de *Trypanosoma cruzi*. A análise do óleo volátil das inflorescências e das folhas, por CG-EM, indicou a predominância de monoterpenos, tendo-se estabelecido análise comparativa entre estes órgãos. De forma geral, o óleo foi inativo frente às espécies de *Leishmania*, tendo apresentado promissora atividade anti-*Trypanosoma*.

Palavras-chave: *L. angustifolia*; Lamiaceae; óleo volátil; análise por CG-EM, *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

YAMAMICHI, E. Chemical composition and *in vitro* antiprotozoal activity of the volatile oil from *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae). 2014. 111 p. Master degree dissertation - Advisor: Prof. Dr. Dominique Corinne Hermine Fischer. e-mail: erikay@usp.br

ABSTRACT

The number of people infected by *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* protozoa around the world has increased and raised concerns that approximately 12 million cases of leishmaniasis and 7 to 8 million cases of Chagas disease have been reported. The alarming statistics involving these diseases and limitations of therapeutics currently in use point to an urgent need for new drugs. Considered one of the main strategies available, research on plants containing bioactive constituents is a promising source of potentially active molecules. Species of *Lavandula* genus have shown *in vitro* anti-*Leishmania* activity and this encouraged the present study on *L. angustifolia* (Lamiaceae) species. Although several pharmacological activities have been identified, the antiprotozoal activity against these specific agents has not yet been approached. Moreover, the possibility of a large-scale production and its quite comprehensive use worldwide, especially for the manufacturing of cosmetics, perfumes and household sanitizing products have attracted our interest. This study aimed at the analysis of the volatile oil compounds of the *L. angustifolia* species acclimatized in Brazil as well as the evaluation of the *in vitro* antiprotozoal activity against the strains of *Leishmania* (L.) *infantum*, *L. (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. The CG-EM analysis of the volatile oil from the inflorescences and leaves has shown monoterpenes as majority constituents also allowing a comparative analysis between these organs. Overall, the oil was not active against the *Leishmania* species but presented promising anti-*Trypanosoma* activity.

Key-words: *L. angustifolia*; Lamiaceae; volatile oil; CG-EM analysis, *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo	21
Figura 2	- Distribuição da leishmaniose visceral no mundo	22
Figura 3	- Número de casos e incidência de leishmaniose visceral no Brasil, em 2007, por 10.000 habitantes	23
Figura 4	- Número de casos e incidência de leishmaniose cutânea no Brasil, em 2007, por 10.000 habitantes	23
Figura 5	- Formas parasitárias	24
Figura 6	- Fêmeas de flebotomíneo	26
Figura 7	- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	28
Figura 8	- Leishmaniose visceral	29
Figura 9	- Lesão ulcerativa causada por <i>Leishmania major</i> no Afeganistão (após punção para biópsia)	31
Figura 10	- Úlcera de leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania braziliensis</i>	32
Figura 11	- Lesão na mucosa da boca causada por <i>Leishmania major</i>	33
Figura 12	- Forma mucosa tardia (aparecimento da lesão mucosa após o surgimento da lesão cutânea), com infiltração, ulceração e destruição do septo cartilaginoso e do lábio superior	35
Figura 13	- Distribuição global de casos da doença de Chagas baseada em estimativas oficiais, no período de 2006-2010	36
Figura 14	- a. Formas <i>trypomastigotas circulantes</i> ; b. Pseudocistos de amastigotas em doença de Chagas agudo	37
Figura 15	- <i>Triatoma infestans</i>	38
Figura 16	- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Figura 17	- Estrutura química do antimoníato de N-metilglucamina	44
Figura 18	- Estrutura química do estibogluconato de sódio	44
Figura 19	- Estrutura química da pentamidina	45
Figura 20	- Estrutura química da anfotericina B	46
Figura 21	- Estrutura química do miltefosina	47
Figura 22	- Estrutura química do paromomicina	48
Figura 23	- Estruturas químicas do benzonidazol e do nifurtimox	49

Figura 24	- Exemplos de constituintes monoterpênicos dos óleos voláteis	53
Figura 25	- Exemplos de constituintes sesquiterpênicos dos óleos voláteis	54
Figura 26	- Exemplos de constituintes fenilpropanóides dos óleos voláteis	54
Figura 27	- <i>Lavandula</i> . Constituintes monoterpênicos mais frequentes nos óleos voláteis do gênero	61
Figura 28	- <i>Lavandula</i> . Constituintes sesquiterpênicos mais frequentes nos óleos voláteis do gênero	62
Figura 29	- <i>Lavandula angustifolia</i> Miller cultivar <i>Provence Blue</i> . Espécimes cultivados no EPAGRE de São Joaquim, SC	71
Figura 30	- <i>Lavandula angustifolia</i> Miller cultivar <i>Provence Blue</i> . A Hábito herbáceo B Detalhes de folhas e inflorescências	72
Figura 31	- Cromatograma em CCD dos óleos voláteis das inflorescências (OVi) e das folhas (OVf) de <i>L. angustifolia</i> Mill.	80
Figura 32	- <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. - Cromatograma do óleo volátil das inflorescências, obtido por CG, nas condições analíticas descritas no item 3.6.2.	82
Figura 33	- <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. - Cromatograma do óleo volátil das folhas, por CG, nas condições analíticas descritas no item 3.6.2.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Concentração efetiva em 50%
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
GC/ EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IS	Índice de seletividade
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LV-HIV	Leishmaniose visceral-Vírus da Imunodeficiência Humana
MIC	Concentração Mínima Inibitória
NTDs	Neglected Tropical Diseases
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Constituintes monoterpenóides com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	63
Quadro 2	- Constituintes sesquiterpenóides com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	66
Quadro 3	- Hidrocarbonetos com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Valores dos teores de umidade (% m/m) das inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> Miller	78
Tabela 2	- Valores dos teores de óleo volátil nas inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> Miller	79
Tabela 3	- Constituintes químicos (%) do óleo volátil das inflorescências de <i>L. angustifolia</i> Miller	83
Tabela 4	- Constituintes químicos (%) do óleo volátil das folhas de <i>L. angustifolia</i> Miller	85
Tabela 5	- Concentração efetiva de 50% (CE ₅₀) (µg/mL) do óleo volátil de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> Mill. frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> (MHOM/BR/1972/LD) e de <i>L. (L.) amazonensis</i> (WHO/BR/00/LT0016) e às formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y)	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Considerações gerais	18
1.2	Leishmaniose	20
1.2.1	Epidemiologia da leishmaniose	20
1.2.2	Agentes etiológicos das leishmanioses	24
1.2.3	Vetores	25
1.2.4	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	27
1.2.5	Formas clínicas da leishmaniose	28
1.2.5.1	Leishmaniose visceral (LV)	29
1.2.5.2	Leishmaniose cutânea (LC)	30
1.2.5.3	Leishmaniose mucosa (LM)	32
1.2.5.4	Leishmaniose cutânea difusa (LCD)	33
1.2.5.5	Leishmaniose mucocutânea (LMC)	34
1.3	Doença de Chagas	35
1.3.1	Situação epidemiológica	36
1.3.2	Agente etiológico	37
1.3.3	Vetor	38
1.3.4	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
1.3.5	Fases clínicas	41
1.4	Tratamento	41
1.4.1	Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose	42
1.4.2	Fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas	48
1.5	Metabólitos secundários de origem vegetal e pesquisa de novas moléculas com atividade antiprotozoária	50
1.6	Óleos voláteis	52
1.7	Atividade antiprotozoária de espécies do gênero <i>Lavandula</i>	55
1.8	<i>Lavandula angustifolia</i> Miller	57
1.8.1	Generalidades	57
1.8.2	Usos e atividades biológicas e farmacológicas do óleo volátil	58
1.9	Aspectos químicos do gênero <i>Lavandula</i>	61

1.9.1	Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	62
2	OBJETIVOS	70
2.1	Objetivo geral	70
2.2	Objetivos específicos	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1	Material vegetal	71
3.2	Padrão de substância e solventes	73
3.3	Tratamento preliminar do material	73
3.4	Perda por dessecação	73
3.5	Obtenção do óleo volátil	73
3.6	Análise Cromatográfica	74
3.6.1	Perfil cromatográfico do óleo volátil de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> obtido por cromatografia em camada delgada (CCD)	74
3.6.2	Análise do óleo volátil de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> por CG-EM e CG-DIC	74
3.7	Avaliação da atividade antirprotozoária <i>in vitro</i>	75
3.7.1	Parasitas	75
3.7.1.1	<i>Leishmania</i>	75
3.7.1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	76
3.7.1.3	Determinação da atividade antiprotozoária <i>in vitro</i> e da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) do óleo volátil	76
3.7.1.4	Análise estatística dos resultados	76
4	RESULTADOS	78
4.1	Perda por dessecação	78
4.2	Teor de óleo volátil	78
4.3	Perfil cromatográfico do óleo volátil de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> obtido por cromatografia em camada delgada (CCD)	79
4.4	Composição do óleo volátil de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> por CG-EM e CG-DIC	81
4.4.1	Óleo volátil das inflorescências	81
4.4.2	Óleo volátil das folhas	84

4.5	Atividade anti- <i>Leishmania</i> e anti- <i>Trypanosoma in vitro</i> dos óleos voláteis de inflorescências e folhas de <i>L. angustifolia</i> Mill.	86
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÃO	92
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

1. 1 Considerações gerais

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de infecções parasitárias, virais e bacterianas que afetam 1 bilhão de pessoas no mundo – um sexto da população mundial – e são responsáveis por um número estimado de 534 mil mortes por ano. Afetam a população de países pobres e causam enorme sofrimento por invalidez, comprometimento no desenvolvimento físico e cognitivo e doenças debilitantes (BURROWS, 2014).

O quadro das doenças negligenciadas apresenta graves repercussões sócio-econômicas, tendo em vista a incapacitação e até a desfiguração, causadas por tais enfermidades (WHO, 2010b).

Há cerca de 12 milhões de pessoas, no mundo, infectadas por protozoários do gênero *Leishmania* (WHO, 2010a) e 7 a 8 milhões afetadas pelo *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2013).

A terapêutica convencional apresenta sérias limitações, no que se refere à eficácia e à toxicidade (MOSKOWITZ; KURBAN, 1999). Além disto, frequentemente, o paciente enfrenta dificuldades como longas distâncias até o centro médico onde realiza o tratamento, a impossibilidade de hospitalização em função do custo e período prolongado da mesma, levando ao baixo índice de adesão e facilitando o aparecimento de resistência, o que implica na necessidade do uso posterior de drogas denominadas de “segunda linha”.

Quando não tratadas, as leishmanioses graves se tornam crônicas e debilitantes, incapacitando os pacientes e criando o círculo vicioso da pobreza, desnutrição e doença (DESJEUX, 2004).

Contudo, torna-se urgente o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários para assegurar maior eficácia e segurança ao paciente.

Entre os antiprotozoários existentes, há exemplos de fármacos importantes obtidos de fonte vegetal, como os antimaláricos quina e a artemisinina (NEWMAN et al., 2000).

A busca de novos compostos bioativos a partir de espécies vegetais é considerada uma das principais estratégias e promissora fonte de moléculas potencialmente ativas (CALIXTO, 2005; WHO, 2005).

Neste contexto, espécies do gênero *Lavandula* motivaram o presente estudo, uma vez que algumas espécies mostraram atividade anti-*Leishmania in vitro* (ALMUSAYEIB et al, 2012; ABDEL-SATTAR et al., 2010) e estudos relacionados a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* não foram encontrados.

Desta forma, considerando a ausência de pesquisa, selecionou-se a espécie *L. angustifolia* Mill. que, sendo mundialmente conhecida, é produzida em larga escala, por seu conteúdo aromático, para suprir a ampla demanda das indústrias de cosméticos, farmacêutica, de produtos domissanitários e de alimentos. Além disto, a espécie possui variedade de atividades farmacológicas.

O presente trabalho visou avaliar as atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* do óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Miller (Lamiaceae), ao mesmo tempo, estudando a composição química do óleo obtido a partir das inflorescências e folhas de espécimes da variedade *Provence Blue*, aclimatada no Brasil.

1. 2 Leishmaniose

As leishmanioses são uma das antropozoonoses consideradas um grande problema de Saúde Pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2013).

São classificadas em dois grandes grupos: as leishmanioses dermatrópicas e as viscerotrópicas. O primeiro grupo recebe esse nome porque afeta, principalmente, a estrutura da pele, da face e das mucosas superiores. A doença apresenta três formas clínicas: a leishmaniose mucosa (LM), a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). As formas viscerotrópicas afetam os órgãos internos como baço, estômago, fígado e pâncreas, entre outros, e são chamadas calazar ou Kala-Azar, febre de dum-dum ou barriga d'água (ALTAMIRANO-ENCISO, et al., 2003).

Admite-se que as leishmanioses tegumentares sejam uma forma de doença autóctone do continente americano, chamando-se, por isso, leishmaniose tegumentar americana (LTA) (ALTAMIRANO-ENCISO, et al., 2003).

Uma revisão recente mostrou que as leishmanioses estão presentes em mais de 98 países e 3 territórios nos cinco continentes. Aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente, sendo 300 mil casos de leishmaniose visceral (90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sul do Sudão e Sudão) e 1,0 milhão são leishmaniose cutânea (ocorrendo principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia) ou mucocutânea (principalmente no Brasil, Peru e Bolívia). Dos 1,3 milhões de casos, apenas 600 mil são relatados. A leishmaniose vem expandindo desde 1993, tendo um aumento recorde dos números de casos (WHO, 2013).

1. 2. 1 Epidemiologia da leishmaniose

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose ameaça cerca de 350 milhões de pessoas em 98 países ao redor do mundo, particularmente, na África, América Latina, América do Sul e Ásia Central, bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio (WHO, 2010a).

Leishmaniose visceral possui estimativa de causar mais de 50 mil mortes por ano (WHO, 2010a).

Se considerar a morbidade e a mortalidade, a enfermidade é vista como problema de Saúde Pública mundial (DESJEUX, 1996). Apesar de endêmica, nas regiões tropicais, com a globalização da economia e o aumento de viagens a estas áreas, a ameaça da enfermidade foi estendida. Além disto, outras formas de infecção passaram a expor ao risco de contrair a doença, como as transfusões de sangue e o uso de produtos derivados, produzidos a partir de indivíduos infectados assintomáticos (AMATO et al., 2008).

A leishmaniose pode ser uma zoonose, envolvendo animais domésticos ou silvestres como reservatórios hospedeiros, ou uma antropozoonose, como humanos como reservatórios (KAMHAWI, 2006). A maioria das leishmanioses são zoonóticas (ASHFORD, 2000).

A distribuição das formas cutânea e visceral, no mundo, encontra-se representada nas **Figuras 1 e 2**.

Figura 1- Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2012c).

Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2012d).

A leishmaniose cutânea (LC) e a mucocutânea (LMC) estão muito difundidas, sendo o Brasil o país com maior número de casos de LC, na América do Sul (ALVAR, 2012).

Desde a década de 1980, vem aumentando o número de casos. A doença (LC), que era tipicamente transmitida através dos reservatórios ocorrentes nas matas, tornou-se uma doença periurbana em áreas desmatadas (ALVAR, 2012).

Nas duas últimas décadas, a leishmaniose visceral (LV) reapareceu no mundo de forma preocupante. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com HIV, à semelhança do que se observa no sul da Europa (BRASIL, 2011b).

Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a LV encontra-se em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de diferentes faixas etárias. A letalidade vem aumentando, sendo que a letalidade média nos últimos quatro anos foi de 5,8% (BRASIL, 2011b).

