

SABRINA DE OLIVEIRA EMERICK

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E
ANTILEISHMANIAL DE EXTRATO DE *Bixa orellana* (Bixaceae) CONTRA
*Leishmania braziliensis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva

Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2023

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

E53a
2023

Emerick, Sabrina de Oliveira, 1985-

Avaliação *in vitro* de atividades citotóxica, antioxidante e antileishmanial de extrato de *Bixa orellana* (Bixaceae) contra *Leishmania braziliensis* / Sabrina de Oliveira Emerick. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 44-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.052>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Bixa orellana* - Uso terapêutico. 2. Antioxidantes.
3. Radicais livres (Química). I. Silva, Eduardo de Almeida
Marques da, 1970-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 615.32368

SABRINA DE OLIVEIRA EMERICK

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E
ANTILEISHMANIAL DE EXTRATO DE *Bixa orellana* (Bixaceae) CONTRA
*Leishmania braziliensis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
SABRINA DE OLIVEIRA EMERICK
Data: 16/02/2024 07:27:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sabrina de Oliveira Emerick
Autor



Documento assinado digitalmente
EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA
Data: 16/02/2024 09:14:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eduardo de Almeida Marques da Silva
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai fiel e amoroso, pela caminhada, fé, sustento e onipresente companhia!

Aos meus amados pais Elcio e Celma, pela força, orações, ensinamentos e presença constante e carinhosa!

Aos meus irmãos amados Elciana, Tatiana e Raphael e meus primos Ruslan e Talita. A travessia é melhor com vocês.

Aos meus sobrinhos Fabrícia e Pedro por deixarem minha vida mais alegre.

Ao Eduardo, meu orientador, amigo e grande incentivador. Fundamental no meu processo de crescimento profissional e quem, muitas vezes, me ensinou a olhar para a parte cheia do copo. Agradeço imensamente a confiança, motivação, ensinamentos, amizade e acolhimento!

À Reggiani, minha coorientadora, e a Mariárurea por toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório Profitus, pela parceria e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela imensa oportunidade de formação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM da UFV.

À professora Juliana Fietto pelo consentimento para a utilização do laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos. Muito obrigada!

Aos professores convidados para compor a banca, que se disponibilizaram a participar e contribuir com o trabalho. Muito obrigado!

Aos professores da Pós-graduação, em especial àqueles que participaram do meu processo de formação.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia, em especial Ingrid e Vagner, pela amizade e companheirismo nas horas boas e difíceis. Vocês foram essenciais! Muito obrigada por tudo!

Aos queridos parceiros do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, pela acolhida, confiança, troca de experiências e tão agradável convivência.

À Beth, secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, sempre tão solícita em nos atender.

À Emília, por partilhar sua sabedoria, amizade e por todo especial acolhimento e incentivos em momentos tão difíceis.

Aos amigos que Viçosa e a UFV me presentearam.

Aos amigos e familiares que mesmo longe se fazem presentes em minha caminhada.

Aos meus poetas das palavras ditas ou cantadas por dar-me a leveza de suas companhias!

*“Digo: o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”.*

|João Guimarães Rosa; Grande Sertão: Veredas|

Resistir foi preciso.

RESUMO

EMERICK, Sabrina de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação *in vitro* de atividades citotóxica, antioxidante e antileishmanial do extrato de *Bixa orellana* (Bixaceae) contra *Leishmania braziliensis*.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves.

As propriedades farmacológicas de *Bixa orellana*, comumente conhecida como urucum, são investigadas e descritas na literatura e seu potencial terapêutico como cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, dentre outros, é explorado. O presente trabalho avaliou, *in vitro*, as atividades citotóxica, antioxidante e antileishmanial do extrato de *B. orellana*, como perspectiva de potencial uso terapêutico contra lesões de Leishmaniose Cutânea (LC), uma enfermidade dermatológica de grande ocorrência no mundo e associada a estigma social. O extrato de *B. orellana* foi avaliado em ensaios de citotoxicidade de macrófagos RAW 264.7, ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH· e atividade antileishmanial contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Foi avaliada, ainda, a produção de NO, TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e tratados com o extrato. O extrato na concentração de 0,25% e usado em tratamento por 24 horas apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos e foi capaz de reduzir em aproximadamente 60% a carga parasitária nessas células, no entanto não apresentou atividade antileishmanial contra formas promastigotas do parasito. Na concentração de 0,25%, o extrato também apresentou atividade antioxidante capaz de inibir em torno de 60% o radical livre DPPH·. Os resultados sugerem que a redução da infecção *in vitro* por *L. braziliensis* possa estar relacionada a um efeito citotóxico do extrato sobre macrófagos e, ou ação direta sobre as formas amastigotas intracelulares e não pela ativação de vias microbicidas dos macrófagos. Essa hipótese é suportada uma vez que não foi detectada produção de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e de ter ocorrido produção não significativa da citocina TNF- α por estas células. O extrato de *B. orellana* avaliado demonstrou potencial terapêutico *in vitro* que nos leva propor avaliar em modelo de infecção *in vivo* por *L. braziliensis* como terapia única ou associada com o tratamento padrão contra LC.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, Leishmaniose Cutânea, DPPH, Antileishmanial

ABSTRACT

EMERICK, Sabrina de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. ***In vitro* evaluation of the cytotoxic, antioxidant and antileishmanial activity of *Bixa orellana* extract (Bixaceae) against *Leishmania braziliensis*.** Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Co-adviser: Reggiani Vilela Gonçalves.

The pharmacological properties of *Bixa orellana*, commonly known as annatto, have been investigated and its therapeutic potential as wound healing, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal, and antiparasitic, among others, has been explored. The present work evaluated, *in vitro*, the cytotoxic, antioxidant, and antileishmanial activity of the extract of *B. orellana* as a perspective of potential therapeutic use against lesions of Cutaneous Leishmaniasis (CL), a dermatological disease of great occurrence in the world and associated with a social stigma. *B. orellana* extract was evaluated in RAW 264.7 macrophage cytotoxicity assay, DPPH· free radical scavenging activity assay, and antileishmanial activity against promastigotes and amastigotes intracellular strains of *Leishmania braziliensis*. In addition, the production of NO, TNF- α , and IL-10 in the culture supernatant of infected macrophages treated with the extract was also evaluated. The extract at a concentration of 0.25% used in treatment for 24 hours showed low cytotoxicity in macrophages and was able to reduce the parasite load in these cells by approximately 60%. However, it did not show antileishmanial activity against promastigote forms of the parasite. At a concentration of 0.25%, the extract also showed antioxidant activity capable of inhibiting around 60% of the DPPH· free radical. The results suggest that the reduction *in vitro* infection by *L. braziliensis* may be related to a cytotoxic effect of the extract on macrophages and, or direct action on intracellular amastigotes. This hypothesis is supported since NO production was not detected in the culture supernatant of infected macrophages and there was a non-significant production of the cytokine TNF- α by these cells. Thus, the evaluated extract of *B. orellana* demonstrated *in vitro* therapeutic potential, which leads us to propose evaluating it in a model of *in vivo* infection by *L. braziliensis* as therapy alone or associated with the standard treatment against CL.

Keywords: *Bixa orellana*, Cutaneous Leishmaniasis, DPPH, Antileishmanial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Bixa orellana</i>	16
Figura 2. Fenótipos clínicos das formas tegumentares das leishmanioses	18
Figura 3. Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>B. orellana</i> em macrófagos RAW 264.7.....	32
Figura 4. Avaliação da citotoxicidade de DMSO em macrófagos RAW 264.7	33
Figura 5. Atividade antioxidante do extrato de <i>B. orellana</i>	34
Figura 6. Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>B. orellana</i> em promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	35
Figura 7. Avaliação do extrato de <i>B. orellana</i> na infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i>	36
Figura 8. Produção de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 infectador com <i>L. braziliensis</i> .	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Opções de tratamento da Leishmaniose Cutânea Localizada em pacientes infectados por *L. braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis* 22
- Tabela 2.** Viabilidade de Macrófagos RAW 264.7 tratados com extrato de *B. orellana* 33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHT	2,6 Di-tert-butil-4-metilfenol.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPPH	radical 2-2-Difenil-1-picrilhidrazil.
IFN- γ	Interferon-gama.
IL-10	Interleucina-10.
IL-12	Interleucina-12.
IL-13	Interleucina-13.
IL-1 α	Interleucina-1 alfa.
IL-1 β	Interleucina-1 beta.
IL-4	Interleucina-4.
IL-6	Interleucina-6.
LC	Leishmaniose Cutânea.
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa.
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada.
LMC	Leishmaniose Mucocutânea.
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano.
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio Brometo.
NO	Óxido Nítrico.
OMS	Organização Mundial de Saúde.

OPAS Organização Pan Americana de Saúde.

PBS Salina Tamponada com Fosfato.

RNS Espécies Reativas de Nitrogênio.

ROS Espécies Reativas de Oxigênio.

SFB Soro Fetal Bovino.

SUS Sistema Único de Saúde.

TGF- β Fator de Transformação do Crescimento-beta.

TNF- α Fator de Necrose Tumoral-Alfa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 <i>Bixa orellana</i>	16
2.2 <i>Leishmania</i> : morfologia, ciclo biológico e diversidade	17
2.3 Leishmaniose cutânea: forma clínica, epidemiologia e tratamento.....	19
2.4 Resposta imune na LC	23
2.5 Estresse oxidativo na LC	24
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Cultivo de macrófagos	27
4.2 Cultivo de parasitos	27
4.3 Extrato de <i>B. orellana</i>	27
4.4 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7	28
4.5 Atividade sequestradora do radical 2-2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·)	28
4.6 Atividade antileishmanial do extrato de <i>B. orellana</i> contra formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	29
4.7 Avaliação <i>in vitro</i> da carga parasitária de macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>	29
4.8 Dosagem de óxido nítrico	30
4.9 Dosagem das citocinas TNF- α e IL-10	30
4.10 Análise estatística	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7	32
5.2 Atividade antioxidante do extrato de <i>B. orellana</i>	34
5.3 Viabilidade celular de promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	35
5.4 Avaliação do efeito citoprotetor do extrato de <i>B. orellana</i> na carga parasitária de infecção <i>in vitro</i> por <i>L. braziliensis</i>	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	42

8. PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma prática milenar empregada desde os primórdios pela humanidade. Especialmente após a Segunda Guerra Mundial, avanços nos estudos de biossíntese de produtos naturais têm possibilitado a busca e a utilização de plantas e seus derivados como agentes terapêuticos no tratamento de diversas enfermidades (Msomi e Simelane, 2018). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 20.000 plantas são utilizadas para fins terapêuticos e aproximadamente 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais. Além disso, diversos medicamentos prescritos apresentam bioativos de origem vegetal. Entretanto, a busca por novos alvos farmacológicos à base de plantas medicinais continua sendo uma área importante e pouco explorada (Sen e Samanta, 2015; Özaslan e Oguzkan, 2018).

