



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ELIANE ALVES BANDEIRA DE CARVALHO

**POTENCIAL FARMACOLÓGICO E VALIDAÇÃO DO USO SEGURO DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia pohliana* DC. E *Verbesina macrophylla*
(Cass.) S.F. Blake ORIUNDAS DA FLORA DA CAATINGA**

Recife
2023

ELIANE ALVES BANDEIRA DE CARVALHO

**POTENCIAL FARMACOLÓGICO E VALIDAÇÃO DO USO SEGURO DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia pohliana* DC. E *Verbesina macrophylla*
(Cass.) S.F. Blake ORIUNDAS DA FLORA DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas
Biológicos

Orientadora: Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Dr^a. Marta Gerusa Soares de Lucena

Recife

2023

Carvalho, Eliane Alves Bandeira de.

Potencial farmacológico e validação do uso seguro dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia pohliana* dc. e *Verbesina macrophylla* (cass.) s.f. blake oriundas da flora da caatinga / Eliane Alves Bandeira de Carvalho. - Recife, 2023.

119 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2023.

Orientação: Márcia Vanusa da Silva.

Coorientação: Marta Gerusa Soares de Lucena.

Inclui referências e apêndice.

1. Atividade antioxidante; 2. Bioma tipicamente brasileiro; 3. Citotoxicidade; 4. Leishmania; 5. Plantas medicinais. I. Silva, Márcia Vanusa da. II. Lucena, Marta Gerusa Soares de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ELIANE ALVES BANDEIRA DE CARVALHO

**POTENCIAL FARMACOLÓGICO E VALIDAÇÃO DO USO SEGURO DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia pohliana* DC. E *Verbesina macrophylla*
(Cass.) S.F. Blake ORIUNDAS DA FLORA DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wendeo Kennedy Costa
Universidade federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais, Petronilo Alves Bandeira e Maria Januária Bandeira, que me proporcionaram amor e cuidado incondicionais durante sua passagem aqui na Terra. Eles sempre ressaltaram a educação como o legado mais importante que poderiam nos deixar. Também dedico aos meus filhos, Rafael Víctor e Pedro Víctor, pelo apoio constante e por nunca terem soltado a minha mão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar por todo o período de minha existência! Sem a fé em dias melhores, perde-se o sentido!

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial aos que fazem parte do Programa de Pós-graduação de Ciências Biológicas, pela acolhida e os valiosos conhecimentos transmitidos. O meu muito obrigada a nossa eterna secretária e amiga particular, Adenilda Eugênia, você sempre será necessária.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação de Biociências, prof. Dr. Thiago Napoleão, agradeço pela compreensão, gentileza, disponibilidade e profissionalismo.

Ao corpo docente e técnico administrativo do Departamento de Histologia e Embriologia, por tornar o local de trabalho um ambiente acolhedor e familiar. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Bruno Tenório, pela compreensão no período de confecção da Tese, e a Profa. Dra. Fernanda Tenório pela disponibilidade do uso do microscópio, essencial para realização das fotografias de embriotoxicidade.

A Profa. Dra. Eliete Cavalcanti, pessoa chave na execução deste projeto, pela amizade, dedicação, profissionalismo, paciência, credibilidade e competência. Obrigadão!

A minha coorientadora, Profa. Dra. Marta Gerusa, por ser um presente nesse momento tão desafiador, agradeço pelo acolhimento, competência, sensibilidade e carinho nesta jornada.

Ao amigo Paulo Gomes, do Departamento de Histologia e Embriologia, pela valiosa colaboração nos procedimentos de preparação e emblocamento dos embriões.

A Profa. Dra. Falba Bernadete dos Anjos, o meu muito obrigada pelo apoio na realização do Ensaio da Membrana Corioalantóica, pela gentileza e atenção dispensadas.

A Pesquisadora Dra. Regina Bressan, por tantos anos de amizade e por estar sempre à disposição, obrigada por tudo. Também agradeço ao Dr. Vanderlan Nogueira pela sua notável contribuição na análise *in silico* dos óleos essenciais e à Regina pelo seu valioso direcionamento na interpretação dos resultados.

A Profa. Dra. Tereza Correia, por compor, com excelência, o corpo docente

desta instituição! Ter a honra de sua presença como professora durante meu Doutorado, bem como membro da minha banca de Mestrado há 20 anos, e agora, novamente, como parte da minha banca de Doutorado, marca um ciclo de aprendizado e crescimento inestimável.