A doença mostra-se mais prevalente na parte nordeste do país. (ALVAR et al., 2012). As **Figuras 3 e 4** mostram, respectivamente, o número de casos e a incidência de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea no Brasil, em 2007, para cada 10.000 habitantes.

Figura 3 - Número de casos e incidência de leishmaniose visceral no Brasil, em 2007, por 10.000 habitantes (ALVAR et al., 2012).

Figura 4 - Número de casos e incidência de leishmaniose cutânea no Brasil, em 2007, por 10.000 habitantes (ALVAR et al., 2012).

1. 2. 2 Agentes etiológicos das leishmanioses

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae (KOFF; ROSEN, 1994). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros que infectam humanos, *Leishmania* e *Viannia*, baseados no padrão de desenvolvimento dos parasitas no intestino dos flebotomíneos (DANTAS-TORRES, 2007).

O gênero *Leishmania* compreende um número crescente de espécies, sendo, atualmente, cerca de 30, das quais 20 causam doenças em humanos (ASHFORD, 2000).

Os protozoários de *Leishmania* são intracelulares obrigatórios e infectam fagócitos mononucleares. O parasita apresenta-se em duas formas morfológicas, a amastigota intracelular aflagelada, ocorrente nos tecidos de hospedeiros vertebrados, como homem, cães, lagartos e roedores, e as promastigotas, flageladas, presentes no tubo digestivo do inseto vetor (**Figura 5**) (WALKER, 2014; BRASIL, 2013).

Figura 5 – Formas parasitárias. A. *Leishmania* forma aflagelada ou amastigota; **B.** *Leishmania* forma flagelada ou promastigota (BRASIL, 2013).

A leishmaniose visceral é causada principalmente por *L. donovani* e *L. infantum*, sendo o último presente apenas no Novo Mundo (WHO, 2010a).

No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea é causada principalmente por cinco espécies de *Leishmania*: *L. aethiopia*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. Leishmanioses recidivantes, também conhecida como leishmaniose lupóide ou tuberculóide, é causada pela *L. tropica*. A leishmaniose cutânea difusa é causada pela *L. aethiopia*. Lesões da mucosa bucal e da laringe podem ser causadas pela *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica* (MONGE-MAILLO, LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

No Novo Mundo, a leishmaniose cutânea é causada por diversas espécies do subgênero de *Leishmania* [*L. (Leishmania)*: *L. amazonenses*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*] e subgênero *Viannia*: [*L. (Viannia)*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*] e, excepcionalmente, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* e *L. lindenbergi* (MONGE-MAILLO, LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Na América, atualmente, são reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais (BRASIL, 2013).

No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Vian-
nia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) brazili-
ensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L.
(V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em
estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2013).

1. 2. 3 Vetores

Os vetores da doença são as fêmeas dos insetos flebotomíneos (**Figura 6**), pertencentes à Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, que infectam o ser humano pela picada. Ocorrem em áreas de florestas, cavernas, ou nas tocas de pequenos roedores (MARCILI et al, 2014; BRASIL, 2013).

Há, aproximadamente, 500 espécies de flebotomíneos conhecidos, mas apenas cerca de 30, transmitem a leishmaniose. Os gêneros que a transmitem são *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (KOFF; ROSEN, 1994; BATES, 2007; BRASIL, 2013).

No Brasil, dependendo da localização geográfica, os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* são conhecidos como “mosquito palha”, “tatuquira”, “birigui”, entre outros (BRASIL, 2013). A WHO (2013) cita também o gênero *Psychodopygus* como sendo um dos flebotomíneos transmissores.

Figura 6 - Fêmeas de flebotomíneo (Foto ampliada) (WHO, 2014a; WHO, 2014b).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da Leishmaniose Tegumentar americana (LTA) são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetoras por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. O papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino. Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *L. neivai* e *L. fisheri* como vetores da LTA, estas espécies tem sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2013).

Até o momento, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da leishmaniose visceral, no Brasil: *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal transmissora da *L. (L.) chagasi* e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006a).

Os insetos *Lutzomyia longipalpis* são os mais estudados (WHO, 2010a), sendo pequenos, com 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pêlos e são de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (BRASIL, 2006a).

A *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. Há indício de que o período de maior transmissão da LV ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2006a).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, *L. longipalpis* é encontrado, principalmente, próximo a uma fonte de alimento.

Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (BRASIL, 2006a).

1. 2. 4 Ciclo de vida de *Leishmania*

A infecção pelo vetor, as fêmeas de flebotomíneos, ocorre quando se alimentam de sangue de hospedeiros mamíferos infectados, contendo macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania* (**Figura 5**). Amastigotas são parasitas intracelulares encontrados nos fagolisossomos de macrófagos e de outros fagócitos, de forma arredondada ou fusiforme, com no máximo 5 μm de diâmetro, contendo núcleo simples, cinetoplasto e uma bolsa flagelar (ASHFORD, 2000). No trato digestivo anterior do flebotomíneo ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas. Começam a reproduzir por divisão binária e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (**Figura 5**). O ciclo do parasito no inseto se completa em cerca de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes, quando realizam um novo repasto sanguíneo, em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento da célula, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos, em um processo contínuo, ocorrendo então a disseminação para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. O ciclo da transmissão é completado quando o vetor se alimenta de sangue, contendo fagócitos infectados ou parasitas extracelulares (**Figura 7**) (BRASIL, 2006a; BATES, 2007; OLIVEIRA, 2009; WALKER, 2014).

Os parasitas de *Leishmania* podem, também, ser transmitidos por meio de transfusão de sangue de um hospedeiro humano infectado (WALKER, 2014), além de relações sexuais, transplantes de órgãos e excrementos de cães. Foi reportada,

igualmente, a transmissão congênita da mãe infectada, sintomática ou assintomática, para o filho (MEINECKE, 1999).

A capacidade de um flebotomíneo de agir como vetor é determinada, primeiramente, pela capacidade das várias formas do parasita de sobreviver, multiplicarem-se e diferenciarem-se, no trato digestivo do inseto antes de ser transmitido para o vertebrado (CARVALHO, 2008).

Figura 7 – Ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* (Figura modificada de CDC, 2014)

1. 2. 5 Formas clínicas da leishmaniose

Os diferentes agentes etiológicos da leishmaniose causam variedade de sintomas, desde úlceras cutâneas até a doença visceral fatal (KAMHAWI, 2006).

Algumas leishmanioses, especialmente, aquelas causadas pelas espécies viscerotrópicas, podem permanecer assintomáticas (MURRAY, 2005).

As principais formas de manifestação clínica das leishmanioses são: a visceral, a cutânea, a mucocutânea e a pós-calazar (BURROWS, 2014).

A seguir, as principais formas clínicas serão apresentadas, seguindo a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010a).

1. 2. 5. 1 Leishmaniose visceral (LV)

No velho mundo, a leishmaniose visceral (LV) é causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani* - *L. infantum* (MARCILI et al., 2014; WHO, 2010a; ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999).

Alguns casos causados por *L. tropica* tem sido reportados. Muitas infecções são assintomáticas, embora alguns indivíduos, eventualmente, desenvolvam a leishmaniose visceral clínica (WHO, 2010a).

A desnutrição e a supressão da imunidade, como no HIV, predispõem à manifestação clínica. A leishmaniose visceral pode ser endêmica, esporádica ou epidêmica, com características clínicas diferentes em cada situação (WHO, 2010a; ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999).

O período de incubação varia de 10 dias a mais de um ano, e o aparecimento da doença é, geralmente, gradual. Os sintomas comuns são: febre, mal-estar, tremores ou calafrios, perda de peso, anorexia e desconforto no hipocôndrio esquerdo. O sinal clínico mais comum é a esplenomegalia (**Figura 8**), com ou sem hepatomegalia e palidez da membrana mucosa. Linfadenopatia pode estar presente (especialmente no Sudão) e pode ser a única manifestação clínica (WHO, 2010a; DESJEUX, 2004).

A ocorrência de coinfeção, com o HIV, mudou o quadro clássico da leishmaniose visceral e das outras formas da doença (DESJEUX, 2004).

Figura 8 - Leishmaniose visceral (WHO, 2014c)

No Novo Mundo, a leishmaniose visceral é endêmica ou esporádica. O agente etiológico é a *L. infantum*, e a doença é clinicamente semelhante àquela causada por *L. infantum*, no Velho Mundo (WHO, 2010a).

No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades mas, na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Em alguns dos focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por faixa etária, com ocorrência de altas taxas, também, em adultos jovens (GONTIJO; MELO, 2004).

1. 2. 5. 2 Leishmaniose cutânea (LC)

Na leishmaniose cutânea (LC), a lesão clássica inicia como uma pápula ou nódulo no local da inoculação que cresce aos poucos, levando ao menos uma semana para alcançar o tamanho final. Uma crosta desenvolve centralmente, podendo cair, expondo uma úlcera de até 5 cm de diâmetro com uma borda elevada e um endurecimento circundante variável que se cura, gradualmente, ao longo de meses ou anos, causando a formação de cicatriz aprofundada, com alteração da pigmentação. É comum a ocorrência de nódulos satélites no bordo da lesão (WHO, 2010a; GONTIJO; CARVALHO, 2003; ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2000; HERWALDT, 1999).

A leishmaniose cutânea, no Velho Mundo, é causada por cinco espécies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani*. O período de incubação é geralmente de 2 a 8 meses (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; WHO, 2010a).

A leishmaniose recidivante, também conhecida como “lupóide” ou “tuberculóide” é uma forma crônica de leishmaniose cutânea antroponótica (transmissão homem – vetor – homem) que pode durar muitos anos. O progresso lento das lesões, geralmente em áreas expostas, é caracterizado por cicatrizes com atividade periférica. Se não tratada, a doença é destrutiva e desfigurante. A escassez de amastigotas na lesão pode facilmente levar a um diagnóstico tardio e incorreto (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; WHO, 2010a; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose cutânea causada por *L. major* (**Figura 9**) é, como em outras formas de leishmaniose cutânea, indolor quando as lesões são simples. As lesões

são muitas vezes severamente inflamadas e ulceradas e curam-se, em período de 2 a 8 meses. Frequentemente, multiplicam-se, especialmente em imigrantes não imunes, tornando confluentes e secundariamente infectadas. Tais lesões, muitas vezes, demoram a curar e podem deixar cicatrizes grandes, desfigurantes e incapacitantes (WHO, 2010a).

A leishmaniose cutânea causada por *L. aethiopica* dá origem, principalmente, a lesões nodulares cutâneas localizadas: menos frequentes, pode dar origem à leishmaniose oronasal, onde podem ocorrer distorções nas narinas e lábios, ou à leishmaniose cutânea difusa. Muitas lesões desenvolvem lentamente e podem espalhar-se, localmente. A ulceração é tardia ou ausente. A cura espontânea, tipicamente, leva de 2 a 5 anos (WHO, 2010a; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

Figura 9 – Lesão ulcerativa causada por *Leishmania major* no Afeganistão (após punção para biópsia) (BAILEY; LOCKWOOD, 2007)

Nas Américas, a leishmaniose cutânea localizada é originada por várias espécies, dos subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. A prevalência de cada um varia de acordo com a região das Américas (WHO, 2010a; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo mas, geralmente, originam, no local da inoculação, uma mácula seguida por uma pápula que ulcera e se expande, formando uma lesão típica em forma de cratera redonda a oval ou evoluindo para uma lesão nodular (WHO, 2010a; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

Lesões secundárias cutâneas ou mucosas podem ocorrer. Nas mucosas é mais frequentemente associado a infecções por *L. braziliensis* (**Figura 10**) e *L. panamensis*, mas podem ser causadas por outras espécies (WHO, 2010a).

A leishmaniose cutânea originada por *L. infantum*, espécie geralmente associada à leishmaniose visceral, é muitas vezes atípica. As lesões apresentam-se em forma de nódulos localizados, ou placas, que estão dentro do espectro clínico das lesões causadas por espécies dermatrópicas do Novo Mundo (WHO, 2010a).

Figura 10 - Úlcera de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* (HEPBURN, 2000).

1.2.5.3 Leishmaniose mucosa (LM)

As lesões da leishmaniose mucosa (LM) são, raramente, vistas no Velho Mundo, mas algumas espécies podem causá-la (ALBORZI et al., 2013). Pacientes com leishmaniose visceral ou com leishmaniose cutânea pós-calazar, na Índia e no Sudão, e também algumas co-infecções com HIV, podem desenvolver lesões na boca ou nariz ou na mucosa genital. Lesões na mucosa bucal ou na laringe causadas pela *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica* pode apresentar em pessoas idosas ou com formas menos graves de imunossupressão (**Figura 11**). Lesões na laringe podem tornar-se crônicas e podem ser confundidas com câncer (WHO, 2010a).

Figura 11 - Lesão na mucosa da boca causada por *Leishmania major* (ALBORZI, 2013)

1.2.5.4 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea difusa (LCD) é causada pela *L. aethiopia* sendo caracterizada por máculas, pápulas, nódulos ou placas amplamente disseminadas ou por infiltração difusa na pele, especialmente, nas superfícies extensoras dos membros e na face, onde o espessamento das sobrancelhas e os lóbulos das orelhas pode assemelhar-se à hanseníase virchowiana. Não há ulceração. O acometimento das mucosas se limita às bordas das narinas e dos lábios. Esta doença não cicatriza espontaneamente, e as recaídas são frequentes após o tratamento (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; WHO, 2010a; GONTIJO, 2003).

A LCD, associada à imunossupressão causada por outras espécies de *Leishmania*, pode ocorrer em pacientes co-infectados pelo HIV e pessoas com outras formas de imunossupressão (por exemplo, receptores de transplantes). Características atípicas, como ulcerações, podem ocorrer (WHO, 2010a; BAILEY; LOCKWOOD, 2007; DESJEUX, 2004).

No Novo Mundo, a leishmaniose cutânea difusa é, clinicamente e patologicamente, semelhante à forma do Velho Mundo. Geralmente, não há lesões nas mucosas. Não se cura espontaneamente. Inicialmente, a doença responde ao tratamento padrão, mas há recaídas e deixa de responder a outro tratamento (WHO, 2010a; ASHFORD, 2000).

A leishmaniose cutânea difusa tem sido associada às espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis* (WHO, 2010a; ASHFORD, 2000).

1.2.5.5 Leishmaniose mucocutânea (LMC)

O termo “leishmaniose mucocutânea” (LMC) aplica-se somente à doença do Novo Mundo causada, principalmente, por *L. braziliensis* e *L. panamensis*, (ambas as espécies do subgênero *Viannia*). A maioria dos casos é relatada na Bolívia, no Brasil e no Peru. A forma clássica de leishmaniose mucocutânea é secundária à lesão cutânea e, na maioria dos casos, resultante de leishmaniose cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. A característica marcante das espécies que causam a leishmaniose mucocutânea é que levam metástases para os tecidos das mucosas da boca e do trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica (WHO, 2010a; DESJEUX, 2004).

Condições semelhantes causadas por outras espécies de *Leishmania* foram relatadas em pacientes imunodeprimidos (WHO, 2010a; DESJEUX, 2004).

Lesões nasais estão sempre presentes, com nódulos e infiltração no septo cartilaginoso anterior, levando à obstrução da narina e posterior perfuração do septo, com colapso e alargamento do nariz (**Figura 12**) (BRASIL, 2006b; MURRAY et al., 2005).

A pele do nariz pode ser mais espessa, inchada e apresentar hiperemia. Em um terço dos pacientes, outros locais estão envolvidos, em ordem de frequência: faringe, palato, laringe, traquéia e lábio superior. A linfadenopatia local é frequente. Na fase final, há mutilação grave, com obstrução e destruição do nariz, faringe e laringe. A LMC quase nunca cicatriza espontaneamente (BRASIL, 2006b; MURRAY et al., 2005).