Bixa orellana é um arbusto da família Bixaceae nativo das Américas do Sul e Central, conhecido popularmente como urucum. Por ser um corante natural, é amplamente utilizado na indústria de cosméticos e alimentícia (Garcia *et al.*, 2011; Capella *et al.*, 2016). Entretanto, estudos mostram que o óleo extraído de diferentes formas e partes de *B. orellana* exibem atividade cicatrizante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, além de efeito protetor contra colite ulcerativa induzida por ácido acético (Shilpi *et al.*, 2006; Capella *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2019; Tagne *et al.*, 2022). Há, também, estudos que mostram potencial leishmanicida do óleo essencial de *B. orellana* contra *Leishmania amazonensis* em testes *in vitro* e em ensaio de infecção *in vivo* (Garcia *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2014; Machin *et al.*, 2019).

A leishmaniose cutânea (LC) é uma afecção dermatológica causada por diferentes espécies do protozoário *Leishmania* transmitido pela picada de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos. No Brasil, as três principais espécies que ocorrem são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. A doença se caracteriza pelo desenvolvimento de uma ou mais lesões no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. As lesões iniciam como pequenas pápulas e, na medida que evoluem, adquirem aspecto de cratera ou úlcera. Estas podem evoluir para cura espontânea ou permanecer ativas caso não sejam tratadas (Brasil, 2010; WHO, 2010). No entanto, a resolução das lesões cutâneas resulta em cicatrizes que podem ser desfigurantes e acarretar impactos psicossociais na vida dos indivíduos afetados (Turan *et al.*, 2015; Pacheco *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2019).

A LC possui elevada incidência mundial com cerca de 1 milhão de casos reportados anualmente. Neste cenário, o Brasil se destaca como um dos 10 países com maior concentração do número de casos reportados e como o país com maior incidência da doença nas Américas (OPAS, 2019; WHO, 2020). Apesar dos esforços, o tratamento padrão indicado para LC ainda é limitado a quimioterápicos com considerável efeito colateral cardiotoxico, nefrotóxico e hematotóxico. Além disso, já se observa aumento de resistência dos parasitos ao tratamento (Tuon *et al.*, 2008; Brasil, 2010). Somado a estas limitações e à magnitude da doença, é importante destacar que o tratamento padrão atual se restringe à resolução do processo infeccioso e, portanto, não exibe efeitos capazes de contribuir com os aspectos estéticos das cicatrizes. Nesse contexto, a busca por novos tratamentos que sejam mais eficazes, menos agressivos e capazes de contribuir esteticamente é de extrema relevância para proporcionar melhor qualidade de vida aos indivíduos afetados pela LC.

O presente trabalho teve como proposta avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica, antioxidante e antileishmanial do extrato de *B. orellana*, utilizado em formulação comercial, contra *Leishmania braziliensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bixa orellana*

Bixa orellana, comumente conhecida como urucum, é uma planta da família Bixaceae nativa da América do Sul, especialmente da região amazônica, além de ser encontrada na América Central e em outros países tropicais como Indonésia, Índia, Quênia e África Oriental. É uma planta arbustiva de 3 a 5 metros de altura (Figura 1). As sementes são ricas em pigmentos, sendo que o principal deles, cerca de 80%, é o carotenoide conhecido como bixina, amplamente explorado pela indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil. Várias partes do urucum são utilizadas na medicina tradicional para prevenir e tratar diversas enfermidades. A diversidade de usos tradicionais encoraja pesquisadores a isolar e identificar fitoquímicos da planta, bem como explorar suas propriedades farmacológicas (Vilar De *et al.*, 2014; Shahid Ul *et al.*, 2016).



FIGURA 1. *Bixa orellana*. Planta arbustiva de 3 a 5 metros da família Bixaceae, comumente conhecida como urucum. Fonte: Arquivo pessoal.

Os principais compostos encontrados em todas as partes da planta são os carotenoides, apocarotenoides, terpenos, terpenoides, esteróis e compostos alifáticos. Das sementes, além da bixina, já foram isolados norbixina, isobixina, beta-caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina, orellina, bixeína, bixol, crocetina, ácido elágico, ácido salicílico, treonina, ácido tomentosico, triptofano e fenilalanina. Mais de 100 compostos voláteis também já foram

extraídos em extratos orgânicos e aquosos e muitos deles já foram identificados (Vilar De *et al.*, 2014; Shahid Ul *et al.*, 2016).

Diversas atividades biológicas de *B. orellana* são descritas na literatura, como: atividade anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, antibacteriana, antifúngica, anticarcinogênica, anticonvulsivante, atividades nefarmacológicas, aumento da motilidade gastrointestinal e efeito protetor contra colite ulcerativa induzida por ácido acético (Vilar De *et al.*, 2014; Capella *et al.*, 2016; Shahid Ul *et al.*, 2016; Tagne *et al.*, 2022). Atividade antimalárica também já foi descrita contra diferentes espécies de plasmódios, a saber: *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium lophurae*, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum* (Vilar De *et al.*, 2014).

O óleo essencial e o extrato hidroalcoólico de *B. orellana* apresentou atividade antileishmanial contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, o tratamento com óleo essencial ou extrato hidroalcoólico foi capaz de controlar a infecção em camundongos BALB/c por *L. amazonensis* (Garcia *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2014; Machin *et al.*, 2019; Da Silva, 2020).

2.2 *Leishmania*: morfologia, ciclo biológico e diversidade

As *leishmanias* são organismos pertencentes ao Reino Protista, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Incluem diversas espécies que atuam como agente infeccioso das Leishmanioses, um grupo de doenças com amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de formas benignas e cutâneas, a forma visceral e grave (Ul Bari, 2008; Akhoundi *et al.*, 2016).

As espécies pertencentes a esse gênero apresentam um ciclo de vida digenético na qual se alteram em duas formas evolutivas principais, a forma promastigota ou flagelar e a forma amastigota ou esférica. A forma promastigota mede aproximadamente 10-15 µm de comprimento e possui um longo e único flagelo anterior que fornece motilidade e permite a adesão do parasito no intestino do inseto vetor. Esta forma é encontrada no tubo digestivo de insetos flebotômíneos e em culturas formando aglomerados ou rosetas. Uma variante dessa forma, a promastigota metacíclica, é transmitida pelo vetor ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, sendo, portanto, a forma infectante do parasito para o homem, o cão e demais mamíferos suscetíveis. A forma amastigota é oval ou esférica, não apresenta

motilidade, uma vez que possui um pequeno flagelo internalizado sem motilidade aparente. Essa forma mede cerca de 2-5 μm e são encontradas parasitando células do Sistema Fagocitário Mononuclear de hospedeiros mamíferos. É, portanto, a forma do parasito responsável pela manutenção e propagação da infecção nesses hospedeiros (Ul Bari, 2008; WHO, 2010; Freitas, 2012).

A transmissão do parasito ao homem e a outros mamíferos se dá pela picada de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos infectados (Ordem: Diptera; Família: Psychodidae; Subfamília: Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Estes são insetos pequenos (1,5 a 3 mm de comprimento), apresentam o corpo revestido por pequenas cerdas ou pêlos e coloração em tons de castanho. Por conta dessa última característica, no Brasil são conhecidos em diversas regiões pelo nome popular mosquito-palha ou birigui (Akhoundi et al., 2016; Brasil, 2017).

Leishmanias são protozoários heteroxênicos uma vez que seu ciclo ocorre em dois hospedeiros, os insetos flebotomíneos, que se comportam como vetores, e os hospedeiros mamíferos que incluem o homem, o cão, e animais silvestres como gambás, roedores e raposas. Nas áreas urbanas os cães são considerados o principal reservatório do parasito, uma vez que, quando infectados, apresentam elevada carga parasitária na pele, se tornando uma fonte de infecção para os flebotomíneos vetores e consequente transmissão para novos hospedeiros (Lainson, Rangel, 2005; Brasil, 2017).

Nos hospedeiros mamíferos, após o vetor introduzir formas promastigotas metacíclicas na pele, juntamente com a saliva, essas formas são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear, especialmente macrófagos. Dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos, o baixo pH desse microambiente somado à temperatura corporal elevada característica dos mamíferos, induz o parasito a se diferenciar na forma amastigota. Essa forma se replica continuamente até que ocorra a lise da célula hospedeira. Apesar dos macrófagos serem células fagocitárias profissionais, não conseguem conter a replicação do parasito. As formas amastigotas, uma vez livres, podem infectar novas células em um contínuo processo infeccioso (Nieto et al., 2011; Freitas et al., 2012).

A diversidade de espécies de *Leishmania* é um dos principais fatores responsáveis pela diversidade clínica das leishmanioses. Isso porque algumas espécies são adaptadas a temperaturas maiores característica dos órgãos internos, e, no entanto, são classificadas como espécies vicetrópicas responsáveis pela leishmaniose visceral, a forma clínica mais grave e

que pode evoluir para casos fatais. São responsáveis por essa forma clínica as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. infantum chagasi*. Outras espécies já são adaptadas a temperaturas menores da pele e mucosas, e, portanto são espécies dermatrópicas responsáveis pela formas tegumentares da doença que inclui a leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LMC). Diversas espécies de *Leishmania* são responsáveis por causar lesões cutâneas no homem. No Velho Mundo, a LC é causada pelas espécies: *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. donovani*. Nas Américas, ela é causada por múltiplas espécies. As principais são: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis* (WHO 2010; Nylén e Eidsmo 2012; Mcgwire e Satoskar, 2014). No Brasil as três principais espécies dermatrópicas de *Leishmania* são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis* (Brasil, 2010). As espécies *L. (Viannia) braziliensis* e *L. panamensis* também são responsáveis por infecções de mucosas que caracterizam a LCM (WHO, 2010; Brasil, 2010).

2.3 Leishmaniose cutânea: forma clínica, epidemiologia e tratamento

A leishmaniose cutânea (LC) corresponde à manifestação clínica menos grave, porém mais frequente dentre as leishmanioses (WHO, 2020). As formas cutâneas das leishmanioses são causadas por espécies dermatrópicas de protozoários do gênero *Leishmania* (WHO, 2010).