Aos Pesquisadores Drs. Luiz Alves e Fábio Brayner, amigos de longa data, e Dr. Gabriel Gazzone, expresso minha gratidão pelo apoio fundamental na realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Departamento de Antibióticos em nome da Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, que me acolheu em seu Laboratório, num momento tão crucial de Pandemia e da minha querida amiga, Profa. Dra. Silene Carneiro, que viabilizou minha estadia no Departamento. A Dra. Maria Rodrigues e Me. José Rivaldo, pelos ensinamentos tão valiosos, amizade, dedicação e presteza.

À Dra. Elizabeth Borba, pelas valiosas sugestões, apoio constante, amizade e inúmeras contribuições que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica, Paloma, Bruno, João, Jucielma e Wesley, pelo carinho e apoio necessários ao desenvolvimento de parte dos experimentos desta pesquisa. Em especial à Wendeo Costa, que Deus te retribua em dobro tudo o que fazes de coração limpo. Obrigadão gente!

A minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Vanusa, pelo amor à Ciência e dedicação ao nosso tão sofrido Sertão (Caatinga), e por esse coração enorme que abraça, orienta e cuida, agradeço por tudo. Sinto-me privilegiada por ser sua orientanda.

A minha colega de turma e grande amiga Maria Isabel, gente do bem, o meu muito obrigada pela troca de experiências, apoio e por me fazer lembrar que esse caminho é árduo, mas não estamos sozinhos!

A Thiago Felix, meu amigão, por tantos momentos bons compartilhados, pelo suporte dado com os experimentos de Embriotoxicidade, uma sumidade no que faz!

A todos os meus amigos com quem fortaleci laços ao longo de minha vida e nos anos de Universidade Federal de Pernambuco, pela cumplicidade, amizade e carinho compartilhados, tanto no âmbito pessoal, profissional quanto acadêmico.

À minha família, aos irmãos que amo, que sempre me incentivaram com palavras firmes, repletas de muito amor e confiança.

À minha querida mãezinha, que partiu deixando uma lacuna intransponível,

mas cuja presença permanece viva em nossas doces lembranças. Seus ensinamentos, seu amor e dedicação, e o legado de respeito, perseverança, empatia, acolhimento, humildade e determinação continuam a nos guiar.

Aos meus filhos Rafael Víctor e Pedro Víctor, que são o motivo pelo qual continuo firme e presente.

Expresso meu profundo agradecimento a todos que estiveram ao meu lado e me acompanharam nesta jornada.

TEMPO SENHOR DE TODAS AS HORAS

O imperceptível tempo
Tempo senhor de todas as horas
Tempo de dormir, tempo de acordar
Tempo que nos embala nas voltas que
essa vida dá

E em tudo ele quer mandar
E ainda pedes que eu dê tempo ao
tempo
E o tempo rindo segue a me levar
E na correnteza, velejo na incerteza de
onde tudo isso vai dar
Quando acordo, já se foi o tempo
Nem o vi passar

Vou seguindo o fluxo
Vou gastando as horas
Guardando na memória
O que ficou por lá

E a cada segundo que marcou a vida
Que sangrou a alma
Eu dou um grande viva
Eu estava lá

Eu vivi de fato
Eu costurei à mão
Cada abraço amigo
Cada afeto dado
E dos meus retalhos
Tracei o meu destino
Sigo bem tranquilo
Não me avexo não

Eliane Bandeira (Nana de Carvalho)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença de relevância em saúde pública, cujos tratamentos atuais apresentam limitações como toxicidade, alto custo e resistência parasitária, tornando urgente a busca por novas terapias mais seguras e eficazes. Nesse contexto, compostos naturais de plantas medicinais despontam como alternativas promissoras. *Eugenia pohliana* e *Verbesina macrophylla*, nativas da Caatinga e amplamente utilizadas pela população local, têm demonstrado potencial farmacológico em estudos científicos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar as atividades leishmanicida, antioxidante, citotóxica e embriotóxica dos óleos essenciais extraídos dessas espécies. *Eugenia pohliana* e *Verbesina macrophylla*, apresentaram atividade antileishmania significativa, com valores de IC₅₀ entre 14,47–44,60 µg/mL para *E. pohliana* e 36,09–178,40 µg/mL para *V. macrophylla*. *E. pohliana* também mostrou inibição de 82,08% no ensaio CAT, embora não tenha sido eficaz nos testes antioxidantes DPPH e ABTS. Ambos os óleos essenciais demonstraram citotoxicidade contra várias linhagens tumorais humanas. Além disso, testes em embriões de *Gallus gallus domesticus* indicaram alterações no tubo neural e na formação vascular, principalmente com *V. macrophylla*, destacando a importância de avaliações toxicológicas. Os resultados reforçam o potencial terapêutico multifuncional dessas plantas, desde que acompanhadas de estudos de segurança.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Bioma tipicamente brasileiro. Citotoxicidade. *Leishmania*. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease of significant public health concern, particularly due to the limitations of current treatments, which include high toxicity, elevated costs, prolonged therapy duration, and emerging parasite resistance. In this context, natural compounds derived from medicinal plants emerge as promising alternatives. *Eugenia pohliana* and *Verbesina macrophylla*, native to the Brazilian Caatinga and widely used in traditional medicine, have shown pharmacological potential in previous scientific studies. Therefore, this study aims to evaluate the leishmanicidal, antioxidant, cytotoxic, and embryotoxic activities of essential oils extracted from these species. Both *E. pohliana* and *V. macrophylla* exhibited significant antileishmanial activity, with IC₅₀ values ranging from 14.47–44.60 µg/mL for *E. pohliana* and 36.09–178.40 µg/mL for *V. macrophylla*. *E. pohliana* also demonstrated notable inhibition (82.08%) in the CAT assay, although it showed no significant effects in the DPPH and ABTS antioxidant assays. Furthermore, both essential oils exhibited cytotoxic effects against various human tumor cell lines. Embryotoxicity tests using fertilized *Gallus gallus domesticus* eggs revealed alterations in neural tube width and vascular development, particularly in embryos exposed to *V. macrophylla*. These findings highlight the multifunctional therapeutic potential of these essential oils, while also underscoring the critical importance of comprehensive toxicological assessments, especially in sensitive biological contexts.