Infecções bacterianas secundárias são frequentes, sendo a pneumonia intercorrente a causa mais comum de morte.

Figura 12 - Forma mucosa tardia de leishmaniose (aparecimento da lesão mucosa após o surgimento da lesão cutânea), com infiltração, ulceração e destruição do septo cartilaginoso e do lábio superior (BRASIL, 2006b).

1.3 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença tropical negligenciada, crônica, infecciosa e endêmica na América Latina. É causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*, encontrado em todo o continente americano, em uma variedade de reservatórios silvestres mamíferos, e transmitida pelo inseto vetor triatomíneo. Além de transmissão vetorial, os seres humanos podem ser infectados por *T. cruzi* através da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com parasitas vivos, de mãe para filho durante a gravidez, e por meio de sangue contaminado, por transfusão ou órgãos transplantados (MORAES et al, 2014).

A doença de Chagas tem uma história única, onde a confluência das populações rurais e marginalizadas afetadas, atitudes profundamente enraizadas, as práticas clínicas e uma área de pesquisa infundada resultaram em um dos problemas de saúde mais negligenciado, atualmente.

A globalização mudou a epidemiologia da doença, que agora é encontrada em todas as Américas, também na Europa e no Japão. Assim, a doença de Chagas é um problema de saúde pública mundial (GASCON et al., 2014).

O custo do tratamento para a doença de Chagas continua a ser substancial. Só na Colômbia, o custo anual de cuidados médicos para todos os pacientes com a doença foi estimado em cerca de 267 milhões de dólares. A pulverização de inseticidas para o controle de vetores custa quase 5 milhões de dólares por ano (WHO, 2013).

íses emergentes da Ásia e Austrália, contribuindo para aumentar em muito a visibilidade da doença de Chagas.

Alguns casos de doença aguda foram registados em alguns países desde a iniciativa de implementação do Cone Sul (CAROD-ARTAL;GASCON, 2010). Um caso recente ocorreu, em 2005, no Brasil, em Santa Catarina, com a ingestão de caldo de cana. Dos 31 casos confirmados, cinco pacientes evoluíram para óbito. Esta ocorrência constitui um evento raro, já que o Brasil, em algumas regiões, apresenta evidências da interrupção da transmissão (BRASIL, 2005).

1. 3. 2 Agente etiológico

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelar *Trypanosoma cruzi* da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma*. O parasita possui um complexo ciclo biológico que envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, e apresenta três formas distintas: (i) epimastigota, forma presente no vetor e em cultura axênica; (ii) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e (iii) amastigota, forma de replicação intracelular. (DIAS;DESSOY, 2009) (**Figura 14**).

Figura 14 – a. Formas *tripomastigotas* circulantes; **b.** Pseudocistos de amastigotas em doença de Chagas agudo (COURA;BORGES-PEREIRA, 2010).

T. cruzi pertence a uma espécie heterogênea que circula entre hospedeiros mamíferos e insetos vetores. A heterogeneidade do parasita tem sido estudada por métodos biológicos, bioquímicos e moleculares, e poderia explicar as variadas manifestações da doença de Chagas e as diferenças geográficas na morbidade e mortalidade (RASSI Jr. et al, 2010).

1.3.3 Vetor

O *Trypanosoma cruzi* é transmitido para os humanos por insetos triatomíneos hematófagos, chamados por vários nomes locais, incluindo “vinchuca” no Uruguai, Argentina, Bolívia e Paraguai, “barbeiro” no Brasil, na Colômbia, “pito”, “chipo”, “chupança”, “chinchorro”, encontrados em áreas pobres, com condições de habitação insalubres (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

No México e na América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá), os principais vetores domésticos são *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens* e *Triatoma dimidiata*. Nos países andinos (Venezuela, Colômbia, Equador e Peru) os vetores domésticos são *R. prolixus*, *R. ecuadoriensis*, *Triatoma dimidiata*, *T. maculata*, *T. venosa* e *T. infestans* (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Nos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), as espécies de triatomíneos responsáveis pela doença de Chagas são, em ordem de importância, o *T. infestans* (**Figura 15**), *R. prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. dimidiata*. Embora existam triatomíneos nos EUA, apenas casos raros foram relatados de doença de Chagas autóctone causada por este vetor e a maior parte dos casos é importado da América Latina (SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Figura 15 – *Triatoma infestans* (NOIREAU et al, 2009).

1.3.4 Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi vive um estágio de sua vida no sangue e/ou em tecidos de hospedeiros vertebrados e durante outros estágios os parasitas vivem no trato digestivo de vetores invertebrados como hospedeiros temporários (RASSI Jr. et al., 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo (**Figura 16**), com três principais estágios de desenvolvimento em insetos vetores e mamíferos hospedeiros, tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas (RASSI Jr. et al., 2010; SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Formas epimastigotas são extracelulares e não infectivas do parasita encontrado no trato digestivo dos insetos vetores, onde se multiplicam por divisão binária. As epimastigotas possuem um núcleo central, cinetoplasto e flagelo ligado ao corpo, e diferem dos tripomastigotas que tem um flagelo terminal. Amastigotas possuem um flagelo interno e pequeno (MACHADO et al., 2012; RASSI Jr. et al., 2010; SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Um inseto triatomíneo infectado faz o repasto sanguíneo e libera tripomastigotas em suas fezes próximo ao local da picada. As tripomastigotas entram, no hospedeiro, ao coçar a ferida ou através da membrana da mucosa intacta como aquela da conjuntiva. Após as tripomastigotas metacíclicas passarem através da pele, caem na corrente sanguínea. Quando a contaminação é feita por ingestão oral, a invasão dos tripomastigotas ocorre através do epitélio estomacal. Após a infecção, os parasitas se alojam nos vacúolos parasitóforos, mas escapam para o citoplasma da célula hospedeira e se diferenciam em amastigotas aflagelados. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária diferenciando em tripomastigotas. Saem da célula e disseminam-se pela corrente sanguínea e linfática (MACHADO et al., 2012; RASSI Jr. et al., 2010; SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Quando o inseto triatomíneo se alimenta de sangue de um humano ou animal infectado, ingere as formas tripomastigotas. No trato digestivo do vetor, as tripomastigotas transformam-se em epimastigotas, que é a forma mais adaptável para sobreviverem no inseto, onde o parasita prolifera e se transforma, em tripomastigotas metacíclicas, que serão liberados nas fezes do inseto (MACHADO et al., 2012; RASSI Jr. et al., 2010; SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010).

Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas do hospedeiro humano são alvos potenciais de infecção. Com o desenvolvimento da resposta imune, a parasitemia se reduz e o número de parasitas nos tecidos diminui substancialmente, sinalizando o fim da fase aguda. No entanto, uma vez que o parasita não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, como do músculo ou dos gânglios entéricos, persiste indefinidamente durante a vida do hospedeiro (WALKER et al., 2014; RASSI Jr. et al., 2010).

Figura 16 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Figura modificada de RASSI Jr. et al., 2010).

O mecanismo de transmissão do *T. cruzi*, por transfusão de sangue (sangue total ou derivados), é responsável por aproximadamente 10% dos casos da doença. O risco de infecção pelo sangue de doadores infectados é de cerca de 20%. É a maior rota de transmissão em zonas urbanas (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010).

A via de transmissão congênita apresenta aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano (PRATA, 2001).

Há também microepidemias agudas da doença de Chagas, por transmissão oral, com ingestão de alimentos contaminados como carne, suco de cana-de-açúcar e açaí (PRATA, 2001).

A transmissão por transplantes de órgãos (fígado, coração, medula óssea e outros) e contaminação acidental em laboratório são mecanismos esporádicos (PRATA, 2001).

1.3.5 Fases clínicas

Os fatores determinantes da doença de Chagas estão relacionados à quantidade de parasitas na infecção inicial, às formas infectantes na inoculação inicial (número de tripomastigotas), à linhagem do *T. cruzi* inoculado, às reinfecções, à qualidade das cepas e clones (biodemas), aos receptores clonal-histotrópicos específicos do hospedeiro e à resposta imunitária inicial do paciente (COURA;BORGES-PEREIRA, 2010).

A fase aguda da doença de Chagas é reconhecida apenas em 1% a 2% dos indivíduos infectados. Na fase aguda, os sintomas são variáveis e declinam, espontaneamente, depois de 4 a 8 semanas (BARRETT et al., 2003).

Com o tratamento adequado pode-se eliminar o parasita durante esta fase. Na fase crônica, aproximadamente 70% dos indivíduos soropositivos são assintomáticos (forma indeterminada), enquanto que 30% desenvolvem patologias cardíacas graves e/ou digestivas. Lesões inflamatórias necrosantes podem também ocorrer na matéria cinzenta do sistema nervoso central (SNC) (WHO, 2012a; BARRETT et al., 2003).

Além disso, a cada ano, 2% a 3% de indivíduos assintomáticos evoluem para as manifestações sintomáticas e as determinantes desta conversão são desconhecidas (WHO, 2012a).

O resultado da infecção em um indivíduo, em particular, é o resultado de um conjunto de interações complexas entre a composição genética do parasita, a imunogenética do hospedeiro e os fatores ambientais (WHO, 2012a).

1.4 Tratamento

1.4.1 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

Considerando a tendência iminente de morte para os pacientes com manifestações clínicas de infecção visceral, o uso de terapias altamente efetivas e rápidas é importante. Decisões sobre se e como tratar as leishmanioses cutâneas devem levar em conta se o paciente está sob risco da leishmaniose mucosa.

Outro fator importante é o grau das lesões, sua localização, número, tamanho, evolução, persistência e outras características, como: linfagite nodular, por exemplo (HERWALDT, 1999). Não há um tratamento ótimo único para todas as formas de leishmaniose cutânea (HEPBURN, 2000).

O principal tratamento recomendado, tanto para a leishmaniose visceral como para a cutânea, foi introduzido há mais de 60 anos. Entretanto, algumas novas terapias estão tornando-se disponíveis (CROFT; COOMBS, 2003).

Infelizmente, não foi identificada uma terapia ideal para a leishmaniose cutânea. A terapia intravenosa ou intramuscular de antimoniais continua sendo a melhor opção. Em geral, a leishmaniose mucosa é mais difícil de tratar do que a forma cutânea (HERWALDT, 1999).

Segundo MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ (2013), os tratamentos atuais para as leishmanioses cutâneas são fracamente justificados e tem baixa eficácia.

O tratamento pode ser tópico ou sistêmico. Estas diferentes opções devem ser baseadas sobre as espécies de *Leishmania*, regiões geográficas e apresentações clínicas.

Em certos casos de leishmaniose, no Velho Mundo, as lesões podem se curar espontaneamente, sem necessidade de terapia de intervenção.

Terapias de uso tópico (termoterapia, crioterapia, pomada de paromomicina, infiltração local com antimoniais) são boas opções com menor toxicidade sistêmica, reservando os tratamentos sistêmicos (azóis, miltefosina, antimoniais, formulações de anfotericina B), principalmente, para os casos complexos. A maioria dos casos de leishmaniose cutânea, no Novo Mundo, exige tratamento sistêmico (principalmente com antimoniais pentavalentes), tanto para acelerar a cicatrização, como também,

para prevenir a disseminação na mucosa oral-nasal. Estes tipos de lesões são potencialmente graves e sempre exigem esquemas sistêmicos à base, principalmente, de antimoniais e de pentamidina. Entretanto, a associação com a imunoterapia é promissora (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Os medicamentos existentes para o tratamento da leishmaniose visceral (a forma mais grave da doença) sofrem numerosas limitações e continua havendo a necessidade urgente de descobertas de medicamentos mais seguros e eficazes (BURROWS et al., 2014).

Os fármacos atuais para a leishmaniose ocupam um espaço químico caracterizado pelo alto peso molecular e de baixa lipofilicidade e quase todos são administrados por infusões intravenosas lentas, dolorosas ou por injeção intramuscular. Além disso, alguns contêm grupos ou elementos funcionais indesejáveis, como o antimônio (BURROWS et al., 2014).

Todos esses fármacos, incluindo os agentes disponíveis somente para a administração oral, como miltefosina, estão associados à grave toxicidade incluindo: nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, anafilaxia, hipocalcemia, ototoxicidade, toxicidade gastrointestinal e teratogenicidade, exigindo, geralmente, longos tratamentos (BURROWS et al., 2014).

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados, pela primeira vez, no tratamento da leishmaniose tegumentar, em 1913, por Gaspar Vianna (BRASIL, 2006a).

Na leishmaniose visceral, os compostos antimoniais passaram a ser utilizados dois anos após, na Itália. Os derivados pentavalentes (Sb^{+5}), foram introduzidos. na década de 40 e, desde então, os mesmos tem sido considerados como fármacos de primeira escolha no tratamento dessa protozoose (BRASIL, 2006a).

Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose desse antimonial seja calculada, em miligramas de Sb^{+5} / kg/ dia, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes, que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina (**Figura 17**) e o estibogluconato de sódio (**Figura 18**), sendo este último, não comercializado no Brasil (BRASIL, 2013).

Figura 17 - Estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina

Figura 18 - Estrutura química do estibogluconato de sódio

São contraindicados para gestantes, pois atravessam a barreira placentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, levando a severas síndromes de retardamento mental. O tratamento destes casos consiste em cuidados locais, observação clínica, e na utilização de anfotericina B (BRASIL, 2013; MENEZES et al., 2011; RASSI Jr. et al., 2010).

Há restrições do uso dos antimoniais em pacientes com mais de 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Os efeitos adversos mais frequentes são: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Essas queixas são, geralmente, discretas ou moderadas e, raramente, exigem a suspensão do tratamento (BRASIL, 2013; MENEZES et al., 2011; SÁNCHEZ-SANCHO et al., 2010; PRATA, 2001).

Entretanto, na dose de 20mg Sb⁺⁵/ kg/ dia, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que podem obrigar a suspender o tratamento. O principal efeito adverso do Sb⁺⁵ é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular (BRASIL, 2013).

Para as crianças, o esquema terapêutico utilizado segue o mesmo que aquele do tratamento para adultos (BRASIL, 2013).

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelos antimoniais pentavalentes, os fármacos de segunda escolha são, principalmente, a anfotericina B e as pentamidinas (**Figura 19**) (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina).

Figura 19 - Estrutura química da pentamidina

O desoxicolato de anfotericina B (**Figura 20**) é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. É considerada como fármaco de primeira escolha, no tratamento de gestantes, e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. Apresenta-se na forma de suspensão coloidal, sendo comercializada em frascos-ampola contendo 50 mg (BRASIL, 2013).

Atua nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo* de *Leishmania*. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática dos parasitas (BRASIL, 2013).

Os principais efeitos adversos incluem: febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal e distúrbios do comportamento (BRASIL, 2013).

Figura 20 - Estrutura química da anfotericina B

A anfotericina B lipossomal é uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada aos lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos do fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações.

No Brasil, este fármaco está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral. Entretanto, não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar, sendo então considerada uma droga “off label” para esta indicação.

O uso “off label” de qualquer medicamento pode ser realizado por conta e risco do médico que o prescreve. Existe um acúmulo de experiências relatadas na literatura que permite indicar o uso da anfotericina B lipossomal para leishmaniose tegumentar, nos casos em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso ou contra-indicadas. Os efeitos adversos incluem febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios, flebite no local da infusão e dor lombar (BRASIL, 2013).