As infecções tegumentares na LC se manifestam sob aspectos clínicos diferentes que variam segundo a espécie do agente infeccioso em associação com características do hospedeiro, como: estado imunológico e nutricional, idade e suscetibilidade genética. A LC é subdividida em três fenótipos clínicos principais: Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Nylén e Eidsmo, 2012; Mcgwire e Satoskar, 2014; Kevric *et al.*, 2015; WHO, 2020) (Figura 2).

A LCD é associada às espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Ela é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões nodulares de tamanhos variados na região da face, orelhas, cotovelos e joelhos e, em alguns casos, as lesões podem alastrar pela superfície corporal. Geralmente a patologia não evolui para cura espontânea (WHO, 2010; Mcgwire e Satoskar, 2014; Kevric *et al.*, 2015).

A LCL é caracterizada pelo desenvolvimento de uma ou mais lesões no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor, especialmente em áreas mais expostas do corpo. A úlcera típica possui formato arredondado ou ovalado; base de consistência firme, eritematosa e infiltrada; bordas elevadas e bem-delimitadas; fundo avermelhado com a presença de granulações grosseiras. Inicialmente, as lesões se apresentam como pequenas pápulas características de picada de inseto. Na medida em que as pápulas evoluem, elas aumentam em tamanho e profundidade e ulceram na região do vértice adquirindo aspecto de cratera. As lesões podem se desenvolver semanas ou meses após a infecção e, em alguns casos, também podem evoluir para cura espontânea dentro de semanas ou meses. No Brasil, a forma localizada da LC está associada às espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Brasil, 2010; WHO, 2010; Mcgwire e Satoskar, 2014).

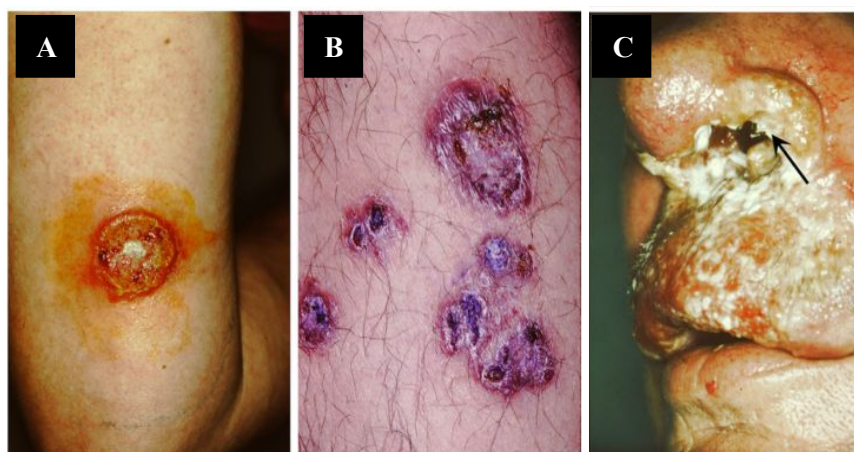


FIGURA 2. Fenótipos clínicos das formas tegumentares das leishmanioses. (A) LCL caracterizada por lesão ulcerativa no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. (B) LCD caracterizada por lesões de tamanhos variados com aparência verrucosa e xantomatosa na superfície corporal. (C) LMC decorrente da metástase de *L. braziliensis* para os tecidos das mucosas nasal e oral. Adaptado de: BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 204, n. 6, p. 619–634, 2015.

A espécie *L. braziliensis* também está associada ao desenvolvimento de LMC, assim como a espécie *L. panamensis*. A LMC decorre da metástase do parasito via sistema linfático ou hematogênico para os tecidos das mucosas oral e do trato respiratório superior. Lesões nasais são mais frequentes, podendo ter desfechos obstrutivos e mutilantes. Geralmente a doença se manifesta meses ou anos após a resolução de lesões cutâneas primárias (WHO, 2010; Mcgwire e Satoskar, 2014).

A LC, apesar de ser a forma menos grave das leishmanioses, é uma afecção dermatológica de grande importância na saúde pública devido à sua magnitude e por acarretar

impactos psicossociais significativos na vida dos indivíduos afetados. Tanto as lesões como as cicatrizes geram efeitos discriminatórios e estigmatização social que, conseqüentemente, comprometem o bem-estar psicológico dos indivíduos. Estudos realizados em áreas endêmicas de LC comprovam o impacto psicossocial ocasionado pela doença e revelam, ainda, que existe um grande apelo por parte dos indivíduos afetados por medidas de prevenção e cuidado, especialmente no reparo das cicatrizes. A doença também tem reflexos no campo econômico, uma vez que, em muitos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (Brasil, 2010; Nylén e Eidsmo, 2012; Bennis *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2017; Bennis *et al.*, 2018; Pires *et al.*, 2019).

Os altos índices da doença configuram, além de um problema de saúde pública, uma preocupação social especialmente nas regiões endêmicas (Pacheco *et al.*, 2017; Bennis *et al.*, 2018). Segundo dados da OMS, 1 milhão de casos de LC são reportados anualmente em todo mundo. Em 2018, 85% dos casos ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Bolívia, Colômbia, Irã (República Islâmica), Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia (WHO, 2020). Nas Américas, segundo a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), foram reportados, no período de 2001 a 2018, 989.096 novos casos das formas cutânea e mucocutânea de leishmaniose, com média anual de aproximadamente 55 mil casos. O Brasil é o país latino-americano com maior índice da doença, seguido por Colômbia, Peru, Nicarágua, Bolívia e Venezuela (OPAS, 2019).

No Brasil, o tratamento padrão indicado para a LC, segundo recomendações da OMS e do Ministério da Saúde, tem como drogas de primeira escolha o Antimoniato de Meglumina e a Anfotericina B Lipossomal. Esta última é indicada somente em casos de pacientes com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes e pessoas acima de 50 anos. Como droga de segunda escolha são utilizados o Desoxicolato de Anfotericina B e Isitionato de Pentamidina, este último para pacientes gestantes (Brasil, 2017, 2010; WHO, 2010). Os antimoniais pentavalentes provocam efeitos colaterais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, indução de pancreatite e já ocorre resistência do parasito a seus efeitos (Brasil, 2010; Kato *et al.*, 2014; No, 2016). O uso de Anfotericina B também possui limitações devido aos efeitos nefrotóxico e hematotóxico. Outra considerável limitação é o custo elevado da formulação lipossomal do medicamento, formulação atualmente recomendada, o que restringe o uso em pacientes, especialmente, dos países em desenvolvimento (Brasil, 2010; WHO, 2010; No, 2016).

O protocolo terapêutico da LC no Brasil é orientado pelo Ministério da Saúde e pode ser consultado no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Segundo o último manual de 2017, o tratamento é indicado de acordo com a forma clínica e a espécie do agente infeccioso. No caso de lesões localizadas provocadas por *L. braziliensis* deve ser levado em conta ainda a presença de lesões múltiplas ou única e características do hospedeiro como idade, presença de comorbidade renal, hepática ou cardíaca, e se o paciente é gestante e lactante. No caso de lesão única com até 3 cm de diâmetro, é recomendada a administração intralesional da droga de primeira escolha, o Antimoniato de Meglumina – Tabela 1 (Brasil, 2017).

Tabela 1. Opções de tratamento da Leishmaniose Cutânea Localizada em pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*.

Forma clínica	Terapêutica
<p>Lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização</p>	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Antimoniato de meglumina EV* ou IM**: para pacientes de todas as regiões brasileiras, exceto aqueles com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes e com idade maior ou igual a 50 anos. ▪ Anfotericina B lipossomal: para pacientes com idade a partir de 50 anos; com insuficiência renal, cardíaca ou hepática de qualquer idade; transplantados renais, cardíacos ou hepáticos; gestantes de qualquer idade. <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Desoxicolato de anfotericina B. ▪ Isetionato de pentamidina, exceto em gestantes e lactantes.
<p>Lesão única com até 3 cm no seu maior diâmetro, em qualquer localização, exceto cabeça e regiões periarticulares, incluindo recidiva cútis e sem imunossupressão.</p>	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Todas as indicações de primeira escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização. ▪ Outra opção: antimoniato de meglumina intralesional. <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Todas as indicações de segunda escolha recomendadas para lesão única ou múltipla de qualquer tamanho e localização.

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília –DF, 2017. *EV: Endovenoso. **IM: Intramuscular.

Apesar de existir tratamento para LC, que no Brasil é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), este não é capaz de impedir a formação de cicatrizes que, dependendo do tamanho e local, podem ser desfigurantes. Nesse contexto, a busca por novos tratamentos que sejam mais eficazes, menos agressivos e capazes de contribuir no aspecto estético das

cicatrizes é de extrema relevância para proporcionar melhor qualidade de vida aos indivíduos afetados por LC.

2.4 Resposta imune na LC

As respostas imunes do hospedeiro frente a um agente infeccioso são responsáveis tanto pela eliminação quanto persistência do mesmo. Leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios, portanto, uma resposta protetora contra a LC depende da indução de uma resposta imune Th1 e de suas citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-12, IFN- γ , IL-1 α e TNF. Tais citocinas levam a ativação das vias microbicidas dos macrófagos que resulta na produção de óxido nítrico (NO), um componente tóxico capaz de eliminar os parasitos intracelulares (Nylen e Eidsmo, 2012; Carneiro, Vaz et al., 2021).

Por outro lado, a progressão da LC está associada a ativação de linfócitos T CD4+ com perfil Th2. Essas células uma vez ativadas produzem citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Tais citocinas impedem a ativação das vias microbicidas dos macrófagos contribuindo para a replicação e persistência do parasito. Essas citocinas também estimulam respostas imunes humorais e a diferenciação de eosinófilos (Faleiro, 2014; Carneiro, Vaz et al., 2021).

Apesar de estar bem esclarecido que respostas celulares do tipo Th1 são responsáveis pelo controle da LC, respostas com tal perfil quando exageradas e persistentes podem intensificar os danos teciduais. Nessas situações um controle da resposta imune é fundamental na preservação da integridade do tecido. A resposta imune Th1 intensificada pode ser controlada pela citocina IL-10, importante citocina reguladora capaz de suprimir a atividade de diferentes células e componentes da imunidade protetora, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (Faleiro, 2014; Abdoli, Maspi et al., 2017; Carneiro, Vaz et al., 2021).

Estudos tem demonstrado que o sucesso no controle da LC além de envolver um refinado equilíbrio da resposta Th1 e produção de IL-10, também depende do envolvimento ou não da resposta Th17. Esse perfil de resposta induz a produção das citocinas IL-17, IL-22 e IL-21, que por sua vez, atuam no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. O papel dos neutrófilos na LC é controverso e parece depender da espécie do agente infeccioso.