Keywords: Antioxidant activity. Typically. Brazilian biome. Cytotoxicity. *Leishmania*. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Eugenia pohliana</i>	25
Figura 2 -	<i>Verbesina macrophylla</i>	27
Figura 3 -	Distribuição geográfica de Leishmaniose visceral e Leishmania cutânea	29
Figura 4 -	Número de casos registrados entre os anos de 2001-2021 de leishmaniose visceral na Região das Américas	31
Figura 5 -	Fêmea adulta do flebotomíneo	34
Figura 6 -	Ciclo de transmissão da leishmaniose	34
Figura 7 -	Reação de redução do MTT para formazan	39

LISTA DE SIGLAS

OE's	Óleos essenciais
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido-sulfônico
TAC	Capacidade Antioxidante Total
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
UC	Unidade de Conservação
ha	hectares
Km ²	quilômetros quadrados
°C	graus celsius
µg/mL	microgramas por mililitros
IC ₅₀	Concentração Inibitória
FRAP	Poder de redução do ferro
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
LV	Leishmaniose Visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
LC	Leishmaniose Cutânea
DNA	Ácido desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	GERAL	17
2.2	ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	BIOMA CAATINGA	18
3.2	PLANTAS MEDICINAIS	24
3.2.1	Família Myrtaceae e Asteraceae	25
3.3	LEISHMANIOSES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICAS	28
3.3.1	Formas Clínicas da leishmaniose- Leishmaniose Visceral Humana 31	
3.3.2	Formas Clínicas da leishmaniose- Leishmaniose Tegumentar Americana- LTA (cutânea) e mucosa.....	32
3.3.3	Ciclo de vida do parasita Leishmania e Transmissão da Leishmaniose	343
3.3.4	Tratamento da leishmaniose	36
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	38
3.5	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	40
3.6	EMBRIOTOXICIDADE UTILIZANDO GALLUS GALLUS DOMESTICUS 41	
3.7	MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÃO DE GALINHA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ARTIGO 1	42
4.2	ARTIGO 2	57
4.3	ARTIGO 3	72
5	CONCLUSÃO	103
6	REFERÊNCIAS	105
7	APÊNDICE	119

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um dos maiores problemas de saúde pública das Américas, considerada uma doença tropical negligenciada, acometendo principalmente as populações de baixa renda de áreas rurais e urbanas (Who, 2012, Luna *et al.*, 2019). A pesquisa e o investimento para a prevenção, diagnóstico e o tratamento dessas doenças que apresentam altos índices de morbidade e mortalidade têm sido negligenciados historicamente (Kaye *et al.*, 2020).

Atualmente, não existe nenhuma vacina para leishmaniose humana e a vacina disponível para a leishmaniose canina que está no mercado não foi incorporada aos programas de saúde básica (Kelleci *et al.*, 2023). O arsenal terapêutico no tratamento das leishmanioses é restrito a quimioterápicos extremamente tóxicos, de eficácia limitada e de custo elevado, não havendo interesse das indústrias farmacêuticas na descoberta de novos fármacos. Com a ausência de compostos que sejam mais seletivos para os parasitas e o surgimento de cepas resistentes, estudos de novos agentes terapêuticos são considerados relevantes sob o ponto de vista da saúde pública (Qian; Chen; Zhou, 2020, Nieto-Sanchez *et al.*, 2022).