As pentamidinas (**Figura 19**) são diamidinas aromáticas que vem sendo utilizadas como fármacos de segunda escolha, no tratamento da leishmaniose tegumentar, em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. São comer-

cializadas para uso em humanos, nas seguintes formulações: Isotionato (sulfonato de di-B-hidroxietano) e mesilato (sulfonato de di-B-hidroximetila).

Os efeitos adversos mais frequentes são: dor músculo-esquelética, anorexia, dor abdominal, náuseas, vômitos, astenia e fadiga (OLIVEIRA, 2011). O *diabetes mellitus* pode se manifestar, a partir da administração da dose total de 1g.

O efeito diabetogênico parece ser cumulativo e dose-dependente.

São contraindicadas em caso de gestação, *diabetes mellitus*, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8kg.

A miltefosina (**Figura 21**) foi o primeiro fármaco de uso oral aprovado para o tratamento das leishmanioses visceral e cutânea. Atualmente, está registrada para o tratamento da leishmaniose, na Índia, Alemanha e Colômbia. É também utilizada para o tratamento de metástase na pele associado ao câncer de mama e ao linfoma cutâneo.

A miltefosina tem levado a altos níveis de cura, no tratamento das leishmanioses visceral, cutânea e mucocutânea (MOREIRA et al., 2014). Apesar de bem tolerada é potencialmente teratogênica, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrízes (GONTIJO, 2004).

Figura 21 - Estrutura química do miltefosina

A paromomicina (**Figura 22**), antibiótico aminoglicosídico, foi originalmente identificada, na década de 1960, e tem sido utilizado, tanto na leishmaniose cutânea quanto na visceral (CROFT;COOMBS, 2003).

As reações adversas apresentadas, no uso tópico, em leishmaniose cutânea são: eritema, dor, edema e bolhas. No uso, na leishmaniose visceral, por via parenteral, o principal efeito adverso foi a ototoxicidade (MURRAY, 2005).

Figura 22 - Estrutura química da paromomicina

Alguns esquemas terapêuticos têm sido utilizados, como alternativas para casos refratários ou com contraindicação aos esquemas tradicionais, em leishmaniose cutânea. Embora tais indicações façam sentido, não foram documentadas, por ensaios clínicos controlados, de forma a dar respaldo a sua aprovação.

Entre estes esquemas, podemos citar: o uso dos antimoniais pentavalentes em doses baixas ou elevadas, ou por via intralesional, associação do antimonial pentavalente com pentoxifilina, ou do antimonialpentavalente com alopurinol, antimonial pentavalente com sulfato de aminosidina, antimonial pentavalente com sulfato de paramomicina, antimonial pentavalente e imunoterápicos (BRASIL, 2013).

1.4.2 Fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas

No tratamento da doença de Chagas, são usualmente utilizados os fármacos benzonidazol e o nifurtimox (**Figura 23**) (DIAS; DESSOY, 2009; LESCURE et al., 2010; MACHADO et al., 2012), sendo contra-indicados na gravidez e na insuficiência renal e hepática (WHO, 2012a).

benzonidazol

nifurtimox

Figura 23 - Estruturas químicas do benzonidazol e do nifurtimox

O nifurtimox não se encontra disponível no Brasil, atualmente (BRASIL, 2004).

O benzonidazol é um nitroimidazol usado em humanos, desde 1978. Inibe a síntese do ácido ribonucleico e gera acúmulo de superóxidos. Os seus principais efeitos adversos são caracterizados por reações de hipersensibilidade (dermatite) no início do tratamento (7 a 10 dias), toxicidade medular (20 a 30 dias) e nefropatias periféricas no final do tratamento, usualmente após o acúmulo de dose (LOUP et al., 2011).

Outros efeitos observados foram: hepatotoxicidade, vômito, dor abdominal, anorexia, fadiga, dor de cabeça, mialgia e insônia (SÁNCHEZ-SANCHO, PÁEZ, 2010).

O nifurtimox é um nitrofurano, também utilizado, desde a década de 1970. Atua pela toxicidade de radicais livres no DNA do parasita e pelo acúmulo de superóxidos.

Os principais efeitos adversos são caracterizados pelos sintomas digestivos: náusea, vômito, diarreia, anorexia, perda de peso e sintomas neuropsiquiátricos, como: irritabilidade, distúrbios do sono e neuropatias periféricas (LOUP et al., 2011). É contra-indicado em casos de doenças hepáticas, renais e na gravidez (SÁNCHEZ-SANCHO;PÁEZ, 2010).

Frente às reações colaterais de ambos os fármacos empregados, no tratamento da infecção chagásica, é necessária uma grande atenção para a adequação das doses dos medicamentos. Em crianças, os efeitos adversos destes fármacos são bem tolerados (OLIVEIRA et al., 2008).

1.5 Metabólitos secundários de origem vegetal e pesquisa de novas moléculas com atividade antiprotozoária

A utilização de produtos de origem vegetal com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de tratamento (RATES, 2001). Mesmo sendo empregadas há milhares de anos, as espécies vegetais continuam desempenhando um papel essencial na área da Saúde (WHO, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% dos habitantes do mundo dependem de medicamentos tradicionais para seus cuidados primários de saúde. Os produtos à base de plantas também desempenham um papel importante para a outra parte da população, nos sistemas de saúde dos países desenvolvidos (WHO, 2005).

Pelo menos 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies vegetais, são considerados fármacos importantes, estando em uso em um ou mais países. Destes, 74% foram descobertos em estudos químicos dirigidos ao isolamento das substâncias ativas de espécies utilizadas na medicina tradicional (NEWMAN et al., 2000).

Nos últimos anos, tem havido crescente interesse no emprego das terapias alternativas e dos produtos naturais, especialmente aqueles derivados de vegetais. Vários motivos levaram a isto, como: a ineficiência da medicina convencional (efeitos colaterais e ineficácia), uso abusivo ou incorreto de substâncias sintéticas e falta de acesso, de grande porcentagem da população, ao tratamento farmacológico convencional (RATES, 2001).

As espécies vegetais continuam sendo utilizadas, no mundo todo, para o tratamento de doenças e novos fármacos continuam sendo desenvolvidos, a partir da pesquisa de seus constituintes (GURIB-FAKIM, 2006; BALUNAS; KINGHORN, 2005; PHILLIPSON, 2001).

Entre 1981 e 2002, 5% das 1031 novas entidades químicas aprovadas como medicamentos, pela Food and Drug Administration (FDA), constituíam-se de produtos naturais e, outros 23%, foram moléculas derivadas destes (CLARDY; WALSH, 2004). Evidências recentes da indústria farmacêutica mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais continuam representando uma fonte extremamente valiosa na descoberta de novos compostos ativos, uma vez que repre-

sentam estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos evolutivos, ao longo de milhões de anos (CALIXTO, 2005).

No mundo, de acordo com a OMS (WHO, 2010b), há 17 doenças tropicais negligenciadas. Estas enfermidades possuem um grande impacto sobre indivíduos, familiares e a comunidade, em função da própria doença, mas, também, pelo efeito em sua qualidade de vida, na perda da produtividade, no agravamento da pobreza, além do alto custo do tratamento. Tais enfermidades, geralmente, afetam pessoas que vivem na área rural e em áreas urbanas associadas à pobreza, tendo pouco impacto mercadológico, frente à indústria farmacêutica.

Além disto, considerando a toxicidade, os efeitos colaterais, a proporção de recidivas, o custo e a duração do tratamento, bem como a resistência aos medicamentos convencionalmente empregados na terapêutica atual, há necessidade urgente de novos fármacos (MACHADO et al., 2010b). Desta forma, a pesquisa a partir do reino vegetal, que representa rica fonte de moléculas potencialmente ativas, acena como estratégia promissora.

Entre as diversas classes de metabólitos vegetais, os óleos voláteis provenientes de espécies das mais diversas famílias botânicas apresentaram atividade anti-protozoária (PÉREZ et al., 2012; MONZOTE et al., 2012; MACHADO et al., 2011b), frente aos diferentes parasitas, como: *Entamoeba histolytica* (BEHNIA et al., 2008), *Giardia lamblia* (MACHADO et al., 2011b), *Trichomonas vaginalis* (PÉREZ et al., 2012), *Plasmodium* (DELL'AGLI et al., 2012; BOYOM et al., 2003; LOPES et al., 1999), *Toxoplasma gondii* (LEE et al., 2013; PILLAI et al., 2012), *Trypanosoma* (SARTORELLI et al., 2012; LADAN et al., 2011; SANTORO et al., 2007a; SANTORO et al., 2007b; MIKUS et al., 2000a), *Leishmania* (MONZOTE et al., 2014; MACHADO et al., 2014; MACHADO et al., 2010a), tendo sido focados, no presente trabalho, em função de sua presença na espécie estudada.

1.6 Óleos voláteis

Os óleos voláteis são produzidos a partir do metabolismo secundário vegetal, e armazenados em estruturas secretoras especializados da planta. Essas estruturas podem ocorrer na superfície do vegetal (estruturas secretoras exógenas), geralmente secretando substâncias diretamente para o exterior do mesmo e, também, podem ocorrer nos tecidos mais internos, em cavidades especializadas (estruturas secretoras endógenas). O material secretado apresenta diferentes naturezas, podendo ser constituído de e/ou conter: látex, ceras, gorduras, flavonóides, açúcares, gomas, mucilagens, bem como óleos voláteis, resinas entre outros (SVOBODA; GREENAWAY, 2003).

Os óleos voláteis apresentam, como característica marcante, o seu forte odor. São compostos naturais voláteis, complexos e que apresentam diversas propriedades medicinais, podendo ser antimicrobianos (bactericida, virucida e fungicida), analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos e anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008; TUREK; STINTZIG, 2012), entre outros.

Para o vegetal, igualmente, os óleos voláteis desempenham diferentes funções, sendo vistos como estratégia de proteção, com ações antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida e também contra a herbivoria, reduzindo a atração dos herbívoros por tais plantas. Eles podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis.

Os óleos voláteis são líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente inferior àquela da água. São obtidos, geralmente, por arraste a vapor ou hidrodestilação, a partir de espécies vegetais, que ocorrem, geralmente, em países de clima temperado a quente.

A sua biossíntese ocorre nos diversos órgãos vegetais (flor, folha, caules, semente, fruto, raiz), sendo armazenados nas estruturas secretoras que podem ser: células secretoras, glândulas, dutos secretores, células epidérmicas ou tricomas glandulares.

Há muitos fatores que podem influenciar na composição química, quantidade e qualidade dos óleos obtidos, como: clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo, bem como a forma de extração. Portanto, para obter

óleos voláteis com composição constante devem ser utilizados vegetais desenvolvidos no mesmo solo, clima e época e empregar a mesma técnica de coleta e de extração a partir do mesmo órgão vegetal (BAKKALI et al., 2008).

Os componentes do óleo volátil podem ser agrupados em dois grupos de diferentes origens biossintéticas. Os principais grupos de compostos encontrados nestes óleos são os terpenos e terpenóides (mono e sesquiterpenos) e os fenilpropanóides, metabólitos estes que lhes conferem as características organolépticas próprias (GURIB-FAKIM, 2006; BIZZO et al., 2009).

Os terpenóides apresentam importância considerável como compostos bioativos de plantas medicinais. Monoterpenos são os componentes mais simples dos terpenos. Apresentam 10 átomos de carbono ou duas unidades de isopreno em sua composição.

Como exemplos de monoterpenos, citam-se: pineno, linalol, mentol, borneol, 1,8-cineol, entre outros (**Figura 24**).

Figura 24 - Exemplos de constituintes monoterpênicos dos óleos voláteis

Por sua vez, os sesquiterpenos apresentam 15 átomos de carbono, ou três unidades isoprênicas, em sua estrutura (**Figura 25**). Alguns sesquiterpenos podem ser mencionados, como exemplo: bisabolol, humuleno e cariofileno (GURIB-FAKIM, 2006).

Figura 25 - Exemplos de constituintes sesquiterpênicos dos óleos voláteis

Os constituintes fenilpropanóides são caracterizados por apresentar estrutura com esqueleto C6-C3 (fenilpropano) como, por exemplo, o eugenol e o anetol (**Figura 26**) (LANFRANCHI, et al., 2010; FERRER et al., 2008).

Figura 26 - Exemplos de constituintes fenilpropanóides dos óleos voláteis

1.7 Atividade antiprotozoária de espécies do gênero *Lavandula*

A revisão da literatura mostrou que há reduzido número de pesquisas do gênero *Lavandula*, com relação à atividade antiprotozoária. Os extratos de espécies de *Lavandula* demonstraram ser ativos, frente às diferentes espécies de protozoários testados, constituindo campo aberto e promissor para novos estudos.

Os óleos voláteis de *L. angustifolia* e do híbrido *L. x intermedia* foram ativos, em baixas concentrações ($\leq 1\%$) nos parasitas de *Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis* e *Hexamita inflata in vitro*, tendo-os eliminado completamente. À concentração de 0,1 %, o óleo de *L. angustifolia* demonstrou ser ligeiramente mais ativo do que aquele de *L. x intermedia* frente a *G. duodenalis* e *H. inflata* (MOON et al., 2006).

O extrato em metanol das partes aéreas de *L. stoeckas* L. apresentou atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas de *L. donovani* (CE₅₀: 44 µg/ mL), sem ter demonstrado citotoxicidade em células Vero (FOKIALAKIS et al., 2007).

O extrato em metanol da espécie *L. dentata* apresentou atividade antiprotozoária *in vitro*, frente à cepa de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina (CE₅₀: 1,8 µg/ mL, IS: 32,1), além de atividade moderada nas formas amastigotas de *L. infantum* (CE₅₀: 32,5 µg/ mL, IS: 1,8). Frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CE₅₀: 6,3 µg/ mL, IS: 9,3), o mesmo extrato foi mais ativo do que naquelas de *T. brucei* (CE₅₀: 14,2 µg/ mL, IS: 4,1) (ABDEL-SATTAR et al, 2010).

Ensaio com o extrato em metanol de *L. dentata* mostraram maior nível de atividade frente aos protozoários: *P. falciparum*, *T. cruzi* e *T. brucei*, em contraste àquela verificada em parasitas do *L. infantum* (AL-MUSAYEIB et al., 2012, ABDEL-SATTAR, et al., 2010).

Em estudo de ZHELJAZKOV e colaboradores (2012), o óleo de *L. angustifolia* foi testado frente a *L. donovani* e *P. falciparum*, tendo inibido menos de 50% dos parasitas.

O óleo volátil da espécie *L. viridis* L'Her. apresentou baixo nível de atividade em *L. infantum*, com IC₅₀ de 263 µg/mL (MACHADO et al., 2010a).

Até o presente trabalho, não haviam sido realizados ensaios para a avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* do óleo volátil do gênero *Lavandula*. E, no caso da-

quele de *L. angustifolia*, pode-se dizer que, igualmente, não havia sido testado frente a *Leishmania infantum* ou *L. amazonensis*, espécies abordadas no presente trabalho.

1.8 *Lavandula angustifolia* Miller

1.8.1 Generalidades

A espécie selecionada para o presente estudo pertence à família Lamiaceae (Labiatae) a qual engloba mais de 5000 espécies com propriedades aromáticas e que respondem pela produção de óleos voláteis de importância comercial (LANDMANN et al., 2007; GURIB-FAKIM, 2006).

O gênero *Lavandula* apresenta cerca de 20 espécies, possuindo mais de 100 variedades (PORTO; DECORTI, 2008). Entretanto, o número de espécies é controverso. LANDMANN et al. (2007) citam 30 espécies conhecidas, enquanto que HASSANPOURAGHDAM et al. (2011) e GONÇALVES E ROMANO (2013) contabilizam a existência de mais de 39. *L. angustifolia* é a espécie mais popular do gênero (RAINA; NEGI, 2012).