Em infecção por *L. amazonensis*, os neutrófilos secretam armadilhas extracelulares, as NETs, que contribui na eliminação dos parasitos. Em outras situações, os neutrófilos podem secretar níveis elevados de IL-17 que induz intensa inflamação e consequente dano tecidual (Abdoli, Maspi et al., 2017; Carneiro, Vaz et al., 2021).

Os macrófagos são células da imunidade inata com intensa participação nas leishmanioses. Ao mesmo tempo que serve de abrigo para a *Leishmania* e replicação da mesma, é também uma célula importante na eliminação desses parasitas intracelulares. Além disso, essas células são cruciais no estabelecimento da integridade do tecido lesionado. As diferentes funções exercidas pelos macrófagos dependem do microambiente de citocinas, que por sua vez, leva a diferenciação de fenótipos distintos, a saber: M1 e M2. Os macrófagos com fenótipo M1 são ativados por uma via clássica induzida pelas citocinas INF- γ e TNF- α . Essas células apresentam um perfil inflamatório e, portanto, são importantes na eliminação dos parasitas intracelulares e controle da infecção (Shapouri-Moghaddam, 2018; Carneiro, Vaz et al., 2021). O microambiente de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13 leva à ativação alternativa de macrófagos caracterizados pelo fenótipo M2. Uma vez ativadas, essas células controlam a infecção pela secreção de altos níveis de IL-10 e TGF- β . Além disso, os macrófagos M2 são essenciais na recuperação da homeostase do tecido por induzir o reparo e remodelamento do tecido lesionado (Shapouri-Moghaddam, 2018; Kloc, 2019). Num modelo ideal de infecção, podemos pensar que os macrófagos M1 são essenciais na fase inicial do processo infeccioso onde se faz necessário o controle e eliminação do parasito, enquanto que os macrófagos M2 são desejados nas etapas finais, quando a infecção está controlada e há uma necessidade de controlar também a resposta imune e reparar a arquitetura do tecido lesionado.

2.5 Estresse oxidativo na LC

O termo “estresse oxidativo” é utilizado para se referir ao desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo. O estresse oxidativo pode gerar danos aos sistemas biológicos e está associado a diversas patologias. Um dos mecanismos pelos quais o estresse oxidativo contribui com a patogênese é a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente ROS e RNS. Estas oxidam macromoléculas, incluindo lipídeos de membrana, enzimas, proteínas estruturais e ácidos

nucléicos, resultando em danos celulares que podem ser irreversíveis (Forman, 2021; Reverte, 2022).

Na LC, o estresse oxidativo apresenta duplo papel. ROS e RNS produzidas por macrófagos durante a resposta inflamatória constituem importante estratégia de defesa do hospedeiro para eliminar os parasitas intracelulares e controlar a infecção, mas também resulta em dano tecidual, uma vez que seus efeitos podem impactar células não infectadas (Kocyigit, 2005; Ozbilge, 2005; Reverte, 2022). Em pacientes com LC, os níveis de peroxidação lipídica, marcador de estresse oxidativo, se apresentam elevados em comparação com indivíduos saudáveis (Ozbilge, 2005). Nesses pacientes também são observados maiores níveis de danos no DNA e de outros marcadores oxidativos como carbonilação de proteína plasmática, malondialdeído e peróxido total. Em contrapartida, eles apresentam resposta antioxidante menor em comparação com indivíduos saudáveis. Esses achados reforçam a ideia de que ROS e RNS produzidos pelo organismo do hospedeiro como estratégia de defesa contra o parasito *Leishmania* também induzem dano oxidativo em células não infectadas (Kocyigit, 2005). No entanto, *Leishmania* dispõe de estratégias para antagonizar o sistema imunológico do hospedeiro e favorecer sua persistência e proliferação na célula hospedeira. Em infecções parasitárias, o estresse oxidativo induzido desencadeia a ativação de resposta antioxidante do hospedeiro para neutralizar a explosão oxidativa que resulta na diminuição dos radicais livres e, portanto, favorece a persistência do parasito (Reverte, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica, antioxidante e antileishmanial do extrato de *Bixa orellana*, utilizado em formulação comercial, contra *Leishmania braziliensis* como perspectiva de potencial uso terapêutico contra lesões de Leishmaniose Cutânea.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade de diferentes concentrações do extrato de *B. orellana* em modelo de célula que participa tanto do processo de infecção do parasito *Leishmania* quanto do processo de reparo tecidual (macrófago RAW 264.7);
- Verificar o perfil antioxidante do extrato de *B. orellana* por meio da avaliação da atividade sequestradora do radical livre estável DPPH;
- Avaliar a atividade antileishmanial do extrato de *B. orellana* sobre formas promastigotas e em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em modelo de infecção de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*;
- Verificar a presença de marcadores imunológicos (óxido nítrico, TNF- α e IL-10) em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com extrato de *B. orellana*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo de macrófagos

Macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram descongelados em temperatura ambiente e expandidos em frascos de cultivo celular de 75 cm², em meio de cultivo de macrófagos, composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) a 37°C/30 min, penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) 100 U/mL, 0,37% de bicarbonato de sódio, e 0,8% de hepes, pH 7,2 e mantidos a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Os repiques de manutenção foram realizados a cada dois dias por raspagem de células utilizando espalhador de células descartável.

4.2 Cultivo de parasitos

Formas promastigotas de *L. braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2904, foram mantidas em frascos de cultivo celular de 12,5 cm² ou 25 cm² em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB inativado (LGC Biotecnologia) a 37°C/30 min, L-glutamina (Synth, Diadema, SP, Brasil) 2 mM, penicilina G (USB Corporation) 100 U/mL, 0,37% de bicarbonato de sódio, e 0,8% de hepes; pH 6,5 e mantidas em incubadora a 25°C.

4.3 Extrato de *B. orellana*

O extrato de *B. orellana* foi obtido pelo método patenteado PCT/BR2017/050342. Para os ensaios *in vitro*, o extrato bruto de *B. orellana* foi inicialmente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 1:1. Essa preparação foi diluída a 1%, na proporção de 10 µL para 1 mL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB inativado (LGC Biotecnologia) e 1% de penicilina G (USB Corporation) 100 U/mL, pH 7,2 e filtradas em membrana de 0,22 µm. A partir dessa preparação do extrato, foram preparadas as demais diluições avaliadas nos ensaios *in vitro*: 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,0312%, 0,0156% e 0,0078%.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

A citotoxicidade do extrato de *B. orellana* foi avaliada em cultura de macrófagos RAW 264.7 e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de redução de MTT com 24 ou 48 horas de tratamento, utilizando diferentes concentrações do extrato. Inicialmente, macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/poço e volume final de 100 μ L. A placa foi incubada *overnight* a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ para adesão dos macrófagos. Os poços foram lavados com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2 para retirada das células não aderentes e as células aderidas foram tratadas com 100 μ L do extrato em diferentes concentrações, em quadruplicata, e incubadas por 24 ou 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controles foram utilizados macrófagos não tratados e macrófagos tratados com Anfotericina B (2,5 μ g/mL). Como o extrato apresenta cor, que varia de acordo com a diluição, foi adicionado à placa o branco, em quadruplicata, correspondente a cada diluição do extrato no meio de cultivo de macrófagos. Para verificar a citotoxicidade do DMSO presente na preparação do extrato, macrófagos também foram tratados com DMSO nas mesmas concentrações das diferentes concentrações avaliadas do extrato. Posteriormente, em 24 ou 48 horas de tratamento, foram adicionados 50 μ L/poço de solução estéril de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio Brometo (MTT - Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/mL em PBS. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. A reação foi interrompida com adição de 100 μ L/poço de SDS a 10% em HCL 0,01 M. As placas foram mantidas em agitação a 60 rpm por 1 hora ou até a completa solubilização dos cristais de formazan. Na sequência, foi realizada a leitura de absorbância sob luz com comprimento de onda de 570 nm em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO. Os dados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao grupo não tratado, considerado com 100% de viabilidade celular.

4.5 Atividade sequestradora do radical 2-2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·)

Com o objetivo de avaliar se o extrato de *B. orellana* apresenta perfil antioxidante, foi realizado o ensaio da atividade sequestradora do radical livre estável DPPH·. Inicialmente, o extrato puro de *B. orellana* foi diluído em metanol nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,0312% e 0,0156%. Paralelamente, foi preparada uma solução estoque de cada controle positivo, a saber: rutina, BHT e ácido ascórbico, na concentração de 1 mg/mL em metanol. A partir das soluções estoques foram preparadas 8 diluições em metanol para

montagem de curva padrão de cada controle (variação de 25 a 200 µg/mL). Em placa de 96 poços, foram adicionados, em triplicata, 50 µL/poço das diluições do extrato a ser testado, diluições dos controles rotina, BHT e ácido ascórbico e de metanol, para servir como branco, nos poços previamente identificados. Na sequência, foram adicionados 250 µL/poço de solução DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,004% m/v em metanol. Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e ausência de luz, foi procedida a leitura de absorbância sob luz com comprimento de onda de 517 nm em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

4.6 Atividade antileishmanial do extrato de *B. orellana* contra formas promastigotas de *L. braziliensis*

Em placa de 96 poços, foram adicionados, em quadruplicata, 50 µL/poço de solução contendo 4×10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis*, em fase logarítmica de crescimento, em meio de cultivo de *Leishmania*, preparado conforme descrito acima. Na sequência, foram adicionados 50 µL/poço de extrato de *B. orellana* em diferentes concentrações. Como controle foram avaliadas formas promastigotas do parasito não tratadas e tratadas com Anfotericina B (2,5 µg/mL). Como o extrato apresenta cor, que varia de acordo com a diluição, foi preparado o branco, em quadruplicata, correspondente a cada diluição do extrato. As placas foram incubadas por 24 ou 48 horas a 25°C. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de redução de MTT, conforme descrito em experimentos anteriores. Na sequência, foi realizada leitura de absorbância sob luz com comprimento de onda de 570 nm em leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO. Os dados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo não tratado, considerado com 100% de viabilidade celular.