Diante disso, faz-se necessário a investigação de novas substâncias como fontes alternativas e que apresentem alta atividade farmacológica e efeitos deletérios mínimos. Neste contexto, as plantas dispõem de várias substâncias fitoquímicas oriundas do seu metabolismo natural que apresentam em sua estrutura química princípios ativos, considerados verdadeiros oásis de moléculas bioativas para serem investigadas (Mcgwiew, 2014, Menezes, 2015, Luna, 2020).

Os óleos essenciais (OE's) são metabólitos secundários constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (König *et al.*, 2023). Na literatura existe uma vasta atividade biológica atribuída aos OE's, incluindo a ação antileishmania *in vivo* e *in vitro* de *Eugenia uniflora* (Rodrigues *et al.*, 2009; 2013); *Lippia sidoides* (Oliveira *et al.*, 2009); *Cymbopogon citratus* (Santin *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012); *Artemisia absinto* (Monzote *et al.*, 2014); *Aloysia gratissima* (Garcia *et al.*, 2018) e *Tetradenia riparia* (Terron-Monich *et al.*, 2019) sob as formas promastigota e/ou amastigota de espécies de

Leishmania considerados promissores ao desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida.

A caatinga é um bioma rico em espécies botânicas que apresentam uma gama de metabólitos secundários com as mais variadas atividades biológicas descritas na literatura: antimicrobiana (Santos *et al.*, 2018), anticancerígena (Ferreira *et al.*, 2023), antiparasitária (Almeida de Menezes *et al.*, 2023) e anti-inflamatória (da Silva *et al.*, 2023) atribuídas à extratos brutos, frações, compostos isolados e OE's.

Nessa premissa, as espécies *Eugenia pohliana* e *Verbesina macrophylla* tem apresentado atividades anti-inflamatórias (Costa *et al.*, 2016, Bezerra *et al.*, 2020, Grafakou *et al.*, 2021), antioxidantes (Celli *et al.*, 2011, Asker *et al.*, 2013, Lazzaroto *et al.*, 2021), antimicrobianas (de Souza *et al.*, 2018, Pereira *et al.*, 2022, Milutinović *et al.*, 2022) e antinociceptivas (Ahmed *et al.*, 2001, Falcão *et al.*, 2018, Veras *et al.*, 2019). No entanto, é necessário realizar novas investigações sobre suas propriedades antileishmanial, visando fornecer embasamento ao uso dessas espécies pela população.

Diante do exposto, visando contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos que apresentem eficácia para tratar as leishmanioses, faz-se necessário a busca por novas drogas que tenham ação contra essas endemias e apresentem uma abordagem terapêutica complementar para os processos inflamatórios desencadeados pelos parasitas (Hilaire *et al.*, 2022, Saki; Biranvand; Arjmand, 2022). Nesta perspectiva, os produtos naturais derivados de plantas da caatinga surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo das leishmanioses, aumentando dessa forma as chances de êxito da terapia leishmanicida, sendo este, o intuito principal deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as atividades leishmanicida, antioxidante, citotóxica e a embriotoxicidade de óleos essenciais extraídos das espécies oriundas da Caatinga: *Eugenia pohliana*, *Verbesina macrophylla*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade leishmanicida dos OE's através da determinação da IC₅₀ frente às cepas de *Leishmania amazonensis*; *L. infantum*; *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.
- Verificar as possíveis alterações morfológicas dos parasitas tratados com os OE's através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.
- Analisar o efeito antioxidante dos OE's no métodos DPPH, ABTS e CAT;
- Investigar o perfil citotóxico dos óleos essenciais (OE's) de *E. pohliana*, *V. macrophylla* frente às células neoplásicas pelo método do MTT;
- Avaliar a atividade embriotóxica dos compostos em embriões de *Gallus gallus domesticus* e a atividade angiogênica e vasculogênica pelo ensaio de Membrana Corioalantóica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOMA CAATINGA

O Brasil é o país detentor da maior biodiversidade global, com 6 biomas ricos em espécies diversificadas, com história evolutiva e ecológica única. O bioma de maior extensão é da Amazônia, seguido pelo Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal (IBGE, 2022). O Bioma Caatinga é encontrado exclusivamente no Brasil e compreende uma área de 826.411 km², recobrando 11% do território nacional, abrangendo todos os estados da região Nordeste do Brasil, além de parte do norte de Minas Gerais (EMBRAPA, 2021).