L. angustifolia, popularmente conhecida, como “lavanda”, nome derivado do latim “lavare”, que significa lavar. (TANKEU, 2014). Apresenta algumas sinonímias científicas, como: *L. vera* D.C., *L. officinallis* Chaix. (BONA et al., 2012; HASSANPOURAGHDAM et al., 2011), *L. spica* L. (LEUNG, 1996).

A espécie, de porte pequeno e arbustivo, é perene e muito aromática, alcançando de 30 a 70 cm de altura. Possui ramificações basais e folhas, geralmente, verde-acinzentadas (BONA et al., 2012). É nativa do Mediterrâneo, Península Arábica, Rússia e África (TANKEU et al, 2014; BASCH et al., 2004).

Geralmente, está bem adaptada a climas secos e altitudes mais elevadas (acima de 1800 m), mas tem sido cultivada em várias regiões de clima temperado ao redor do mundo (BONA et al., 2012).

Atualmente, realiza-se o cultivo da espécie, em diversos países (Argentina, Bulgária, Chipre, Grécia, Croácia, França, Hungria, Irã, Itália, Rússia, Espanha, Marrocos, Turquia, Japão e Reino Unido) (ZHELJAZKOV et al., 2013; SHAFAGHAT et al., 2012) e inclusive no Brasil, onde foi aclimatada (MACHADO et al, 2011a).

O óleo volátil é, geralmente, extraído a partir das inflorescências e, também, pode ser a partir das folhas do vegetal, órgãos cujo rendimento, composição química e fragrância do óleo diferem. IRITI e colaboradores (2006) constataram que o maior

teor de óleo é alcançado na época da floração, uma vez que, um grande número de tricomas glandulares é encontrado nos cálices das floretas.

Esta espécie, juntamente com *L. latifolia* e *L. x intermedia* (*L. latifolia* x *L. angustifolia*), apresenta importância comercial, respondendo pela produção de óleo volátil, em larga escala. Estimativas mencionam a produção anual de 462 toneladas do óleo (LAWRENCE, 1992).

1.8.2 Usos e atividades biológicas e farmacológicas do óleo volátil

O óleo volátil das inflorescências de *L. angustifolia* apresenta aplicações em diversas áreas, sendo empregado em: aromaterapia, alimentos, bebidas, cosméticos, domissanitários como detergentes, pesticidas, além de produtos farmacêuticos (RAINA; NEGI, 2012; PORTO; DECORTI, 2008; BASCH et al., 2004; LEUNG, 1996).

Na fabricação de alimentos, o óleo essencial é empregado como aromatizante de bebidas, produtos de panificação e goma de mascar. Na indústria de perfumes e de sabões é um dos mais apreciados (SHAFAGHAT et al., 2012).

Na área farmacêutica, o espectro de utilização do óleo da espécie é muito abrangente, sendo-lhe atribuídas diversas propriedades, como: antiinflamatória, antioxidante, antifúngica, estimulante do apetite, afrodisíaca. É empregado no tratamento de: ansiedade (por aromaterapia), asma, bronquite, problemas de circulação, tonturas, fadiga, dores de cabeça, varizes, espasmos, dores em geral, psicose, epilepsia, ressaca, entre outros (TANKEU, 2014; BASCH et al., 2004).

O uso da espécie, em geral, é muito antigo. No Egito, foi empregada por anciãos no processo de mumificação. Os romanos, gregos e persas adicionavam seu óleo aos banhos. René-Maurice Gattefosé foi o primeiro cientista a reconhecer o valor terapêutico do óleo de lavanda, tendo-se recuperado de grave queimadura no braço, após explosão no seu laboratório, com boa regeneração do tecido atingido (TANKEU, 2014).

Tendo em vista os diferentes usos do óleo, diversas pesquisas foram realizadas, visando encontrar fundamento, por meio da avaliação de diversas atividades farmacológicas.

HAIJHASHEMI et al. (2003) verificaram as atividades analgésica e antiinflamatória do óleo volátil, pela diminuição do fator de necrose tumoral e aumento da proliferação de linfócitos (AZADMEHR, 2011).

O estado de alerta foi diminuído, assim como o desempenho da memória, quando usado 4 gotas do óleo volátil da espécie em um difusor, segundo estudo de MOSS e colaboradores (2003).

LIS-BALCHIN e HART (1997, 1999) constataram que o óleo volátil de *L. angustifolia*, e seu constituinte linalol, reduziram, de forma significativa o efeito espasmolítico na musculatura lisa, tendo verificado que o mecanismo de ação é pós-sináptico, mediado por AMP cíclico.

O efeito relaxante do óleo de *L. angustifolia* foi atribuído a sua moderada atividade na inibição da acetilcolinesterase (DOHI et al., 2009, ADSERSEN et al., 2006).

A atividade anestésica ocular local foi constatada após a aplicação de uma solução oftálmica contendo óleo volátil de *L. angustifolia* (30-2500 µg/ mL), na bolsa conjuntival (GHELARDINI et al., 1999).

O óleo volátil de lavanda levou à redução dos espasmos associados à dismenorréia, quando empregado em aromaterapia (DEHKORDI et al., 2014, HAN et al., 2006). Adicionalmente, MATSUMOTO e colaboradores (2013) observaram alívio dos sintomas pré-menstruais, fato atribuído à melhoria da atividade do sistema nervoso parassimpático.

Igualmente empregado em aromaterapia, o óleo levou à redução do uso de acetaminofeno, no pós-cirúrgico de retirada das amígdalas (SOLTANI et al., 2013).

O óleo de *L. angustifolia* mostrou ser bem absorvido, pela pele e por inalação, tendo atuado no sistema de neurotransmissores. Quando usado em quadro de demência, causou a redução das alterações comportamentais dos indivíduos, por ela, acometidos (PLOEG et al., 2010).

Em estudo de HANCIANU e colaboradores (2013) verificaram que a exposições repetidas, ao óleo, o mesmo atua na neuroproteção em cérebro de ratos, tendo sugerido que tal ação foi resultado de suas atividades antioxidante e antiapoptótica.

A atividade antialérgica do óleo volátil, em ratos e camundongos, foi verificada por KIM e colaboradores (1999), tendo inibido a degranulação de mastócitos em ensaios, *in vivo* e *in vitro*.

O óleo volátil de *L. angustifolia* não teve atividade mutagênica em *Salmonella* e *E. coli*. Ao contrário, constatou-se forte ação antimutagênica (EVANDRI et al., 2005).

Na maior parte das pesquisas, não foi demonstrada a citotoxicidade do óleo de lavanda, exceto naquele de PRASHAR e colaboradores (2004), quando testado à concentração de 0,25 % (v/v), em células endoteliais (HMEC-1, HNDF e 153BR) e aos fibroblastos humanos.

Ao óleo de *L. angustifolia* foi atribuído amplo espectro de atividade antimicrobiana, a qual tem sido extensamente avaliada.

Segundo diversos estudos, o óleo possui atividade antifúngica, frente a diferentes espécies de bolores e leveduras. Entre estes, citam-se: *Aspergillus* (SHIN, 2003), espécies que deterioram alimentos (ARAÚJO et al., 2003), *Trichophyton rubrum* (ADAM et al., 1998) e *Candida albicans* (D'AURIA et al., 2005).

No tocante à atividade antibacteriana foi constatado que um grande número de espécies mostrou sensibilidade ao óleo, como: *Escherichia coli*, *Streptococcus D*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella epidermidis*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (TALBAOUI et al., 2012, SOKOVIĆ et al., 2010).

O óleo, igualmente, demonstrou atividade significativa, na redução de biofilmes de *S.aureus* e *E. coli* (TALBAOUI et al., 2012, BUDZYŃSKA et al., 2011).

YAP e colaboradores (2014) verificaram que o óleo de lavanda foi capaz de reverter a resistência bacteriana do antibiótico piperacilina e em associação com óleo de outras espécies vegetais, como de canela e de hortelã, mostrou ser possível reduzir o uso de antibióticos beta-lactâmicos (YAP et al., 2014, YAP et al., 2013).

1.9 Aspectos químicos do gênero *Lavandula*

Na composição química do gênero *Lavandula* são encontradas várias classes de metabólitos secundários, destacando-se os óleos voláteis que as tornam altamente aromáticas (HARBORNE, WILLIAMS, 2002).

O conhecimento fitoquímico do gênero centralizou-se nos óleos voláteis, tendo em vista a grande produção anual destas espécies com a finalidade comercial. As espécies mais utilizadas, neste sentido, são *L. angustifolia*, *L. latifolia* e seu híbrido (*L. latifolia* x *L. angustifolia*) (HARBORNE, WILLIAMS, 2002). O óleo volátil das mesmas revelou a presença de cerca de 150 constituintes, em grande parte presentes na forma de traços (HARBORNE ; WILLIAMS, 2002).

O óleo volátil das espécies de *Lavandula* contem monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos (LANDMANN, 2007; HARBORNE; WILLIAMS, 2002). Nas **Figuras 27 e 28**, foram dispostos os principais constituintes de terpenos encontrados (HARBORNE; WILLIAMS, 2002).

acetato de linalila

linalol

1,8-cineol

cânfora

Figura 27 - *Lavandula*. Constituintes monoterpênicos mais frequentes nos óleos voláteis do gênero.

Figura 28 - *Lavandula*. Constituintes sesquiterpênicos mais frequentes nos óleos voláteis do gênero.

Outras classes de metabólitos biossintetizadas pelo táxon incluem os constituintes fenólicos, como flavonóides (hidroxiflavonas, flavonas e seus glicosídeos) (UPSON et al., 2000), pigmentos antociânicos (SAITO; HARBORNE, 1992, HARBORNE; WILLIAMS, 2002), triterpenos, ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos rosmarínico e clorogênico (HARBORNE; WILLIAMS, 2002) e cumarinas (cumarina, 7 hidroxí-cumarina, umbeliferona) (HARBORNE; WILLIAMS, 2002; KHALIL et al., 1979).

1.9.1 Óleo volátil de *Lavandula angustifolia*

Por ser espécie comercial, o óleo volátil da espécie, foi extensamente analisado, conforme atesta a vasta literatura. Entretanto, há variabilidade da composição do mesmo, conforme as condições e fatores, anteriormente comentados (**item 1.6**), que interferem na sua composição, inclusive o órgão vegetal e espécime considerado, entre outros.

Em geral, a época tida como a mais adequada para a coleta desta e de outras espécies do gênero *Lavandula*, inclusive em função do teor de óleo, corresponde à floração plena até a fase em que metade da floração tornou-se murcha (PORTER et al., 1982).

Nos **Quadros 1 a 3**, apresentam-se os constituintes encontrados no óleo volátil de *L. angustifolia*. No **Quadro 1**, estão os compostos monoterpenóides com maior frequência de ocorrência. No **Quadro 2**, foram arrolados os principais sesquiterpenóides com maior frequência de ocorrência na espécie. Os dois hidrocarbonetos mais frequentemente encontrados foram dispostos no **Quadro 3**.

Quadro 1- Constituintes monoterpenóides com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Mill.

<i>L. angustifolia</i> Mill.			
Óleo volátil			
Composto monoterpenóide	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
(1) linalol		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011
(2) acetato de linalila		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010 AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006
(3) 1,8-cineol (eucaliptol)		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010 AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006

Quadro 1- continuação

<i>L. angustifolia</i> Mill.			
Óleo volátil			
Composto monoterpênóide	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
(3) 1,8-cineol (eucaliptol)		folhas	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 SHAFAGHAT et al., 2012
		pedúnculo	SHAFAGHAT et al., 2012
(4) 4- terpineol		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011
(5) borneol		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011
		pedúnculo	SHAFAGHAT et al., 2012 SHAFAGHAT et al., 2012

Quadro 1- continuação

<i>L. angustifolia</i> Mill.			
Óleo volátil			
Composto monoterpênóide	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
(6) cânfora		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011
		pedúnculo	SHAFAGHAT et al., 2012 SHAFAGHAT et al., 2012
(7) α-terpineol		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011
(8) acetato de lavandulila		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 DANH et al., 2013 VERMA et al., 2010

Quadro 2- Constituintes sesquiterpenóides com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Mill.

<i>L. angustifolia</i> Mill. Óleo volátil			
Composto sesquiterpenóide	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
(1) cariofileno		inflorescências	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folhas pedúnculo	SHAFAGHAT et al., 2012 SHAFAGHAT et al., 2012
(2) trans-β-farneseno		inflorescência pedúnculo	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 MAIETTI et al., 2013 SHAFAGHAT et al., 2012
(3) óxido de cariofileno		inflorescência	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
		folha pedúnculo	AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006 HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 SHAFAGHAT et al., 2012 SHAFAGHAz et al., 2012
(4) α-bisabolol		inflorescência	HASSANPOURAGHDAM et al., 2011 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006

Quadro 3- Hidrocarbonetos com maior frequência de ocorrência no óleo volátil de *Lavandula angustifolia* Mill.

<i>L. angustifolia</i> Mill.			
Óleo volátil			
Hidrocarbonetos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
(1) 1-octen-3-ol		inflorescências	RAINA;NEGI, 2012 MAIETTI et al., 2013 DANH et al., 2013 IRITI et al., 2006 VERMA et al., 2010
(2) 3-octanona		inflorescências	MAIETTI et al., 2013 ARAÚJO et al., 2003 IRITI et al., 2006

Nas inflorescências, grande número de autores, verificaram entre os constituintes principais, os seguintes: linalol, acetato de linalila, 1,8-cineol (eucaliptol), 4-terpineol, borneol, cânfora, além de α -terpineol, acetato de lavandulina, cariofileno, óxido de cariofileno e α -bisabolol (**Quadros 1 e 2**).

No caso do óleo volátil das folhas de *L. angustifolia*, foram descritos os seguintes compostos mais frequentes: 1,8 cineol, borneol, cânfora (Quadros 1).

Em relação ao teor do óleo volátil presente, na espécie, há variação entre os órgãos vegetais. HAJHASHEMI e colaboradores (2003) obtiveram rendimento de 1,1% (v/ v) de óleo nas folhas.

Considerando as limitações encontradas na terapêutica convencional utilizada no tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas e a estratégia de busca de moléculas bioativas, a partir das espécies vegetais, a espécie *Lavandula angustifolia* Miller. (Lamiaceae) foi selecionada para o presente estudo, de forma a analisar a composição de seu óleo volátil e avaliar o potencial do mesmo no emprego e no possível fornecimento de constituintes com potencial atividade antiprotozoária.

2 OBJETIVOS

2. 1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo o estudo do óleo volátil das inflorescências e das folhas da espécie *L. angustifolia* Miller. cultivar *Provence Blue* (Lamiaceae) no que se refere à composição e a sua potencial atividade antiprotozoária *in vitro*.

2. 2 Objetivos específicos

- Obtenção do óleo volátil das inflorescências e das folhas,
- Análise do óleo volátil por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG/ EM) e obtenção do perfil cromatográfico por CCD,
- Avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* do óleo, frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum* e *L. (L.) amazonensis* e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 Material vegetal

A espécie *Lavandula angustifolia* Miller cultivar *Provence Blue* (Lamiaceae) (**Figuras 29 e 30**) foi coletada no campo da Estação Experimental de São Joaquim da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPA-GRI), situado no Jardim Caiçara, em São Joaquim, SC, junto às coordenadas 28°17'39" Sul e 49°55'56" Oeste e à altitude de 1415 m, em dezembro de 2011.

Figura 29 - *Lavandula angustifolia* Miller cultivar *Provence Blue*. Espécimes cultivados no EPAGRI de São Joaquim, SC.