4.7 Avaliação *in vitro* da carga parasitária de macrófagos infectados com *L. braziliensis*

Para cada poço de placa de 24 poços foram preparados 500 µL de suspensão contendo 5×10^5 macrófagos em meio de cultivo de macrófagos. A suspensão foi distribuída sobre lamínulas de vidro de 13 mm previamente esterilizadas e posicionadas no fundo de cada poço. A placa foi incubada *overnight* a 37°C e 5% de CO₂ para adesão dos macrófagos. Após o período de incubação, células não aderentes foram lavadas com PBS, pH 7,2 e as células aderentes foram infectadas com formas promastigotas de *L. braziliensis*, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 1:10 parasito/macrófago. A placa foi novamente incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Ao final deste período, cada poço foi lavado três vezes com

DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2, para remoção dos parasitos não fagocitados e células não aderidas. A placa foi novamente incubada a 37° C e 5% de CO₂ por 24 h. Na sequência, foram adicionados aos poços 250 µL de meio de cultivo de macrófagos e 250 µL do extrato de *B. orellana* em diferentes concentrações ou controle anfotericina B (2,5 µg/mL) nos poços previamente identificados. Macrófagos infectados e não tratados também foram avaliados como controles. A placa foi mantida a 37°C e 5% de CO₂ por 24 ou 48 horas. Ao final, as lamínulas foram lavadas com PBS, pH 7,2, removidas e coradas com Kit Panótico (Renylab, Barbacena, MG, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Após a coloração, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro aderidas com Entellan (Merck, Darmstadt, HE, Germany). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foram determinados pela contagem de 200 células, em duplicatas, utilizando microscópio óptico (Nikon eclipse E200).

4.8 Dosagem de óxido nítrico

Os sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados por 24 ou 48 horas foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Em placa de fundo chato de 96 poços, curva padrão foi preparada pela adição de 50 µL de padrão de nitrito de sódio 250 µM, em duplicata, a 50 µL de meio de cultivo de macrófagos, realizando-se, a partir daí, 12 diluições sucessivas 1:2 em poços contendo 50 µL do mesmo meio. Em seguida, foram adicionados, em duplicata, 100 µL de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%) a 50 µL de sobrenadante de cultura de cada amostra, a 50 µL de meio de cultivo de macrófagos (branco) e aos poços dos padrões. Após 10 minutos de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das absorbâncias das amostras, do branco e dos padrões sob luz com comprimento de onda de 570 nm em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

4.9 Dosagens das citocinas TNF- α e IL-10

Amostras dos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados por 24 horas foram preparadas conforme *BD™ Cytometric Bead Array Kit* para dosagem das citocinas TNF- α e IL-10 por citometria de fluxo em equipamento BD

FACSVerse do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

4.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey para calcular as diferenças entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Em alguns casos, foi utilizado o teste t de Student não pareado para comparação entre as amostras.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

A citotoxicidade do extrato de *B. orellana* foi avaliada em cultura de macrófagos RAW 264.7 e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT com 24 ou 48 horas de tratamento com diferentes concentrações do extrato. A viabilidade celular dos grupos tratados foi calculada considerando o número de células viáveis do grupo S/T como 100%.

O extrato de *B. orellana*, nas concentrações testadas, apresentou perfil semelhante de citotoxicidade com 24 ou 48 horas de tratamento, exceto na concentração de 0,5%, que apresentou maior viabilidade celular em 24 horas (Figura 3; Tabela 2). O extrato na concentração de 1% foi altamente citotóxico em comparação com as demais concentrações nos dois tempos de tratamento avaliados. As células tratadas por 24 horas com extrato nas concentrações de 0,25% e 0,125% apresentaram viabilidade de aproximadamente 80%. As demais concentrações testadas não apresentaram diferença significativa na citotoxicidade em relação às células não tratadas.

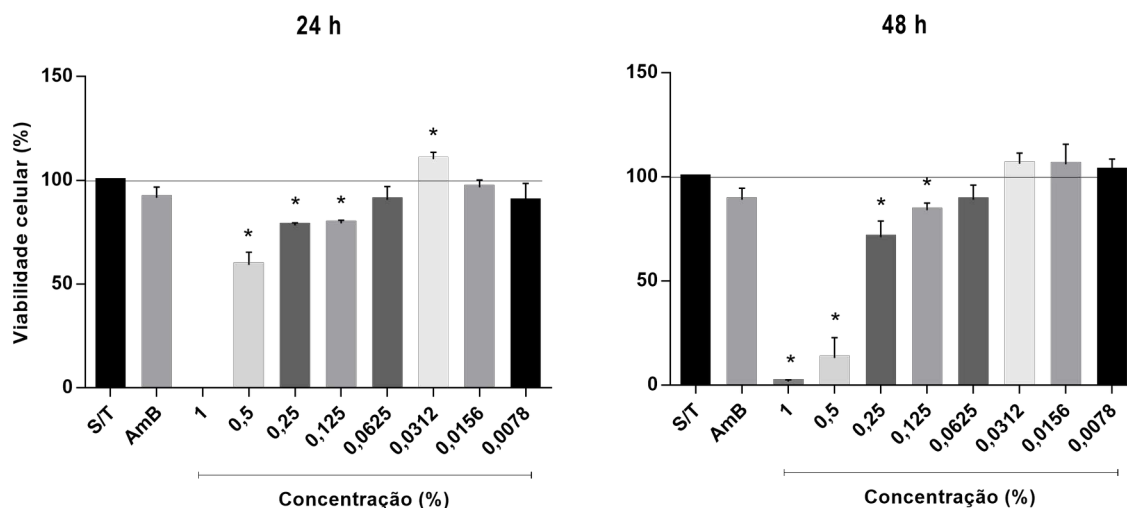


FIGURA 3. Avaliação da citotoxicidade do extrato de *B. orellana* em macrófagos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com extrato de *B. orellana* em diferentes concentrações por 24 ou 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de degradação do MTT. As barras representam as médias \pm desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. A linha horizontal delimita faixa de 100% de células viáveis. Diferenças entre o percentual de viabilidade celular dos grupos tratados e do grupo não tratado (S/T) foram determinadas pelo teste One-Way ANOVA seguido de teste *t* de Student não-pareado (* $p < 0,05$).

Tabela 2. Viabilidade de Macrófagos RAW 264.7 tratados com extrato de *B. orellana*

Tratamento	24 h				48 h			
	Exp. 1 (%)	Exp.2 (%)	Exp. 3 (%)	Média	Exp. 1 (%)	Exp. 2 (%)	Exp. 3 (%)	Média
AmB	100,98	91	83	91,6	80	99	88	89
1% Extrato de <i>B. orellana</i>	0,93	0	0	-	0	2	3	1,6
0,5%	69,30	61	48	59,3	32	0	8	13
0,25%	79,53	76	79	78,3	85	70	58	71
0,125%	81,89	77	79	79,3	90	84	78	84
0,0625%	97,1	97	78	90,6	103	83	81	89
0,0312%	112,71	114	104	110,3	116	104	99	106,3
0,0156%	102,86	96	91	96,6	125	100	93	106
0,0078%	103,29	93	75	90,3	109	108	93	103,3

Uma vez que o extrato puro de *B. orellana* foi diluído na proporção de 1:1 em DMSO antes da diluição em meio DMEM 10%, foi verificado se o perfil de citotoxicidade do extrato, preparado em diferentes concentrações, é influenciado pela toxicidade do DMSO. Para isso, macrófagos RAW 264.7 foram tratados por 24 ou 48 horas com DMSO diluído em meio DMEM nas mesmas concentrações avaliadas anteriormente na diluição dos extratos. A viabilidade celular dos grupos tratados foi calculada considerando o número de células viáveis do grupo S/T como 100%. Todas as concentrações de DMSO avaliadas não apresentaram efeito citotóxico às células nos dois tempos de tratamento (Figura 4).

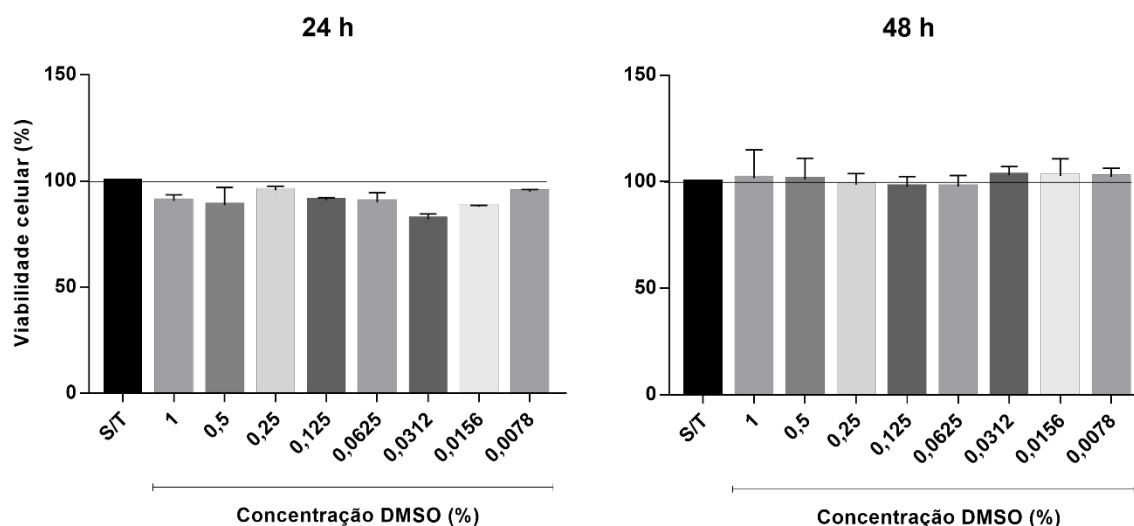


FIGURA 4. Avaliação da citotoxicidade de DMSO em macrófagos RAW 264.7. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com DMSO em diferentes concentrações por 24 ou 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de degradação do MTT. As barras representam as médias \pm desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. A linha horizontal delimita faixa de 100% de células viáveis. Diferenças entre o percentual de viabilidade celular dos grupos tratados e do grupo não tratado (S/T) foram determinadas pelo teste One-Way ANOVA ($<0,05$).

5.2 Atividade antioxidante do extrato de *B. orellana*

Os agentes antioxidantes protegem o organismo dos danos causados pelos radicais livres. Com o objetivo de avaliar se o extrato de *B. orellana* apresenta perfil antioxidante, foi realizado o ensaio da atividade sequestradora do radical livre estável DPPH \cdot . Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do radical livre DPPH \cdot . Como controle positivo foram avaliados três compostos com atividade antioxidante: Rutina, BHT e Ácido Ascórbico. O extrato de *B. orellana*, nas concentrações 0,125%, 0,25% e 0,5%, apresentou, respectivamente, 61,6%, 63,3% e 66,1% de inibição do radical livre DPPH \cdot (Figura 5). Estes resultados sugerem potencial efeito antioxidante do extrato de *B. orellana*.