O bioma Caatinga no Brasil é caracterizado por ser a maior e mais contínua extensão da floresta tropical sazonalmente seca em todo o mundo, mas, ao mesmo tempo, enfrenta ameaças consideráveis e tem poucos estudos relevantes desta vegetação (Lima *et al.*, 2021, Silva *et al.*, 2023). As metas de conservação e pesquisas científicas são bastante negligenciadas em relação às florestas tropicais, culminando em uma lacuna na descrição de espécies existentes nesta região. Apesar de ocupar uma área considerável do território brasileiro, a área conservada por proteção ambiental perfaz apenas 8,9 % da superfície e apenas 1,3% dessa área faz parte de Unidades de Conservação (UC) com alto rigor de controle (Teixeira *et al.*, 2021).

Uma das características marcantes das plantas da Caatinga, desenvolvida para mitigar os impactos das adversidades ambientais, é o fenômeno de eliminação das folhas durante o período mais seco do ano, minimizando as perdas hídricas. Este fenômeno foi o que determinou o batismo deste bioma de Caatinga, pelos indígenas Tupi-guarani, devido ao aspecto esbranquiçado da paisagem com a queda das folhas, recebendo a alcunha de mata branca (Barbosa *et al.*, 2003, Araújo *et al.*, 2011, Fernandes-Queiroz, 2018).

A Caatinga é um bioma semiárido, com vegetação predominante de espécies vegetais xerófilas, que desenvolveram uma série de adaptações ao longo da evolução para sobreviver às intempéries ambientais. Como folhas reduzidas ou transformadas em espinhos, caules suculentos com capacidade de armazenamento de água, regulação estomática, que limita a perda de água durante os processos de transpiração. Estas plantas têm a capacidade de resistir

a elevadas temperaturas, períodos prolongados de seca, intensa evapotranspiração e limitações no que diz respeito ao crescimento, devido às particularidades do meio em que estão inseridas (Queiroz *et al.*, 2006, Brito *et al.*, 2017, Alves *et al.*, 2019).

A Caatinga apresenta três agrupamentos florísticos, caatinga do cristalino, caatinga arenosa e caatinga arbórea. A caatinga do cristalino, conhecida como depressão sertaneja, é caracterizada por solos férteis a moderados, a flora do cristalino sofreu considerável devastação por apresentar um solo de fácil cultivo, uma grande parte foi convertida em área agrícola e atividade pecuária. A vegetação original da região é preservada primordialmente em locais de pouca acessibilidade humana. Composta por plantas não lenhosas, de reprodução anual, totalizando 70% das espécies deste bioma (Moro *et al.*, 2014).

Em contrapartida Caatinga arenosa, está principalmente vinculada a solos arenosos, irregulares e inférteis, com plantas lenhosas de porte pequeno, nos últimos anos foram descritas espécies endêmicas, encontradas nas dunas do São Francisco, como *Pterocarpus monophyllus*, *Crotonarenosus*, *Diacrodon compressus* (Moro *et al.*, 2014, Queiroz *et al.*, 2018). A Caatinga arbórea é um agrupamento florístico que apresenta um solo fértil, com árvores altas e robustas, com perfil florestal que abriga uma boa parte de plantas restritas dessa região, como a *Aralia warmingiana*, *Cnidocolus oligandrus* e *Alseis floribunda* (Fernandes *et al.*, 2018).

Embora a Caatinga apresente uma rica biodiversidade, ela se encontra em risco devido ao crescimento da agricultura, pecuária, desmatamento exacerbado, invasão de plantas exóticas, sendo as regiões mais baixas as mais afetadas por modificações antrópicas (Salazar *et al.*, 2021). A insuficiência de recursos hídricos na região está relacionada às características físicas do ambiente, tais como solos superficiais, uma elevada taxa de evaporação, e a diminuição da vegetação e reconfiguração da estrutura social (De Andrade, 2017).

A caatinga apresenta longos períodos de estiagem, que pode atingir temperaturas de 60 °C, com pequenos intervalos de chuvas, caracterizando uma variação na fertilidade, textura e profundidade no solo deste Bioma. Só plantas altamente adaptadas conseguem crescer nessa região, por isso a singularidade

endêmica do bioma (Silva *et al.*, 2017). Recentemente o Relatório Anual de Desmatamento no Brasil (RAD) de 2022, do MapBiomas, apontou a Caatinga como o segundo bioma com maiores eventos de desmatamento, de acordo com o número de alertas deflagrados nesse período. Foram identificados 140.637 hectares (ha) desmatados, correspondendo a 22,2% de aumento em relação a 2021, com velocidade média de 385,3 ha/dia, onde as formações florestal e campestre sofreram maior impacto com o percentual de 9% de desmatamento (Mapbiomas, 2023).

No Nordeste brasileiro, uma grande parte das comunidades rurais inseridas na região da Caatinga baseiam sua subsistência na agricultura e na criação de animais, recorrendo ao potencial terapêutico das plantas nativas dessa região como única forma alternativa de tratamento para uma variedade de doenças (Santos *et al.*, 2018, Silva; Almeida, 2020).