Figura 30 - *Lavandula angustifolia* Miller cultivar *Provence Blue*. A Hábito herbáceo B Detalhes de folhas e inflorescências.

A coleta foi realizada sob a autorização do Professor Associado Luiz Antonio Biasi do Departamento de Fitotécnica e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

Exsicatas da planta inteira foram preparadas e depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF), sob a denominação **Yamamichi 1**.

O mesmo material foi, igualmente, incorporado ao Herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o registro Nº UPCB 61303.

3. 2 Padrão de substância e solventes

Nas análises por CG-EM e CCD, foi empregado padrão de linalol da marca Fluka[®], como substância de referência (grau de pureza $\geq 98,5\%$). Os solventes utilizados nas análises foram de grau PA e adquiridos da Labsynth[®].

3. 3 Tratamento preliminar do material

O material foi separado, por órgão vegetal, em inflorescências e folhas, para a obtenção do óleo volátil. O material foi transportado sob refrigeração. As inflorescências foram mantidas frescas sob refrigeração, até o momento da obtenção do óleo. As folhas foram secas à temperatura ambiente, dispostas em bandejas de aço, ao abrigo da luz e, posteriormente, submetidas à hidrodestilação.

3. 4 Perda por dessecação

Cerca de 20 g de inflorescências frescas e 3 g de folhas em forma de droga foram analisadas, em duplicata. As amostras, cujas réplicas foram denominadas “1” e “2”, para cada órgão, foram transferidas para estufa, à temperatura de 100-105°C, onde foram mantidas até obter peso constante (g) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os dados foram usados para a correção do teor do óleo volátil.

3. 5 Obtenção do óleo volátil

As inflorescências frescas (230 g) e as folhas (droga) (250 g) foram submetidas à hidrodestilação, separadamente, por 4 horas, empregando o aparelho de Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O processo foi realizado em triplicata. Determinou-se a massa (g) e o teor (% m/m) de óleo, nos órgãos analisados.

3. 6 Análise Cromatográfica

3. 6. 1 Perfil cromatográfico do óleo volátil de inflorescências e folhas de *L. angustifolia* obtido por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os óleos voláteis das inflorescências e das folhas foram submetidos à análise por CCD em placas cromatográficas de alumínio de sílicagel 60 F₂₅₄ (Merck®), após solubilização em tolueno à concentração de 20 µL/ mL. O volume aplicado foi de cerca de 10 µL. As placas de alumínio foram seccionadas e utilizadas nas dimensões de 5 cm x 4 cm, com percurso de 4,5 cm.

O desenvolvimento cromatográfico foi efetuado, empregando a fase móvel constituída da mistura de tolueno : acetato de etila (95:5) e o padrão de linalol (Sigma-Aldrich®) como substância de referência. O composto foi solubilizado em tolueno, à concentração de 10 µL/ mL, e aplicado em igual volume dos óleos.

Os cromatogramas foram visualizados à luz natural e, posteriormente, sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm tendo sido, posteriormente, nebulizados com reativo de anisaldeído sulfúrico e transferidos para estufa a 100-105 °C, por 5-10 minutos (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2011; BRITISH Pharmacopoeia, 2010).

3. 6. 2 Análise do óleo volátil de inflorescências e folhas de *L. angustifolia* por CG-EM e CG-DIC

As análises por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (**CG-EM**) e cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (**CG-DIC**) do óleo volátil foram realizadas na Divisão de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a supervisão de Dra. Carmen Lúcia Queiroga e do Dr. Adilson Sartoratto.

Alíquotas de cerca de 20 mg do óleo volátil das inflorescências e das folhas de *L. angustifolia* foram solubilizadas, separadamente, em diclorometano p.a. (Synth®), à concentração de 12 mg/ mL e, posteriormente, analisadas em cromatógrafo a gás da marca Agilent® (modelo HP-6890) utilizando a coluna HP-5MS (5% fenilmetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i. e 0,25 µm espessura de filme) (J ; W Sci-

entific[®], UK), acoplado ao espectrômetro de massas da marca Agilent[®] (modelo HP-5975), no modo de ionização por impacto de elétrons (IE), de 70 eV, com varredura na faixa de massa/ carga (m/z) de 29-400 e taxa de aquisição de 1,0 scan/ s.

O volume injetado de óleo foi de 1,0 µL, no modo *scan*, com divisão de fluxo (*split*) 1: 20. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 250 °C, respectivamente. A temperatura da coluna variou de 60 a 240 °C, por 60 minutos, com taxa de aquecimento de 3°C/ min, empregando hélio como gás de arraste e vazão de 1 mL/ min.

A identificação dos constituintes dos óleos voláteis da espécie foi realizada por comparação dos espectros de massas, com os bancos de dados do aparelho (NIST, 2005) e da literatura (ADAMS, 2007) e por comparação dos índices de retenção (IR), determinados com base em série homóloga de n-alcanos (C₉-C₂₀) (Fluka[®]) (ADAMS, 2007).

A análise dos componentes voláteis por CG-DIC foi realizada utilizando o mesmo equipamento (HP 5890) e o detector de ionização de chama (DIC), sob as mesmas condições, anteriormente descritas. As porcentagens da composição foram obtidas por meio de integração eletrônica das áreas dos picos da CG sem considerar os fatores relativos de resposta.

3. 7 Avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro*

Os ensaios para a avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (SP), sob a coordenação do pesquisador Dr. André Gustavo Tempone.

3. 7. 1 Parasitas

3. 7. 1. 1 *Leishmania*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) e de *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado, 0,25 % de hemina, sob a temperatura de 24 °C em estufa BOD, sem adição de antibióticos.

3.7.1.2 *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 no meio RPMI-1640, suplementado com 2 % de soro fetal bovino, à temperatura de 37 °C, em estufa com 5% CO₂.

3.7.1.3 Determinação da atividade antiprotozoária *in vitro* e da concentração efetiva 50% (CE₅₀) do óleo volátil

Os óleos voláteis das inflorescências e das folhas de *L. angustifolia* foram solubilizados em metanol, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar as respectivas CE₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou 0,5 % (v/v). A CE₅₀ dos diferentes compostos foi determinada em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e de *L. (L.) amazonensis* que foram aplicadas à concentração de 1 x 10⁶/poço, em placas de 96 poços contendo os óleos voláteis das inflorescências e das folhas, e mantidas por 24 h, em estufa de BOD, a 24 °C. Utilizou-se o meio M-199 suplementado com 10% soro fetal bovino, sem adição de antibióticos. Após o estágio na estufa, a viabilidade das promastigotas foi avaliada pelo ensaio de atividade oxidativa mitocondrial por meio do ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-brometo de 2,5-di-fenoltetrazolio) (TADA et al., 1986). As formas tripomastigotas, extraídas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2, foram aplicadas à concentração de 1x10⁶/poço, em placas de 96 poços contendo os óleos solubilizados no meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) e a viabilidade das formas tripomastigotas foi determinada com auxílio de resazurina (Alamar Blue[®]). A placa foi incubada por mais 48 horas. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax[®] F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 595 nm (MIKUS e STEVERDING, 2000).

3.7.1.4 Análise estatística dos resultados

As determinações efetuadas, na avaliação das atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* foram analisadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* 5.0 (*GraphPad* Software, San Diego, CA, USA), considerando-se a média dos resulta-

dos obtidos em duplicata, os respectivos intervalos de confiança 95% e os coeficientes lineares (r).

4 RESULTADOS

4.1 Perda por dessecação

Os dados referentes à determinação do teor de perda por dessecação, nas inflorescências e nas folhas da espécie *L. angustifolia* foram dispostos na **Tabela 1**.

Os valores médios das perdas por dessecação das inflorescências frescas foi cerca de 6 vezes superior (56,6 %, m/m) àqueles das folhas em forma de droga (8,7%, m/m).

Tabela 1 - Valores das determinações da perda por dessecação (% m/m) de inflorescências e de folhas de *L. angustifolia* Miller

<i>L. angustifolia</i> Mill.				
Órgão vegetal	Amostra	Massa fresca (g)	Massa seca* (g)	Perda por dessecação (% m/m)
Inflorescências (frescas)	1	20,2012	8,7635	56,6
	2	20,2751	8,8119	56,5
				Valor médio
				56,6
Folhas (droga)	1	3,0516	2,7878	8,6
	2	3,1382	2,8642	8,7
				Valor médio
				8,7

*: Massa determinada após estágio em estufa a 105 °C até peso constante (**item 3.4**), **Amostra (1,2)**: Dados das determinações realizadas em duplicata

4.2 Teor de óleo volátil

Os valores das determinações do teor de óleo volátil, nas inflorescências (frescas) e nas folhas (droga) de *L. angustifolia*, encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Valores dos teores de óleo volátil nas inflorescências e nas folhas de *L. angustifolia* Miller

<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.					
Órgão vegetal	Massa do material vegetal (g)	Volume de óleo volátil (mL)	Massa* de óleo volátil (g)	Teor de óleo volátil	
				(%, v/m)	(%, m/m)
Inflorescências	99,82	3,1	2,7418	3,1	2,7
Folhas	228,25	0,6	0,4497	0,3	0,2

*: Massa determinada, Teor de óleo volátil: valores corrigidos.

Os resultados mostraram (**Tabela 2**) que, considerando a mesma base, as inflorescências possuem teor de óleo (2,7 %, m/ m) cerca de 13,5 vezes superior àquele encontrado nas folhas (0,2 %, m/ m) da espécie.

4.3 Perfil cromatográfico do óleo volátil de inflorescências e folhas de *L. angustifolia*, por cromatografia em camada delgada (CCD)

Considerando a análise do óleo volátil das inflorescências e de folhas de *L. angustifolia*, por CCD, o sistema cromatográfico que apresentou melhor separação dos constituintes foi aquele que empregou a fase móvel constituída por tolueno : acetato de etila (95:5 v/ v). (**Figura 31**).

Figura 31 - Cromatograma em CCD dos óleos voláteis das inflorescências (**OVi**) e das folhas (**OVf**) de *L. angustifolia* Mill. [fm: tolueno:acetato de etila (95:5). **Revelação**: reativo anisaldeído sulfúrico. **Padrão**: linalol (**lin**) - Rf: 0,47] (WAGNER; BLADT, 2009)

O perfil cromatográfico tanto do óleo volátil das inflorescências como das folhas apresentou seis manchas principais.

O padrão de linalol correspondeu à mancha forte de cor violeta-acastanhada, com Rf 0,47. Mancha semelhante foi encontrada, no mesmo Rf, no óleo volátil das inflorescências de *L. angustifolia*, evidenciando sua presença no mesmo. Enquanto que, nas mesmas condições cromatográficas, o óleo volátil das folhas apresentou a mesma mancha, referente ao linalol, em intensidade fraca (**Figura 31**).

Nas inflorescências, foi observada a presença de 3 manchas (Rf 0,53, Rf 0,67 e Rf 0,73) com constituintes de maior Rf em relação ao padrão de linalol, correspon-

dendo a compostos de menor polaridade em relação ao mesmo, bem como 2 manchas de constituintes mais polares (R_f menores) (R_f 0,31 e R_f 0,38). Nas folhas, houve coincidência com as manchas apresentadas nas inflorescências de R_f maior em relação ao padrão de linalol e duas manchas, uma de coloração amarela (R_f 0,31) e outra violeta (R_f 0,38), que não ocorreram no perfil das últimas.

4.4 Composição do óleo volátil inflorescências e folhas de *L. angustifolia* por CG-EM e CG-DIC

Os cromatogramas CG-EM do óleo volátil das inflorescências e folhas de *L. angustifolia*, encontram-se nas **Figuras 32 e 33**. Nas **Tabelas 3 e 4** os constituintes dos óleos das inflorescências e das folhas, respectivamente, foram apresentados e numerados em ordem crescente de eluição.

4.4.1 Óleo volátil das Inflorescências

Entre os 22 constituintes identificados (98,2 %) no óleo das inflorescências, verificou-se a presença de cinco compostos majoritários, que corresponderam a cerca de 73 % da composição do óleo das inflorescências de *L. angustifolia*. Foram eles, os monoterpenos oxigenados: linalol (37,5 %), acetato de lavandulila (11,9 %), acetato de linalila (11,8 %), α -terpineol (6,4 %), e o monoterpeno não oxigenado: β -(Z)-ocimeno (5,4 %) (**Tabela 3**) (**Figura 32**).

Figura 32 - *Lavandula angustifolia* Mill. - Cromatograma do óleo volátil das inflorescências, obtido por **CG**, nas condições analíticas descritas no item 3.6.2. [Compostos majoritários: picos: β -(Z)-ocimeno (**7**) (t_R : 9,14 min), linalol (**10**) (t_R : 11,62 min), α -terpineol (**14**) (t_R : 15,20 min), acetato de linalila (**16**) (t_R : 17,96 min), acetato de lavandulila (**17**) (t_R : 19,46 min).

Tabela 3 - Constituintes químicos (%) do óleo volátil das inflorescências de *L. angustifolia* Miller

pico	constituente ^a	tempo de retenção ^a ** (min)	IR ^b	IR ^c	%
1	1-octeno-3-ol	7,20	978	975	0,81
2	3-octenona	7,42	985	983	1,07
3	β-mirceno	7,57	991	989	0,91
4	acetato de hexila	8,26	1008	1010	0,40
5	limoneno	8,84	1031	1026	0,82
6	eucaliptol	8,94	1033	1029	0,34
7	β-(Z)-ocimeno	9,14	1040	1035	5,44
8	β-(E)-ocimeno	9,51	1050	1045	3,04
9	óxido de cis-linalol	10,42	1074	1070	0,33
10	linalol	11,62	1098	1103	37,54
11	3-acetato de 1-octenila	11,94	1110	1111	2,40
12	lavandulol	14,18	1166	1165	2,85
13	4-terpineol	14,61	1177	1175	1,56
14	α-terpineol	15,20	1189	1189	6,39
15	nerol	16,73	1228	1226	0,92
16	acetato de linalila	17,96	1257	1255	11,76
17	acetato de lavandulila	19,46	1289	1290	11,90
18	acetato de nerila	22,48	1365	1362	1,40
19	acetato de geranila	23,30	1383	1382	2,80
20	trans-cariofileno	24,75	1418	1417	3,33
21	óxido de cariofileno	31,19	1581	1580	1,29
22	epi-α-cadinol	33,36	1632	1637	0,94

^a Compostos listados por ordem de eluição, a partir de coluna capilar HP-5MS, e identificados por comparação dos espectros EM com aqueles da biblioteca do aparelho e por comparação dos IR com bibliotecas NIST e Adams (2007)

IR^b: índices de retenção de acordo com RI reportado por Adams (2007) e/ou biblioteca do aparelho

IR^c: índices de retenção determinados em coluna HP-5MS usando série homóloga de alcanos (C₉-C₂₀), calculados de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963)

Os demais constituintes (25,2 %) foram minoritários e apresentaram concentração muito baixa variando de 0,3 a 3,3 %. Dentre os minoritários, 10,2 % são monoterpenos oxigenados, 4,77 % monoterpenos não-oxigenados, 3,3 % sesquiterpenos não-oxigenados, 2,23 % sesquiterpenos oxigenados e 4,68 % hidrocarbonetos oxigenados.

4.4.2 Óleo volátil das folhas

No óleo volátil das folhas de *L. angustifolia* foram identificados 30 constituintes (70,9 %) (**Figura 4 e Tabela 4**).

Figura 33 - *Lavandula angustifolia* Mill. - Cromatograma do óleo volátil das folhas, por **CG**, nas condições analíticas descritas no item 3.6.2. [Compostos majoritários: picos: eucaliptol (6) (t_R : 8,95 min), endo-borneol (12) (t_R : 14,19 min), óxido de carifileno (27) (t_R : 31,27 min), α -cadinol (29) (t_R : 33,45 min).