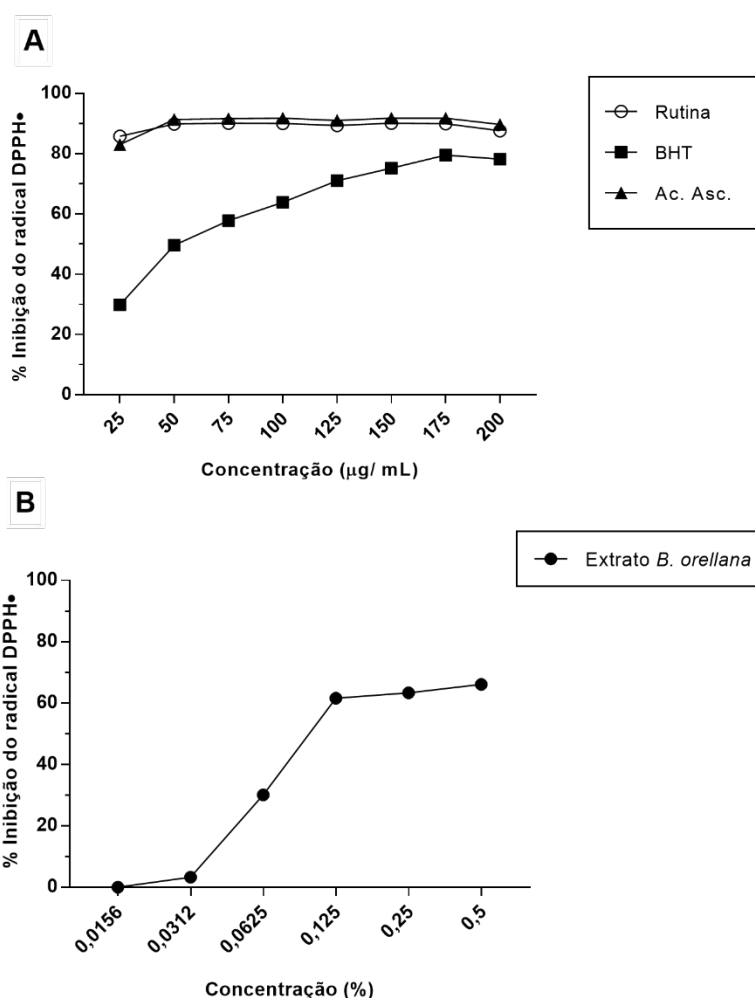


FIGURA 5. Atividade antioxidante do extrato de *B. orellana*. A atividade antioxidante do extrato de *B. orellana* foi avaliada pela atividade sequestradora do radical livre estável DPPH \cdot . Os resultados foram expressos pelo percentual de inibição do radical DPPH \cdot . **A)** Atividade antioxidante dos controles positivos Rutina, BHT e Ácido Ascórbico (concentração: µg/ mL). **B)** Atividade antioxidante do extrato de *B. orellana* (concentração: %). Os gráficos representam o resultado de um experimento.

5.3 Viabilidade celular de promastigotas de *L. braziliensis*

O efeito leishmanicida do extrato de *B. orellana* foi avaliado em cultura de formas promastigotas de *L. braziliensis* e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT com 24 ou 48 horas de tratamento. A viabilidade celular dos grupos tratados foi calculada considerando o número de células viáveis do grupo S/T como 100%. O extrato de *B. orellana* não apresentou efeito leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* (Figura 6).

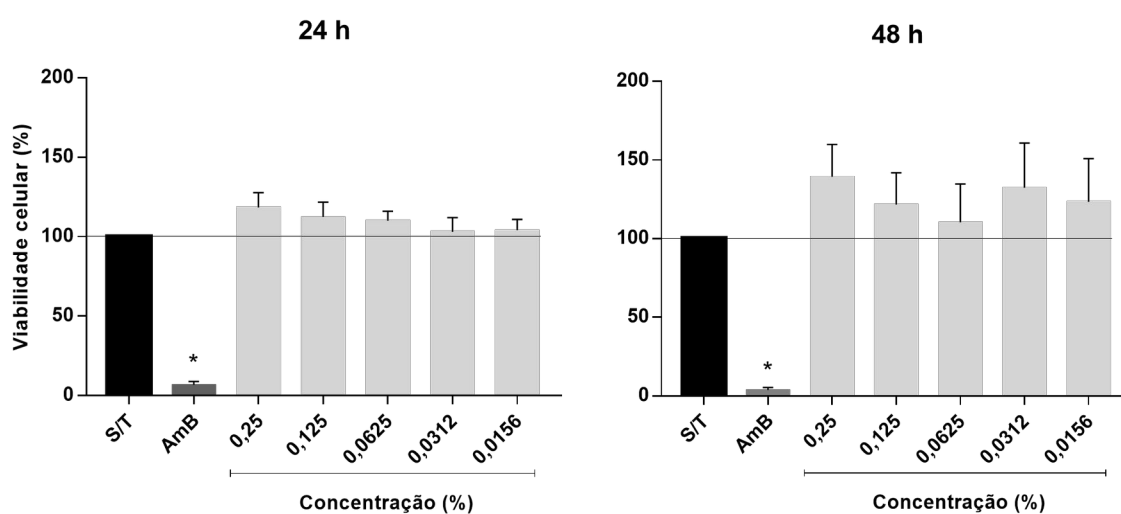


FIGURA 6. Avaliação da citotoxicidade do extrato de *B. orellana* em promastigotas de *L. braziliensis*. Promastigotas (4×10^6 células/poço) foram tratados com extrato de *B. orellana* em diferentes concentrações por 24 e 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de degradação do MTT. As barras representam as médias \pm desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. A linha horizontal delimita faixa de 100% de células viáveis. Diferenças entre o percentual de viabilidade celular dos grupos tratados e do grupo não tratado (S/T) foram determinadas pelo teste One-Way ANOVA seguido de teste *t* de Student não-pareado (* $p < 0,05$).

5.4 Avaliação do efeito do extrato de *B. orellana* na carga parasitária de infecção *in vitro* por *L. braziliensis*

Macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. braziliensis* foram submetidos ao tratamento com extrato de *B. orellana* por 24 ou 48 horas. Os resultados foram expressos como o número de formas amastigotas em 100 unidades de macrófagos contados ou como o percentual de macrófagos infectados. Em 24 horas foi observada redução significativa do número de amastigotas em 100 macrófagos contados no grupo tratado com extrato de *B.*

orellana a 0,25% em relação ao grupo não tratado. Além disso, utilizando essa mesma concentração do extrato, não houve alteração significativa na carga parasitária em relação ao grupo tratado com anfotericina B (Figura 7A).

Em 24 horas também foi observada redução significativa no percentual de macrófagos infectados nos grupos tratados com extrato de *B. orellana* nas concentrações de 0,25%, 0,0625% e 0,0156% (Figura 7B).

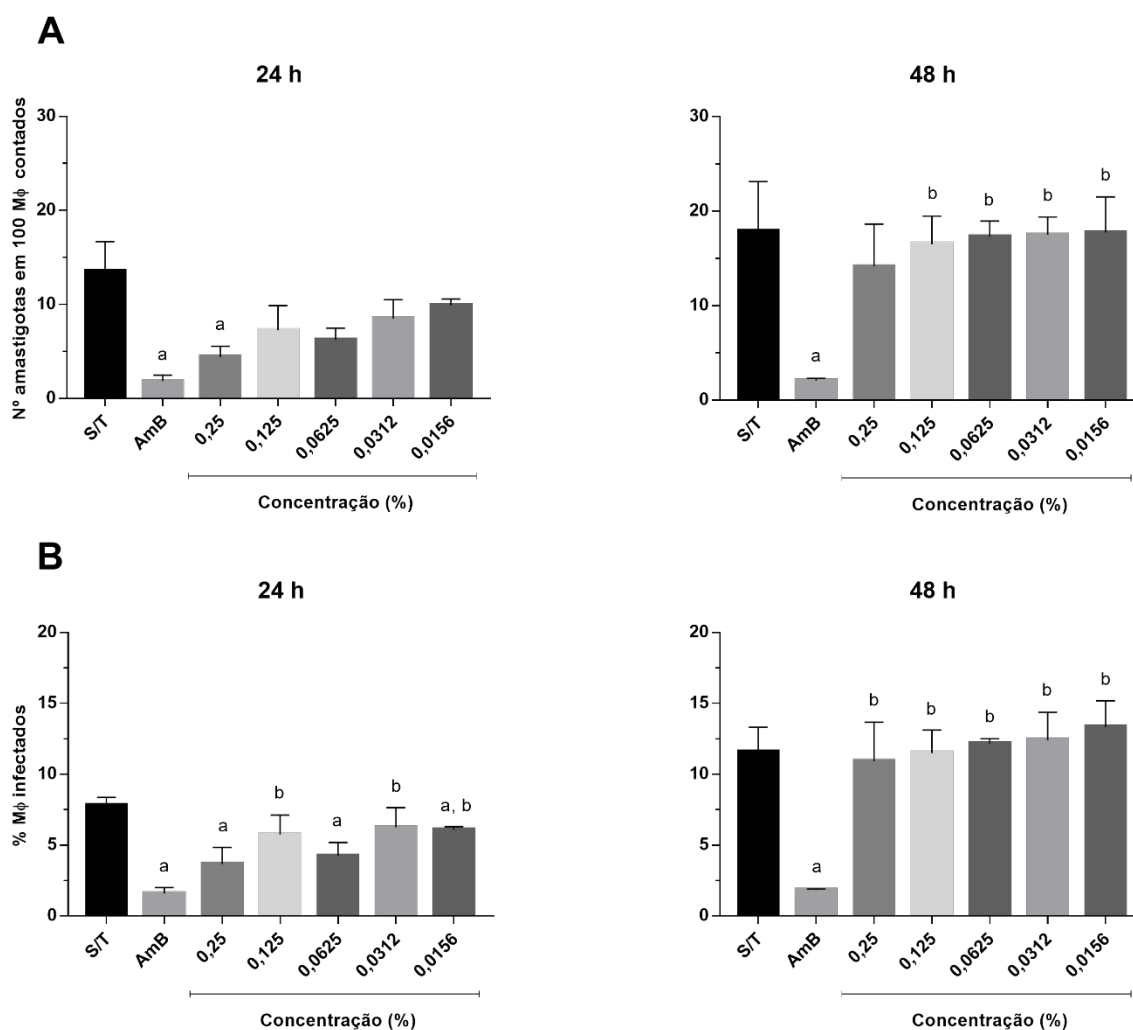


FIGURA 7. Avaliação do extrato de *B. orellana* na infecção *in vitro* por *L. braziliensis*. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. Após 24h de infecção foi realizado o tratamento com extrato de *B. orellana* por 24 e 48h. **A)** Número de amastigotas em 100 macrófagos contados. **B)** Percentual de macrófagos infectados. As barras representam as médias \pm desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças entre o percentual de viabilidade celular dos grupos tratados e do grupo não tratado (S/T) foram determinadas pelo teste One-Way ANOVA seguido de teste *t* de Student não-pareado (* $p < 0,05$). (a) Diferença entre os grupos tratados com extrato de *B. orellana* e o controle S/T. (b) Diferença entre os grupos tratados com extrato de *B. orellana* e o grupo tratado com anfotericina B (AmB).