As partes das plantas normalmente utilizadas para a preparação de medicamentos pela população nordestina são as folhas e as cascas do caule. Possivelmente, isso ocorre porque as folhas são mais acessíveis e o uso dessas estruturas ajuda a evitar a extinção da espécie. Por outro lado, a casca do caule pode ser extraída em qualquer período do ano, ao passo que as folhas caem durante o período seco da Caatinga (Guerra *et al.*, 2010, Albergaria *et al.*, 2019, Silva *et al.*, 2020, Rodrigues *et al.*, 2021). Esses achados são consistentes com pesquisas que destacaram o uso predominante de folhas e cascas na medicina tradicional da Caatinga (Baptistel *et al.*, 2014, Araújo *et al.*, 2021, Barbosa *et al.*, 2022).

Trabalhos anteriores comprovaram a eficácia de óleos essenciais isolados de *Croton argyrophyllus*, espécie comum na Caatinga e no Cerrado brasileiro, sobre larvas e fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. Dentre os componentes majoritários, encontram-se o (E)-cariofileno (15,41%) e o biciclogermacreno (10,43%). A atividade inibitória foi caracterizada por uma IC₅₀ de 0,31 mg/mL para larvas e de 5,92 mg/mL para adultos de *Aedes aegypti*, após 16 horas de incubação (Cruz *et al.*, 2017).

Estudo realizado com três espécies de plantas da Caatinga *Lippia gracilis*, *Lippia schaueriana* e *Croton conduplicatus*, conferiu as propriedades inseticidas dessas espécies contra larvas de *Liriomyza sativae*, principal praga da cultura do meloeiro, com redução da viabilidade das pupas e redução da

oviposição (Oliveira, 2020).

A atividade inseticida de plantas da Caatinga é amplamente mencionada por diversos autores. Em uma recente metanálise realizada por Carvalho et al. (2023), demonstrou-se sua eficácia inseticida nas diferentes formas evolutivas do *Aedes aegypti*, com valores de IC₅₀ de óleos essenciais baixíssimos (0,07-0,068 µg/mL). Os gêneros que se destacaram com melhor atividade inibitória foram *Abarema*, *Myracrodruon*, *Croton*, *Lippia* e *Syagrus*. Estudos que delineiam as propriedades inseticidas das plantas da Caatinga, são fundamentais no contexto da eliminação de vetores invertebrados responsáveis por doenças negligenciadas, como o caso da *Lutzomyia longipalpis* nas leishmanioses.

O levantamento etnobotânico realizado na região da Caatinga, na comunidade de Angico de Cima (Ceará), identificou o potencial farmacológico de diversas espécies de plantas locais e a importância do conhecimento popular atribuído, destacando a atividade antiparasitária das espécies *Acantbosperrum* sp, *Heliotrópio indicum*, e *Astronium fraxinifolium*, que são utilizadas tradicionalmente no tratamento de tuberculose e do sarampo (Santos et al., 2018).

A *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir, facilmente encontrada na Caatinga, popularmente conhecida com jurema preta é usada tradicionalmente no semiárido nordestino no tratamento de psoríase, sarna, bronquite, tosse, úlceras externas, como anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante em geral. Há também relatos do seu potencial teratogênico por ingestão de chás e estudos *in vitro* evidenciaram má formação congênita de filhotes de ratas prenhas (Silva et al., 2021, Santos et al., 2022). Esses relatos reafirmam a necessidade da análise prévia do potencial embriotóxico de plantas utilizadas na medicina tradicional.

A *Selaginella convoluta*, conhecida popularmente como "jericó", é uma planta que tem sido tradicionalmente utilizada como antitussígeno, analgésico, bactericida, diurético, antidepressivo e no tratamento de sangramentos, além de ser empregada para tratar inflamações em geral (Fernandes et al., 2015). Em experimentos realizados por Oliveira-Macêdo et al. (2020), utilizando o extrato etanólico da *S. convoluta* em camundongos, foi evidenciada uma significativa atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dessa planta, o que sugere um potencial uso fitoterápico.

Um estudo etnobotânico na Comunidade Santo Antônio, situada em

Currais, Piauí, com sua vegetação característica da Caatinga, revelou práticas locais de uso de plantas em diversas formas, como chás, xaropes, emplastos e garrafadas. A pesquisa destacou o uso de espécies da família Myrtaceae, como a *Eugenia dysenterica* DC, utilizada na prevenção de doenças intestinais, e a *Psidium guajava* L., empregada no tratamento de diarreia e emese. Além disso, espécies da família Asteraceae, como a *Gochnatia polymorpha* (Less), são usadas para infecções do aparelho geniturinário feminino, enquanto a *Vernonia condensata* Baker é aplicada em doenças hepáticas e a *Vernonia polysphaera* Less na intervenção de pneumonia, gripe e dores em geral (Baptistel *et al.*, 2014).