A **Tabela 4** apresenta os constituintes do óleo volátil das folhas de *L. angustifolia*, dispostos em sequência crescente de eluição.

Tabela 4 - Constituintes químicos (%) do óleo volátil das folhas de *L. angustifolia* Miller.

pico	constituente ^a	tempo de retenção ** (min)	IR ^b	IR ^c	%
1	1-octeno-3-ol	7,2	-	975	1,32
2	3-careno	8,22	1011	1009	0,28
3	o-cimeno	8,61	1022	1020	1,53
4	p-cimeno	8,71	1026	1023	2,95
5	limoneno	8,85	-	1027	1,06
6	eucaliptol	8,95	1033	1029	5,73
7	óxido de cis-linalol	10,41	1074	1070	0,45
8	p-cimeneno	11,04	1089	1087	0,65
9	linalol	11,46	1098	1099	2,4
10	1-octenila-3-acetato	11,91	1110	1110	1,75
11	cânfora	13,25	1143	1142	3,06
12	endo-borneol	14,19	1165	1165	9,76
13	4-terpineol	14,6	1177	1175	0,53
14	α -terpineol	15,18	1189	1189	0,62
15	mirtenol	15,41	1194	1194	0,73
16	cuminaldeído	17,23	1239	1238	2,42
17	carvona	17,39	1242	1241	0,83
18	piperitona	17,83	1252	1252	0,57
19	acetato de bornila	19,17	1285	1283	0,77
20	acetato de lavandulila	19,41	1289	1289	3,08
21	acetato de nerila	22,47	1365	1362	0,3
22	acetato de geranila	23,3	1382	1382	2,37
23	trans-cariofileno	24,76	1418	1417	1,2
24	γ -cadineno	28,56	1513	1511	3,3
25	cis-calameneno	28,87	1521	1520	0,13
26	α -calacoreno	29,66	1542	1540	0,62
27	óxido de cariofileno	31,27	1581	1582	9,9
28	1,10-di-epi-cubenol	32,42	1614	1612	1,68
29	α -cadinol	33,45	1640	1639	9,55
30	3-muroleno-4-ona	35,08	1682	1683	1,34

^a Compostos listados por ordem de eluição, a partir de coluna capilar HP-5MS, e identificados por comparação dos espectros EM com aqueles da biblioteca do aparelho e por comparação dos IR com bibliotecas NIST e Adams (2007)

IR^b: índices de retenção de acordo com RI reportado por Adams (2007) e/ou biblioteca do aparelho

IR^c: índices de retenção determinados em coluna HP-5MS usando série homóloga de alcanos (C₉-C₂₀), calculados de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963)

Entre os compostos majoritários no óleo das folhas, verificou-se a presença dos sesquiterpenos oxigenados óxido de cariofileno (**27**) (9,9 %) e α -cadinol (**29**) (9,5 %), bem como dos monoterpenos oxigenados endo-borneol (**12**) (9,8 %) e de eucaliptol (**6**) (5,7 %).

4.5 Atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* *in vitro* dos óleos voláteis de inflorescências e folhas de *L. angustifolia* Mill.

A **Tabela 5** mostra as concentrações efetivas dos óleos voláteis de inflorescências e folhas de *L. angustifolia* Mill. que causaram a morte de 50% das formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *L.* (*L.*) *amazonensis* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 5 - Concentração efetiva de 50% (**CE₅₀**) (µg/ mL) do óleo volátil de inflorescências e folhas de *L. angustifolia* Mill. frente às formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *infantum* (MHOM/BR/1972/LD) e de *L.* (*L.*) *amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016) e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

Óleo volátil <i>L. angustifolia</i> Mill. (300 µg/ mL)	CE ₅₀ (µg/ mL) (IC 95%)		
	<i>L.</i> (<i>L.</i>) <i>infantum</i> promastigotas	<i>L.</i> (<i>L.</i>) <i>amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i> tripomastigotas
Inflorescências	>100	>100	12,88 (10,49 – 15,81)
Folhas	>100	>100	6,81 (5,527 – 8,401)
Compostos de referência			
linalol	>100	>100	>100
pentamidina	0,22 (0,17 – 0,27)	0,16 (0,15 – 0,16)	-
benzonidazol	-	-	45,02 (29,31 - 68,42)

CE₅₀: concentração efetiva de 50%; **IC 95%**: intervalo de confiança de 95%; **Substância de referência** (concentração teste): 100 µg/mL.

O óleo volátil das inflorescências e folhas de *L. angustifolia* foi inativo frente às espécies de *Leishmania* testadas (**CE₅₀** > 100 µg/ mL), bem como o linalol, marcador químico da espécie (**Tabela 5**).

Frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, ambos os óleos apresentaram atividade. O óleo volátil das folhas foi, aproximadamente, duas vezes mais ativo (**CE₅₀**: 6,81 µg/ mL) do que o óleo obtido das inflorescências. Ambos os óleos apresentaram nível de atividade superior ao do benzonidazol, composto de referência como

agente anti-*Trypanosoma*. Os óleos das inflorescências e das folhas foram, respectivamente, cerca de 3,5 e 6,6 vezes mais ativos que o benzonidazol.

5 DISCUSSÃO

A análise do óleo volátil de *L. angustifolia* mostrou a presença de maior teor de óleo volátil nas inflorescências do que nas folhas. O rendimento das inflorescências chegou a ser 13,5 vezes superior às folhas. Tal resultado já era esperado, uma vez que, apesar de ambos os órgãos possuírem estruturas secretoras exógenas, isto é, tricomas glandulares típicos da família Lamiaceae (IRITI et al., 2006), elas ocorrem em maior número nas inflorescências, respondendo pela sua exploração comercial. Adicionalmente, qualitativamente, o odor do óleo destas últimas é mais agradável do que aquele das folhas.

Conforme abordado, anteriormente, os valores de teores de óleo volátil, bem como sua composição, variam segundo os mais diversos fatores, como o edáfico-climático, a variedade selecionada e as etapas de coleta e de processamento do vegetal, entre outros (TOURABBEIGI; AZAR, 2013; SANTANA et al., 2014; ZHEL-JAZKOV et al., 2012; HASSANPOURAGHDAM et al., 2011; BAKKALI et al., 2008; IRTI et al., 2006).

A produção de terpenóides é significativamente impactada pela genética da planta e pelos fatores ambientais como a temperatura (WORONUK et al., 2011). Diferentes autores relataram o teor em óleo obtido a partir desta espécie e obtiveram valores bastante variáveis (1,5 a 7,6 %) (MAIETTI et al., 2013; DANH et al., 2013; RAINA; NEGI, 2012; HASSANPOURAGHDAM et al., 2011; VERMA et al., 2010; AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006; IRTI et al., 2006). Isto pode ser atribuído, justamente, à diversidade de condições envolvidas na produção pela planta e na obtenção do óleo. Entretanto, as Farmacopéias Européia (2011) e Britânica (2010) estabelecem o teor mínimo de óleo das inflorescências na forma de droga, sendo de 1,3 % (v/ m). Considerando este parâmetro, o cultivar analisado estaria de acordo com estas especificações e dentro do esperado, entre alguns dos autores.

Deve-se ressaltar que, o óleo das inflorescências foi obtido, assim que o exemplar chegou ao laboratório, após o transporte aéreo realizado, sob refrigeração, desde o ponto de coleta (EPAGRE de São Joaquim, SC) até o laboratório, visando garantir a reprodutibilidade e fidedignidade dos resultados. Entretanto, as folhas foram conservadas, por secagem à sombra. As diferenças de procedimentos não interferiram na análise, uma vez que os dados obtidos reportaram-se, devidamente, à base seca do material vegetal.

Com relação ao processo de obtenção do óleo, a hidrodestilação é o mais comumente utilizado, devido à fácil operação, baixo custo e boa qualidade. Entretanto, deve-se considerar que, pelo fato de o material vegetal permanecer por longo tempo, sob altas temperaturas, durante o processo de extração, alguns compostos termossensíveis podem ser alterados ou degradados (YU et al., 2013; ZHELJAZKOV et al., 2013).

O nível do teor das folhas foi reduzido, não somente, em relação às inflorescências, mas também, quando comparado àquele verificado por HAJHASHEMI et al (2003), em espécimes do Irã (1,1%).

A análise dos constituintes identificados (98,2%) no óleo volátil das inflorescências mostrou que, a maioria deles é constituída de monoterpenos (88,0 %), sendo o restante composto de sesquiterpenos (5,6 %) e de hidrocarbonetos oxigenados (4,7 %). Além disto, entre os monoterpenos encontrados, em sua maioria (77,8 %) são representados por compostos oxigenados. Enquanto que, entre os sesquiterpenos, predominaram os não oxigenados (3,3 %).

Perfil similar, com predominância de monoterpenos na faixa de 85,5 % a 91,5 % no óleo foi encontrado nas inflorescências na mesma espécie por vários autores (HASSANPOURAGHDAM et al., 2011; RAINA; NEGI, 2012; MAIETTI et al., 2013; IRITI et al., 2006; AFSHARYPUOR; AZARBAYEJANY, 2006).

Nas inflorescências de *L. angustifolia*, os principais compostos majoritários encontrados foram os monoterpenos linalol, acetato de lavandulila, acetato de linalila, α -terpineol e β -(Z)-ocimeno, confirmando o perfil de predominância dos monoterpenos, nesta espécie e no gênero.

É interessante notar que o conteúdo de linalol tem sido considerado um dos parâmetros de qualidade do óleo de lavanda utilizados nas indústrias de aromatizantes e de fragrância (HASSANPOURAGHDAM, 2011). Nas inflorescências, o teor de linalol, o constituinte majoritário, atingiu valor alto de 37,5%.

O linalol é um composto muito frequente nas espécies *L. angustifolia*, *L. latifolia* x *L. angustifolia* e *Lavandula latifolia*, sendo considerado um dos seus marcadores, juntamente, com acetato de linalila, cariofileno e óxido de cariofileno, *cis*- e *trans*-ocimeno e cânfora (HARBORNE; WILLIAMS, 2002). É sabido que o óleo de lavanda, de boa qualidade, contém altas proporções de acetato de linalila e de linalol e uma pequena proporção de cânfora (PORTO; DECORTI, 2008).

No caso do óleo volátil das folhas de *L. angustifolia*, verificou-se a presença de maior número de constituintes (30) em relação àquele das inflorescências (22), porém, a maioria em concentrações baixas. E, em contraste ao perfil esperado para os terpenos, a maior concentração de constituintes foi do sesquiterpênico, o óxido de cariofileno (27).

Considerando, os teores de limoneno, eucaliptol, linalol, cânfora, 4-terpineol, lavandulol e acetato de lavandulila o óleo das inflorescências atenderam os limites estabelecidos pela FARMACOPEIA Européia (2011).

A maioria dos monoterpenos encontrados, neste trabalho, no óleo das folhas, foi oxigenada (33,6 %), à semelhança do óleo das inflorescências. O predomínio de compostos monoterpenóides sobre os sesquiterpenóides confirmou o perfil do gênero e da própria espécie (HASSANPOURAGHDAM et al., SHAFAGHAT et al., 2012).

Adicionalmente, notou-se que os constituintes majoritários do óleo dos dois órgãos vegetais não foram coincidentes, assim como, nem todos estes estavam presentes na composição dos dois. Desta forma, os acetatos de linalila e de lavandulila, bem como o β -Z- ocimeno, presentes no óleo das inflorescências, não foram encontrados no óleo das folhas. E, inversamente, o endo-borneol e o α -cadinol presentes no óleo das folhas não foram constituintes daquele das inflorescências.

No caso dos compostos que foram majoritários no óleo de um dos órgãos, no outro, ocorreu em baixíssima concentração, como foi observado, para o marcador linalol e o α - terpineol que apresentaram teores de: 37,5; 2,4 e de 6,4; 0,62 %, respectivamente, no óleo das inflorescências e das folhas.

E, considerando os compostos majoritários do óleo volátil das folhas, constatou-se a sua ocorrência em baixos teores naquele das inflorescências, como foi verificado para eucaliptol (0,34 %) e óxido de cariofileno (1,29 %).

O perfil cromatográfico, obtido por CCD, também conhecido por “fingerprint”, é importante ferramenta de análise de compostos de origem vegetal e de sua caracterização, sendo recomendado pela legislação Brasileira, no registro de fitoterápicos (BRASIL, 2014), para controle de qualidade. No caso da lavanda, o cromatograma permitiu a separação dos constituintes principais, possibilitando reconhecer as principais manchas do óleo. O perfil foi compatível com aquele da CG, para o linalol, uma vez que a mancha correspondente ao marcador no cromatograma, por CCD, foi de menor intensidade na folha do que na inflorescência, estando de acordo com a

baixa concentração (2,4 %) verificada na análise por CG-EM em comparação com aquele das inflorescências (37,54 %).

No tocante à atividade anti-*Leishmania*, ambos os óleos foram inativos, frente às formas promastigotas das duas espécies testadas. A mesma espécie, igualmente, mostrou inativa frente a *L. donovani* (ZHELJAZKOV et al., 2012).

Entretanto, a atividade frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, mostrou-se promissora, tendo ambos os óleos apresentado CE_{50} inferior ao benzonidazol, testado sob as mesmas condições, sendo que o mais ativo foi o óleo das folhas de *L. angustifolia* (CE_{50} : 6,8 µg/ mL). Os constituintes oxigenados presentes em maioria podem ter respondido pela atividade anti-*T. cruzi* verificada.

Alguns dos constituintes oxigenados, presentes nos óleos testados, demonstraram atividade tripanocida, como o sesquiterpeno óxido de cariofileno (NIBRET; WINK, 2010), que foi o componente majoritário do óleo das folhas, seguido de outro sesquiterpeno majoritário, o α -cadinol. A ocorrência destes compostos pode ter respondido pela atividade do óleo das folhas de *L. angustifolia*.

Somam-se a eles os monoterpenos oxigenados, como eucaliptol e endoborneol, igualmente presentes no óleo das folhas entre os seus constituintes majoritários. Alguns monoterpenos oxigenados demonstraram, igualmente, ação tripanocida, como o 4-terpineol tendo levado à morte formas sanguíneas de *T. brucei* (MIKUS et al., 2000a).

Possivelmente, o sinergismo entre mono e sesquiterpenos oxigenados, favoreceu a atividade tripanocida maior do óleo das folhas.

A obtenção dos principais constituintes destes óleos e a realização de novos testes, frente ao diferentes protozoários, serão importantes na pesquisa dos constituintes bioativos, com posterior estudo do seu mecanismo de ação tripanocida.

A avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, representa estudo inédito para a presente espécie.