Uma vez que a infecção *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 com *L. braziliensis* apresentou significativa redução na carga parasitária sob tratamento por 24 horas com extrato de *B. orellana*, a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-10 e TNF- α em sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados foi avaliada. Não foi detectada a produção da citocina IL-10 nem de NO por macrófagos infectados *in vitro* (dados não apresentados). Os grupos tratados com o extrato de *B. orellana* não apresentaram diferença significativa na produção de TNF- α em relação ao grupo não tratado (Figura 8).

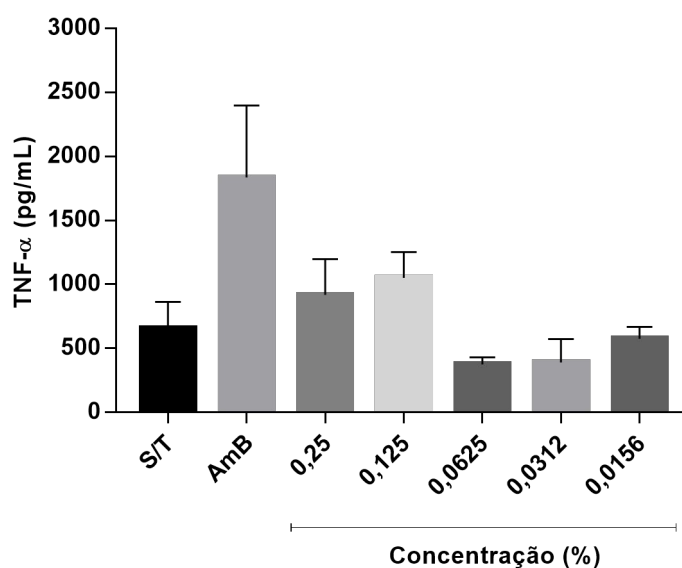


FIGURA 8. Produção de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. braziliensis*. A produção de TNF em sobrenadante de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados por 24 h com extrato de *B. orellana* foi avaliada por citometria de fluxo. As barras representam as médias \pm desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de TNF- α dos grupos tratados em relação aos controles foram avaliadas pelo teste One-Way ANOVA seguido de teste *t* de Student não-pareado.

6. DISCUSSÃO

Apesar de ser considerada a forma clínica menos grave das leishmanioses, a LC acarreta efeitos psicossociais negativos decorrentes das lesões e das cicatrizes que se formam no local da infecção cutânea (Bennis, Thys et al. 2017, Pacheco, Martins et al. 2017, Pires, Wright et al. 2019). O tratamento ideal deveria considerar a resolução do processo infeccioso bem como atuar no processo de reparo tecidual, de modo a contribuir positivamente na estética da cicatriz.

No presente estudo, a citotoxicidade, o potencial antioxidante e leishmanicida do extrato de *B. orellana* foram avaliados *in vitro* sob diferentes condições. É importante ressaltar que o extrato avaliado é utilizado em formulação comercial em uma linha de produtos voltados para o tratamento de feridas simples e complexas, psoríase, dermatites e queimaduras de primeiro e segundo grau. Segundo informações do fabricante, o extrato de *B. orellana* atua no reequilíbrio das células, estimulando formação de colágeno e angiogênese, eventos importantes no reparo tecidual.

O extrato de *B. orellana*, na concentração de 0,25%, garantiu viabilidade de aproximadamente 80% e 70% dos macrófagos RAW 264.7 tratados por 24 h ou 48 h, respectivamente, em comparação com o grupo controle não tratado. Concentrações menores do extrato (0,125% a 0,0078%) apresentaram baixa ou nenhuma citotoxicidade e concentrações maiores (0,5% e 1%) foram significativamente citotóxicas. Os resultados denotam ainda que a citotoxicidade do extrato emulsificado de *B. orellana* possivelmente não é causada pelo DMSO presente na emulsão. O mesmo diluído em meio DMEM nas mesmas concentrações e tempo de tratamento utilizados para o extrato não afetou a viabilidade dos macrófagos. Resultados semelhantes foram observados em ensaio de citotoxicidade em células VERO tratadas com preparação do extrato de *B. orellana* em DMSO (1:200), a qual foi altamente citotóxica na concentração de 1%. Na concentração de 0,1%, porém, a viabilidade das células atingiu 75% e, em concentrações menores, a viabilidade superou 90% (Capella 2016).

Macrófagos são células da imunidade inata que desempenham diversas funções no organismo devido à sua plasticidade quando ativado. O microambiente de citocinas pode levar os macrófagos a adquirirem fenótipos distintos. O reconhecimento de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou a presença de citocinas tais como IFN- γ e TNF- α resultam na ativação clássica dos macrófagos (M1). Macrófagos M1 apresentam um perfil inflamatório e estão

envolvidos na eliminação de patógenos no processo infeccioso, além de produzirem e secretarem citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-13 (Shapouri-Moghaddam 2018, Carneiro, Vaz et al. 2021). Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos são responsáveis pela eliminação das formas amastigotas intracelulares pela ativação de vias microbicidas, mas também fornecem um local seguro para a replicação do parasito (Abdoli, Maspi et al. 2017, Carneiro, Vaz et al. 2021). Por outro lado, um microambiente com a presença das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13 leva à ativação alternativa dos macrófagos (M2). Macrófagos M2, uma vez ativados, secretam altos níveis de IL-10 e TGF- β para controlar a inflamação, além de desempenhar importante papel no reparo e remodelamento tecidual, a fim de recuperar a homeostase do organismo (Shapouri-Moghaddam 2018, Kloc 2019). Na infecção por *Leishmania*, porém, a atividade dos macrófagos M2 é importante para a sobrevivência do parasito (Abdoli, Maspi et al. 2017, Carneiro, Vaz et al. 2021). Seria, então, um antagonismo, o fato de que o controle de LC envolvendo ativação de ação leishmanicida dos macrófagos, que depende de M1, ocorra ao mesmo tempo que se deseja recuperação e remodelamento tecidual com o mínimo de descaracterização do tecido afetado, o que depende de M2. Nesse caso, é interessante que o composto faça esse efeito de recuperação tecidual e, ao mesmo tempo, prejudique o parasito. Para isso, talvez seja interessante que a droga não ative M1, se comportando como agente prejudicial à infecção por *Leishmania* de forma independente da ativação desse tipo de macrófago. É interessante destacar isso, considerando que o extrato não induziu produção de NO ou de TNF- α nos experimentos de estímulo de macrófagos *in vitro*, mas levou à redução de número de amastigotas/100 macrófagos e de percentual de macrófagos infectados em 24 h de tratamento com a droga.

Considerando a importância dos macrófagos tanto no controle da infecção por *Leishmania* quanto no processo de reparo tecidual, um potencial tratamento deve garantir a viabilidade pelo menos parcial dessas células. A Organização Internacional de Padronização considera citotóxicos os compostos que desencadeiam redução de mais de 30% da viabilidade celular (ISO 2009). Consoante com as informações apresentadas e os resultados do presente estudo, o extrato de *B. orellana* na concentração de 0,25% garantiu níveis favoráveis de viabilidade dos macrófagos, e essa dose pode ser promissora em situações que necessitam tanto de controle da infecção quanto de reparo tecidual.

No ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH \cdot , o extrato, nas concentrações 0,5%, 0,25% e 0,125%, mostrou potencial efeito antioxidante, uma vez que foi capaz de inibir em torno de 60% o radical livre DPPH \cdot , resultado semelhante ao obtido pelo

controle BHT na concentração aproximada de 100 µg/mL. Experimento feito com extrato metanólico de folhas de *B. orellana* L. na concentração de 22,36 µg/mL mostrou inibição de 50% dos radicais no ensaio DPPH (Shilpi, Rahman et al. 2006), corroborando os resultados acima. O DPPH é um radical livre estável e sua cor muda de violeta para amarelo quando uma substância antioxidante doa um átomo de hidrogênio ou transfere um elétron para a molécula DPPH·. Dessa maneira, ela se torna uma molécula estável, originando a forma DPPH-H. Substâncias capazes de realizar essa reação podem ser consideradas antioxidantes e sequestradoras de radicais livres (Oliveira 2015).

O estresse oxidativo é implicado na patogênese de diversos distúrbios e na progressão de muitas doenças como resultado do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes (Aruoma 1998, Forman 2021). As ROS podem interagir com proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos, resultando em danos nos sistemas biológicos (Reverte 2022). Na LC, as ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) produzidas por macrófagos M1 infectados e ativados constituem uma importante defesa do hospedeiro na eliminação das formas amastigotas intracelulares, além de induzir vias de sinalização associadas à inflamação e às respostas imunes. Entretanto, além de provocar a morte do parasito, esses intermediários também induzem dano oxidativo às células não infectadas e, portanto, um balanço entre a geração de ROS e RNS e as defesas antioxidantes do hospedeiro podem contribuir positivamente no sucesso do tratamento de LC (Kocyigit 2005, Ozbilge 2005, Reverte 2022).

As propriedades farmacológicas de extratos vegetais, em particular os óleos essenciais, tem sido explorada quanto ao potencial leishmanicida (Braga, Bouzada et al. 2007, da Silva 2020, Houël 2022). O extrato hidroalcolico de *B. orellana* reduziu em 50% formas promastigotas e formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* nas respectivas concentrações de $22,1 \pm 0,05$ e $9,1 \pm 0,6$ µg/mL (Garcia, Monzote et al. 2011). Resultado semelhante foi observado utilizando óleo essencial de *B. orellana* contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (IC_{50} : $8,5 \pm 0,8$ – Monzote, Garcia et al. 2014). No presente estudo, o extrato avaliado não apresentou efeito citotóxico contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, entretanto reduziu significativamente a carga parasitária *in vitro* na concentração de 0,25%. O tratamento com o extrato nessa concentração por 24 horas proporcionou a redução de 67,5% do número de amastigotas em 100 unidades de macrófagos avaliados e de 53,9% do número de macrófagos infectados.