Na Caatinga, várias espécies nativas de plantas da família Asteraceae são utilizadas como tratamento alternativo pela população local. Segundo Magalhães *et al.* (2020), a *Blainvillea acmella* (L.) Philipson, também chamada de agrião-bravo, é utilizada como expectorante, depurativo e no tratamento de infecções de garganta. *Chaptalia nutans* (L.) Pol., ou língua-de-vaca, é reconhecida por suas propriedades antitumorais, depurativas e calmantes. *Vernonanthura brasiliiana* (L.) H. Rob., conhecida como assa-peixe, é utilizada no tratamento de catarata, enquanto *Solidago chilensis* Meyen, comumente chamada de arnica, é aplicada em machucaduras

Estudos anteriores destacam o potencial leishmanicida dos compostos isolados de duas plantas nativas do bioma Caatinga, *Platymiscium floribundum* e *Dimorphandra gardneriana*. Os compostos fenólicos foram mais seletivos contra as formas promastigotas, com IC₅₀ de 21,4 µg/mL a 30,3 µg/mL, enquanto o flavonoide quercetina mostrou maior eficácia contra as formas amastigotas, com IC₅₀ de 10,6 µg/mL (Villa-Nova *et al.*, 2012).

A maior parte das plantas do bioma Caatinga possui uma rica composição de óleos essenciais bioativos. Estes são predominantemente obtidos a partir das folhas, que são renováveis, por um processo de extração sustentável que não compromete a viabilidade da espécie vegetal (Jugreet B. S. *et al.*, 2020). Este método respeita o equilíbrio ecológico e garante a preservação da biodiversidade local.

Óleos essenciais de quatro espécies de Croton (C.) autóctones da região Caatinga (*C. argyrophyloides*, *C. jacobinensis*, *C. nepetifolius* e *C. sincorensis*) apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de

Leishmania amazonensis, *L. infantum* e *L. braziliensis*. O *Croton nepetifolius*, apresentou melhor atividade inibitória frente a *Leishmania braziliensis* (IC_{50} de 9,08 $\mu\text{g/mL}$) e *L. amazonensis* (IC_{50} de 9,87 $\mu\text{g/mL}$). Todas as espécies apresentaram mesmo potencial inibitório contra *L. infantum* e baixa citotoxicidade frente a macrófagos AMJ2-C11. Um dos componentes principais do *Croton nepetifolius* é o β -cariofileno, composto majoritário de *Eugenia pohliana*, objeto de estudo desta pesquisa (Morais, 2019).

São bem caracterizadas as atividades biológicas da *Eugenia brejoensis*, uma espécie da família Myrtaceae, popularmente conhecida como 'cutia', nativa dos Brejos de Altitude na região semiárida de Pernambuco (Caatinga). Tradicionalmente, suas folhas, frutos e ramos são empregados em decocções e infusões pela medicina popular local para tratar problemas intestinais, febre e reumatismo. Além disso, estudos científicos têm destacado as propriedades biológicas do óleo essencial desta planta, incluindo efeitos analgésicos, antioxidantes, antibacterianos, antibiofilme, anti-inflamatórios e tripanocidas (Celli *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2015, Veras *et al.*, 2019, Bezerra *et al.*, 2020, Santana, 2020, Pereira *et al.*, 2022).

A compreensão dos biomas brasileiros é fundamental para o estudo da etnofarmacologia, visto que as diversas regiões do Brasil abrigam uma rica biodiversidade de plantas com potencial terapêutico. É importante preservar e valorizar principalmente, o bioma Caatinga, que é exclusivamente brasileiro, não apenas por suas peculiaridades naturais, mas também pelo seu enorme potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias baseadas no conhecimento local (Heitor *et al.*, 2017, Queiroz *et al.*, 2018, Sá-Filho *et al.*, 2021).

Este bioma é pouco estudado por ser descrito erroneamente como uma região pobre, de poucas espécies, principalmente endêmicas, o que reflete na subnotificação da riqueza de plantas com potencial biológico dessa área biogeográfica do nordeste brasileiro. Valorizar a Caatinga é essencial para explorar sua biodiversidade desconhecida e promover a conservação desse ecossistema único.