6 CONCLUSÕES

6. 1 Os óleos voláteis de inflorescências e folhas de *Lavandula angustifolia* Mill. mostraram predominância de compostos monoterpênicos seguidos de sesquiterpênicos, estando em acordo com o perfil de constituintes do gênero e da espécie.
6. 2 Tanto no óleo volátil das folhas, quanto naquele das inflorescências, os teores de compostos oxigenados é superior àquele dos não-oxigenados.
6. 3 O monoterpreno oxigenado linalol, considerado o marcador químico de *L. angustifolia*, é o constituinte majoritário (37,5 %) do óleo volátil das inflorescências.
6. 4 O sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno é o constituinte majoritário (9,9%) do óleo volátil das folhas de *L. angustifolia*.
6. 5 Nem todo composto majoritário do óleo volátil de folhas de *Lavandula angustifolia* Mill. encontra-se na composição do óleo das inflorescências e vice-versa.
6. 6 Os óleos voláteis das folhas e das inflorescências de *Lavandula angustifolia* Mill. não são ativos frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*.
6. 7 Os óleos voláteis de folhas e de inflorescências de *Lavandula angustifolia* Mill. apresentam promissora atividade anti-*T. cruzi*, frente às formas tripomastigotas do parasita, sendo o óleo das folhas mais ativo do que aquele das inflorescências.
6. 8 Os óleos voláteis das folhas e das inflorescências de *Lavandula angustifolia* Mill. foram mais ativos que o benzonidazol.
6. 9 A avaliação da atividade anti-*T. cruzi* do óleo volátil da espécie é inédita, também para o gênero *Lavandula*, constituindo campo aberto à investigação.
- 6.10 A avaliação da atividade antiprotozoária do óleo volátil das inflorescências e das folhas de *Lavandula angustifolia*, frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, é inédita.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SATTAR, E.; MAES, L.; SALAMA, M. In vitro activities of plants extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1322-1328, 2010.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Anti-fungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739–1745, 1998.

ADSERSEN, A.; GAUGUIN, B.; GUDIKSEN, L.; JÄGER, A. K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p.418-22, 2006.

AFSHARYPUOR, S.; AZARBAYEJANY, N. Chemical constituents of the flower essential oil *Lavandula officinalis* Chaix. from Isfaham (Iran). **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 169-172, 2006.

ALBORZI, A. et al. First molecular-based detection of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Iran. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 5, p. 413-416, 2013.

AL-MUSAYEIB, N.M.; MOTHANA, R. A.; MATHEEUSSEN, A.; COS, P.; MAES, L. **In vitro** antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 49, p. 1-7, 2012.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F.: .On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-Colombian historical sources. **História, Ciências, Saúde**, vol. 10, n. 3, p. 853-82, 2003.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; AMATO NETO, V.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, p. 1-9, 2008.

ARAÚJO, C.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, M.F.; LEÃO, C.; Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p.625-32, 2003.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 1268-1281, 2000.

AZADMEHR, A. A.; HAJIAGHAEI, R. B.; REZAZADEH, S. B.; AFSHARI, A.C.; KIANI AMIN, M. C.; BARADARAN, B. D.; EBRAHIMI, P. A. Evaluation of *Lavandula officinalis* extract on lymphocyte proliferation and tumor necrosis factor-alpha production. **Journal of Medicinal Plants**, v. 10, n. 38, p. 142-147, 2011.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 203-211, 2007.

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.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARRET, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BASCH, E. M. et al. Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 4, n. 2, p. 63-78, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 203-211, 2007.

BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BEHNIA, M.; HAGHIGHI, A.; KOMEYLIZADEH, H.; TABAEI, S. J. S.; ABADI, A. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. **The Korean journal of parasitology**, v. 46, n. 3, p. 153-156, 2008.

BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONA, C. M. De; MASETTO, M. A. M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. Rooting induction of different *Lavandula angustifolia* accessions by auxin application. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 175-182, 2012.

BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1269-1275, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas Aguda: Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf. Acesso em: 29 agosto 2012.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina**. Nota Técnica. Brasília, DF, 2005. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/240305_nota.pdf>. Acesso em: 22 de junho 2014.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª edição, 3ª reimpressão. Brasília, DF, 2006a. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai.pdf >. Acesso em: 13 junho 2014.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana – Diagnóstico clínico e diferencial**. 1ª edição. Brasília, DF, 2006b. Disponível em:< http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf>. Acesso em: 21 junho 2014.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral – Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, DF, 2011b.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. 3. impressão. Brasília, DF, 2013. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf>. Acesso em: 12 de junho 2014.

BRASIL. Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Dispõe da guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 jun. 2014. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbbf8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 18 ago. 2014.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: The Stationary Office, 2010.

BUDZYŃSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL M.; SADOWSKA B.; KALEMBA, D.; RÓZALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 35-41, 2011.

BURROWS, J. N. The role of modern drug discovery in the fight against neglected and tropical diseases. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 5, p. 688-700, 2014.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **The Lancet**, v. 9, p. 533-542, 2010.

CARVALHO, G. M. L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; LIMA, A. C. V. M. R.; GONTIJO, C. M. F. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n. 3, 2008.

CDC, 2014. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em 15 junho de 2014.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, p. 5-13, 2010.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

D'AURIA, F. D. et al. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, v. 43, p. 391-396, 2005.

DANH, L. T. et al., Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO₂, hexane e hidrodestilação. **Food Bioprocess Technologies**, v. 6, p. 3481-3489, 2013.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DEHKORDI, Z. R.; BAHARANCHI, F. S. H.; BEKHRADI, R. Effect of lavender inhalation on the symptoms of primary dysmenorrhea and the amount of menstrual bleeding: a randomized clinical trial. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22, p. 212-219, 2014.

DELL'AGLI, M. et al., Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essentials oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. **Malaria Journal**, v. 11, n. 219, p. 1-10, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative. **Immunology Microbiology and Infection Disease**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, L. D.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4313-8, 2009.

EUROPEAN Pharmacopoeia 2011. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

EVANDRI, M. G. et al. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1381-1387, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira 5ª edição. Brasília: ANVISA, 2010.

FERRER, J. L.; AUSTIN, M. B.; STEWART Jr, C.; NOEL, J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 356-370, 2008.

FOKIALAKIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; TEKWANI, B. L.; KHAN, S. I.; KOBASISY, M.; SKALTSOUNIS, A. L.; DUKE, S. O. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. **Journal of Natural Medicine**, v. 61, p. 38-45, 2007.

GASCON, J.; VILASANJUAN, R.; LUCAS, A. The needs for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 4, p. 393-395, 2014.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.

GONTIJO, C. M. F. ; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. de L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67-71, 2003.

HAN, S.-H. et al. Effect of aromatherapy on symptoms of dysmenorrhea in college students: a randomized placebo-controlled clinical trial. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 12, n. 6, p. 535-541, 2006.

HANCIANU, M.; CIOANCA, O.; MIHASAN, M.; HRITCU, L. Neuroprotective effects of inhaled lavender oil on scopolamine-induced demetia via anti-oxidative activities in rats. **Phytomedicine**, v. 20, p. 446-452, 2013.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Phytochemistry of the genus *Lavandula*. **Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles**, v. 29, p. 86-99, 2002.

HASSANPOURAGHDAM, M. B.; HASSANI, A.; VOJODI, L.; ASL,, B. H.; ROSTAMI, A. Essential oil constituents of *Lavandula officinalis* Chaix. from northwest Iran. **Chemija**, v. 22, n. 3, p. 167-171, 2011.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, p. 363-370, 2000.

HERWALDT, B. Leishmaniasis. **The Lancet**, v 354, p. 1191-1199, 1999.

IRITI, M. histo-citochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 21, p. 704-712, 2006.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 339-445, 2006.

KHALIL, A. M.; ASHY, M. A., EL-TAWIL, B.A.H.; TAWFIQ, N. I. Constituents of local plants Part 5: the coumarin and triterpenoid constituents of *Lavandula dentada*. **Pharmazie**, v. 34, p. 564, 1979.

KIM, H. M.; CHO, S. H. Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 221-226, 1999.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 693-708, 1994.

LADAN, Z. et al., Chemical composition and biological activity of the volatile oils of *Hyptis spicigera* against *Trypanosoma brucei brucei*, (Tbb) found in Northern Nigeria. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 53-58, 2011.

LANDMANN, C. et al. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, p. 417-429, 2007.

LANFRANCHI, D. A. et al. Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2174-2179, 2010.

LAWRENCE, B. M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. **Advances in Labiate Science**, p. 399–436, 1992.

LEE, W. C. et al., Free radicals scavenging activity, cytotoxicity and anti-parasitic activity of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 1, p. 32-38, 2013.

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 556-570, 2010.

LEUNG, Albert Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics**. 2.ed. United States of America, 1996. p. 339-342.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 183-187, 1997.

_____. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 540-542, 1999.

LOPES, N. P. et al. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p.313-319, 1999.

LOUP, G. L.; PIALOUX, G.; LESCURE, F. X. Update in treatment of Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, p. 428-434, 2011.

MACHADO, M.; SANTORO, G.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 156-160, 2010a.

MACHADO, M.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Revista de Fitoterapia**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2010b.

MACHADO, M. P. et al. Enraizamento de microestacas de *Lavandula angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 767-772, 2011a.

MACHADO, M. et al. Anti-*Giardia* activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 732-739, 2011b.

MACHADO, F. S. et al. Chagas Heart Disease: report on recent developments. *Cardiology Reviews*, v. 20, n. 2, p. 53-65, 2012.

MACHADO, M. et al. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineol e borneol against *Leishmania* species. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 39-49, 2014.

MAIETTI, S. et al. A multivariate analysis approach to the study of chemical and chemical and functional properties of chemodiverse plant derivatives: lavender essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, p. 144-154, 2013.

MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MATSUMOTO, T.; ASAKURA, H.; HAYASHI, T. Does lavender aromatherapy alleviate pré-menstrual emotional symptoms?: a randomized crossover trial. **Biopsychosocial Medicine**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2013.

MEINECKE, C.; SCHOTTLEIUS, J.; OSKAM, L. FLEISHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, p. 1-5, 1999.

MENEZES, C.; COSTA, G. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Development Research**, v. 72, p. 471-479, 2011.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, v. 66, p. 366-368, 2000a.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for Old World cutaneous leishmaniasis and New World cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, p. 1889-1920, 2013.

MONZOTE, L.; ALARCÓN, O.; SETZER, W. N. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 77, n. 4, p. 167-175, 2012.

MONZOTE, L.; PASTOR, J.; SCULL, R.; GILLE, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1048-1052, 2014.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H.M. Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. **Parasitology Research**, v. 99, n. 6, p.722-8, 2006.

MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-11, 2014.

MOREIRA, R. A. et al. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3021-3028, 2014.

MOSKOWITZ, P. F.; KURBAN, A. K. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 305-315, 1999.

MOSS, M.; COOK J, WESNES K, DUCKETT P. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. **International Journal of Neuroscience**, v. 113, n. 1, p.15-38, 2003.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Report**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NIBRET, E.; WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. **Phytomedicine**, v. 17, p. 911-920, 2010.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 26, p. 1-23, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA Jr, A. S. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, F.; JOCHIM, R. C.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitology International**, v. 58, p. 1-5, 2009.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, p. 87-96, 2011.

PÉREZ, S.; RAMOS-LÓPEZ, M. A.; SÁNCHEZ-MIRANDA, E.; FRESÁN-OROZCO, M. C.; PÉREZ-RAMOS, J. Antiprotozoa activity of some essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 2901-2908, 2012.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PILLAI, S.; MAHMUD, R.; LEE, W. C.; PERUMAL, S. Anti-parasitic activity of *Myristica fragrans* Houtt. essential oil against *Toxoplasma gondii* parasite. **APCBEE Proceedings**, v. 2, p. 92-96, 2012.

PLOEG, E. S. van der; EPPINGSTALL, B.; O'CONNOR, D. W. The study protocol of a blinded randomized-controlled cross-over trial of lavender oil as a treatment of behavioural symptoms in dementia. **BMC Geriatrics**, v. 10, n. 49, p. 1-5, 2010.

PORTER, N. G.; SHAW, M. L.; HURNDELL, L. C. Preliminary studies of lavender as an essential oil crop for New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 25, p. 389-394, 1982.

PORTO, C. da.; DECORTI, D. Analysis of the volatile compounds of flowers and essential oils from *Lavandula angustifolia* cultivated in northeastern Italy by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Planta Med**, v. 74, p. 182-187, 2008.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 37, p. 221-229, 2004.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet**, v. 1, p. 92-100, 2001.

RAINA, A. P.; NEGI, K. S. Comparative Essential Oil Composition of *Lavendula* species from India. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 18, p. 268–273, 2012.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN Neto, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613. 2001.

SAITO, N.; HARBORNE, J. B. Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the *Labiatae*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3009-3015, 1992.

SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E., PÁEZ, J. A. Chagas disease: progress and new perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 423-452, 2010.

SANTANA, O. et al., Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). **Grasas y Aceites**, v. 63, n. 3, p. 214-222, 2012.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MENDNONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007a.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, p. 1649-1656, 2007b.

SARTORELLI, P.; SANTANA, J. S.; GUADAGNIN, R. C.; LAGO, J. H. G. *In vitro* trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 743-747, 2012.

SHAFAGHAT, A.; SALIMI, F.; AMANI-HOOSHYAR, V. A. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 63, n.3, p. 455-460, 2012.

SHIN, S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389-93, 2003.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. **Molecules**, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SOLTANI, R. et al., Evaluation of the effect of aromatherapy with lavender essential oil on post-tonsillectomy pain in pediatric patients: a randomized controlled trial. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, p. 1579-1581, 2013.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 196-202, 2003.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, n.2, p. 157-165, 1986.

TALBAOUI, A. et al., Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 33, p. 4593-4600, 2012.

TANKEU, S. Y.; VERMAAK, I.; KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Vibrational spectroscopy and chemometric modeling: na economical and robust quality control method for lavender oil. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 234-240, 2014.

TOURABBEIGI, M.; AZAR, P. A. Analysis of essential oil compositions of *Lavandula angustifolia* by HS-SPME and MA-HS-SPME followed by GC and GC-MS. **Acta Chromatographica**, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2013.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. **Food Research International**, v. 46, p. 341-353, 2012.

UPSON, T. M. et al. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 991-1007, 2000.

VERMA, R. S. et al. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. Cultivated in the mild hills of Uttarakhand, India. **Journal of the Serbian Chemical Society, Serbia**, v. 75, n. 3, p. 343-348, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Germany: Springer, 2009.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 1245-1263, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. **Report**. Geneva, 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s7916e/s7916e.pdf>. Acesso em: 12 Jan. 2012.

_____. Control of leishmaniasis. **Report**. Geneva, 2010a. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 28 Aug. 2012.

_____. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Report**. Geneva, 2010b. Disponível em:

http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 8 Jan. 2013.

_____. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Report**. Geneva, 2012a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>. Acesso em: 28 Aug. 2012.

_____. Global Health Observatory Map Gallery. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012c. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png. Acesso em: 13 Jun. 2014.

_____. Global Health Observatory Map Gallery. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012d. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png. Acesso em: 13 Jun. 2014.

_____. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **Report**. Geneva, 2012e. Disponível em: http://www.who.int/tdr/publications/research_priorities/en/. Acesso em: 09 Jun. 2014.

_____. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. **Report**. Geneva, 2013. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/. Acesso em: 09 Jun. 2014.

WHO, 2014a. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en/>. Acesso em 10 junho de 2014.

WHO, 2014b. Disponível em http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/who_028698.jpg?ua=1. Acesso em 10 junho de 2014.

WHO, 2014c. Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/index2.html. Acesso em 08 junho de 2014.

WORONUK, G.; DEMISSIE, Z. RHEAULT, M. MAHMOUD, S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. **Planta Medica**, v. 77, p. 7-15, 2011.

YAP, P. S. X.; LIM, S. H. E.; HU, C. P.; YIAP, B. C. Combination of essential oils and antibiotic reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. **Phytomedicine**, v. 20, p. 710-713, 2013.

YAP, P. S. X. et al., Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1119-1128, 2014.

YU, S.; XIE, X.; LI, S.; LI, W. Optimization of ultrasonic enhanced salt-containing hydrodistillation by response surface methodology. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, n. 5, p. 801-809, 2013.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T.; HRISTOV, A. N. Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 222-228, 2012.

ZHELJAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; JELIAZKOVA, E. Distillation time effect on lavender oil yield and composition. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 4, p. 195-199, 2013.