Na LC, uma resposta imune protetora depende da indução do perfil Th1 e de suas citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-12, IFN- γ , IL-1 α e TNF- α , que leva à ativação

dos macrófagos M1. Estes, uma vez ativados, catalisam L-arginase para a produção de NO, componente tóxico que provoca a morte do parasito dentro do macrófago (Abdoli, Maspi et al. 2017, Scorza, Carvalho et al. 2017). No presente estudo, os resultados sinalizam que a ação do extrato de *B. orellana* pode não estar relacionada com a ativação das vias microbicidas do macrófago, uma vez que não foi observada produção significativa da citocina TNF- α e não houve produção detectada de NO. No entanto, o extrato pode exercer outros mecanismos de controle da infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, talvez como ação citotóxica no macrófago e, ou ação direta nas amastigotas intracelulares. A citocina IL-10 também não foi detectada no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* tratados com as diferentes concentrações de *B. orellana*. O extrato, portanto, não interfere nos macrófagos, tanto na produção de TNF- α como de NO, como foi explicado acima, nem na regulação de resposta imune, que poderia ser mediada pela produção de IL-10. Se IL-10 fosse produzida, por um lado estaria inibindo resposta Th1, talvez prejudicando o controle da infecção, mas, por outro lado, estaria auxiliando no reparo tecidual. Apesar disso, considerando paralelamente o efeito antiparasitário do extrato sobre amastigotas intracelulares, esses resultados são bom prognóstico para o uso, por exemplo, de tratamento tópico com o intuito de auxiliar no controle da carga parasitária e no auxílio do processo de cicatrização de uma preparação que, *in vivo*, já é demonstrada por ter efeito cicatrizante e comercializada para este fim.

7. CONCLUSÃO

Nos testes *in vitro* realizados no presente estudo, o extrato de *B. orellana* avaliado demonstrou potencial terapêutico que possa contribuir no tratamento de lesões de LC. O extrato na concentração de 0,25% e tratado por 24 horas apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e foi capaz de reduzir em aproximadamente 60% a carga parasitária nessas células. Além disso, nessa mesma concentração, o extrato apresentou potencial antioxidante capaz de inibir em torno de 60% o radical livre DPPH·.

Os resultados sinalizam que a redução da infecção *in vitro* por *L. braziliensis* possa estar relacionada a um efeito citotóxico do extrato sob os macrófagos e, ou uma ação direta sob as amastigotas intracelulares e não pela ativação das vias microbicidas dos macrófagos. Essa hipótese é suportada pelo fato de não ter sido detectada produção de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e de ter ocorrido produção não significativa da citocina TNF- α .

Esses resultados, aliados ao poder cicatrizante do composto, sugere seu uso in vivo em lesões causadas por L. braziliensis objetivando o controle parasitário e melhoria no aspecto da lesão, uma abordagem que pode ser testada posteriormente com aplicações tópicas da pomada no tecido infectado, em paralelo ou não com tratamento convencional. Tal abordagem pode ser feita incluindo testes com uso de quantidades reduzidas de drogas atualmente utilizadas no tratamento de LC ou verificando a possibilidade de redução do tempo de tratamento com essas drogas se administradas concomitantemente com o tratamento tópico com o extrato.

8. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

A LC é a forma clínica mais frequente das leishmanioses com cerca de 1 milhão de casos globais reportados anualmente. É também a forma clínica que mais ocorre no Brasil e de grande importância para a saúde pública devido à sua magnitude com relação ao número de casos e por estar associada a estigma social. Atualmente, no Brasil, o tratamento padrão indicado para a LC e disponibilizado pelo SUS tem como objetivo resolver o processo infeccioso sem, porém, apresentar efeitos positivos no reparo tecidual e garantir melhora no aspecto estético da cicatriz. Somado a isso, o tratamento padrão apresenta elevada toxicidade envolvida em efeitos colaterais significativos, além de estudos mostrarem certa resistência dos parasitos ao tratamento.

A busca por tratamentos alternativos é, portanto, urgente e necessária. Um tratamento ideal deve atuar de forma holística sobre a doença, considerando a resolução do processo infeccioso, bem como contribuir para os aspectos estéticos das cicatrizes e, conseqüentemente, reduzir os impactos psicossociais negativos na vida dos indivíduos afetados. O extrato de *B. orellana* avaliado demonstrou potencial terapêutico *in vitro*, que nos leva a propor as seguintes perspectivas:

- Avaliar o efeito leishmanicida do extrato de *B. orellana* em modelo de infecção *in vivo* por *L. braziliensis*, bem como o reparo tecidual e os aspectos estéticos promovidos pelo tratamento;
- Verificar o perfil de produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4) por esplenócitos induzido na infecção de camundongos por *L. braziliensis* após tratamento com extrato de *B. orellana*;
- Avaliar o efeito do extrato de *B. orellana* nas vias de sinalização que levam a diferenciação dos macrófagos nos perfis M1 e M2.
- Avaliar o uso tópico do extrato de *B. orellana* em lesões de LC como terapia única ou associada à terapia padrão com antimonial pentavalente ou anfotericina B, considerando o tempo de resolução, a possível diminuição de dose das drogas padrão administradas e o aspecto do tecido pós-cicatrização.

REFERÊNCIAS

ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF-beta. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 51, p. 15-26, Apr 2017. ISSN 1878-1667.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 72, n. 2, p. 199-212, 1998.

AKHOUNDI, M, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

BENNIS, I. et al. "The mosquitoes that destroy your face". Social impact of Cutaneous Leishmaniasis in South-eastern Morocco, A qualitative study. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189906, 2017. ISSN 1932-6203.

BENNIS, I. et al. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: a scoping review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 358, Mar 15 2018. ISSN 1471-2458.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 396-402, May 4 2007. ISSN 0378-8741.

BRASIL, M. D. S. **Manual Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. SAÚDE, S. D. V. S. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, M. D. S. **Manual Vigilância Leishmaniose Tegumentar Americana**. SAÚDE, S. D. V. E. Brasília, DF: Karla Gentil; Mara Pamplona; Lilian Assunção; Fernanda Souza, 2010.

CAPELLA, S. O. et al. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104-112, 2016. ISSN 0102-0935.

CARNEIRO, M. B. et al. Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, p. 155309, Nov 2021. ISSN 1096-0023.

CASTILLO, L. P. et al. Antifungal Activity of Ethanol-extracted *Bixa orellana* (L) (Achiote) on *Candida albicans*, at Six Different Concentrations. **J Contemp Dent Pract**, v. 20, n. 10, p. 1159-1163, 2019.

DA SILVA, et al. Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1392 - 1407, November 2020 2020.

FALEIRO, R. J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FORMAN, H. J. Z., H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.

FREITAS, V. C., et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606–612, 2012.

GARCIA, M. et al. Effect of *Bixa orellana* against *Leishmania amazonensis*. **Forsch Komplementmed**, v. 18, n. 6, p. 351-3, 2011. ISSN 1661-4127.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HOUËL, E. G., M.; AZAS, N.; BOURREAU, E.; EPARVIER, V.; HUTTER, S.; KNITTEL-OBRECHT, A.; JAHN-OYACA, A.; PRÉVOT, G.; VILLAG, P.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; ODONNEI, G. Treating leishmaniasis in Amazonia, part 2: Multi-target evaluation of widely used plants to understand medicinal practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 289, 2022.

KATO, K. C. et al. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 481-8, 2014. ISSN 1098-6596.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatol Clin**, v. 33, n. 3, p. 579-93, Jul 2015. ISSN 1558-0520.

KLOC, M. G., R.M.; WOSIK, J.; LEWICKA, A.; LEWICKI, S.; KUBIAK, J.Z. Macrophage functions in wound healing. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 99-109, 2019.

KOCYIGIT, A. K., H.; SELEK, S.; GUZEL, S.; CELIK, H.; EREL, O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mutation Research** v. 585, p. 71-78, 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

MACHIN, L. et al. *Bixa orellana* L. (Bixaceae) and *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) Essential Oils Formulated in Nanocochleates against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 24, n. 23, Nov 20 2019. ISSN 1420-3049.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014. ISSN 1460-2393.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. **Phytother Res**, v. 28, n. 5, p. 753-8, May 2014. ISSN 1099-1573.

MSOMI, N. Z.; SIMELANE, M. B. C. **Herbal Medicine**. BUILDERS, P. F. 2018.

NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Trop**, v. 155, p. 113-23, Mar 2016. ISSN 1873-6254.

NYLEN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 12, p. 551-61, Dec 2012. ISSN 1365-3024.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OPAS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Ana Nilce Silveira Maia-Elkhoury; Samantha Yuri Oshiro Branco Valadas; Santiago Nicholls; Lia Puppim Buzanovsky. Aug 2019.

ÖZASLAN, M.; OGUZKAN, S. B. Use of Plant Extracts in Alternative Medicine. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 21, p. 1-7, 2018.

OZBILGE, H. A., et al. Evaluation of Oxidative Stress in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Dermatology**, v. 32, p. 7-11, 2005.

PACHECO, S. J. B. et al. Estigmatização social pela leishmaniose cutânea no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Reciis – Rev Eletron Comun Inf Inov Saúde**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2017. ISSN 1981-6278.

PIRES, M. et al. The impact of leishmaniasis on mental health and psychosocial well-being: A systematic review. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0223313, 2019. ISSN 1932-6203.

REVERTE, M. S., T.; FASEL, N. The Dangerous Liaisons in the Oxidative Stress Response to *Leishmania* Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 1-17, 2022.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2015.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 18 2017. ISSN 1422-0067.

SHAHID UL, I.; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. **J Adv Res**, v. 7, n. 3, p. 499-514, May 2016. ISSN 2090-1232.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. M., S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J.T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SHILPI, J. A. et al. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, 2006.

TAGNE, M. A. F. et al. Evaluation of Anticolitis and Antioxidant Properties of *Bixa orellana* (Bixaceae) Leaf Hypermetabolic Extract on Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis in Rats. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 97, n. 100685, p. 1-8, 2022.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology** v. 47, p. 109-124, 2008.

TURAN, E. et al. Assessment of psychiatric morbidity and quality of life in children and adolescents with cutaneous leishmaniasis and their parents. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 32, n. 5, p. 344-8, Oct 2015. ISSN 1642-395X.

UL BARI, A.; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: An overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 18, p. 42–48, 2008.

VILAR DE, A. et al. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. **ScientificWorldJournal**, v.2014, p.1-11, 2014. ISSN 1537-744X.

WHO. Control of the leishmaniases. **WHO technical report**. Series 949, 2010.

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly Epidemiological Record**. Switzerland: José Antonio Ruiz-Postigo; Lise Grout; Saurabh Jain. v.25, p.265-280, 2020