3.2 PLANTAS MEDICINAIS

Registros históricos indicam que a utilização de plantas medicinais remonta às civilizações mais antigas, representando o primeiro meio empregado pelo ser humano para mitigar e tratar doenças. Essa tradição perdura até os dias atuais, sendo transmitida pela cultura popular ao longo das gerações, impulsionada pela fácil acessibilidade, custo reduzido e eficácia comprovada (Schmidt *et al.*, 2012). Os produtos naturais oriundos de plantas medicinais, são reconhecidos por suas potenciais aplicações como medicamentos terapêuticos, uma vez que desempenham um papel significativo na identificação e elaboração de novos medicamentos a partir de suas composições químicas (Pedroso; Andrade; Pires, 2021).

A diversidade e complexidade da composição química das plantas decorrem da presença de uma mistura singular de compostos com propriedades medicinais, tais como os metabólitos secundários. Entre esses componentes, destacam-se flavonoides, terpenos, alcalóides, taninos e óleos essenciais, conferindo às plantas uma ampla gama de atividades terapêuticas (Silva *et al.*, 2018). A utilização de plantas para promover a saúde tem se desenvolvido, abrangendo desde métodos simples, como tratamento tópico, até processos industriais (Wegener, 2017, Dias, 2018).

Dessa forma, a OMS tem proposto a inclusão de medicamentos à base de plantas em diversas terapias (Lima; Lima, 2021). Com isso, pesquisas têm se direcionado para a identificação de princípios ativos naturais, reconhecidos como fontes promissoras (Garzon *et al.*, 2021).

Considerando as vantagens do uso de produtos naturais, o Brasil tem apresentado a incorporação de medicamentos à base de plantas na prática terapêutica, aproveitando sua posição como detentor da maior biodiversidade global, com mais de 10% das plantas catalogadas no mundo (Badke *et al.*, 2019).

Nesse cenário, foram elaborados no Brasil, programas com o objetivo de integrar produtos terapêuticos à base de plantas medicinais na atenção básica do Sistema Único de Saúde (SUS). Isso resultou na criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), buscando impulsionar a pesquisa científica, melhorar os serviços de saúde, aumentar a resolutividade

e integrar novas abordagens terapêuticas (Brasil, 2009, Brasil, 2017).

Com isso, surgiram novas pesquisas destinadas a investigar os benefícios do uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades, abrangendo inclusive as doenças negligenciadas. Essa categoria de doenças engloba um conjunto de enfermidades que, em sua maioria, enfrenta limitados investimentos para o desenvolvimento de novos medicamentos, incluindo as leishmanioses (Silva *et al.*, 2018). Neste âmbito, a indústria farmacêutica manifesta um crescente interesse por meio de pesquisas acerca de plantas oriundas da Caatinga que apresentam potencialidades terapêuticas. A Caatinga destaca-se por seu ambiente semiárido e pela vegetação adaptada à escassez de água, sendo predominante na região Nordeste do Brasil (Sá-Filho *et al.*, 2021).

As plantas provenientes desse bioma desenvolvem características químicas singulares, tornando-as notáveis fontes de compostos com atividade biológica (Dos Santos *et al.*, 2023). Pesquisas etnobotânicas indicam que as espécies vegetais da Caatinga são frequentemente empregadas pela população local no tratamento de diversas doenças, incluindo aquelas resultantes de infecções em geral, como as espécies das famílias Myrtaceae e Asteraceae (Costa *et al.*, 2020, Lozano *et al.*, 2023).

3.2.1 Família Myrtaceae e Asteraceae

A família Myrtaceae, amplamente distribuída no bioma Caatinga, agrupa aproximadamente 5.500 espécies e 144 gêneros, distribuídos sobretudo nas zonas tropical e subtropical, com os principais centros de diversidade na região Neotropical, na Austrália e no sudeste da Ásia (Govaerts *et al.*, 2008, Wilson, 2011). Essa família botânica, é relatada como fonte de óleos essenciais responsáveis por conferir importantes benefícios à saúde (Macedo *et al.*, 2021). Um dos maiores gêneros da família Myrtaceae incluem *Eugenia*, que abrange em torno de 1.000 espécies (Mazine *et al.*, 2014), e contém óleos essenciais com propriedades antioxidantes (Franco *et al.*, 2021), cicatrizantes (Silva *et al.*, 2018), antimicrobianas (Bezerra Filho *et al.*, 2020), anti-inflamatórias e antinociceptivas (Costa *et al.* 2020).

Do mesmo modo, a família Asteraceae destaca-se como uma das mais biodiversas, englobando cerca de 1.600 gêneros e 25.000 espécies. Sua

abrangência geográfica é vasta, apesar de serem prevalentes em regiões áridas e semiáridas, estendendo-se por todo o mundo, adaptando-se a praticamente todos os tipos de habitat (Nikolić; Stevović, 2015). A maioria das espécies desta família possui aplicações terapêuticas e apresenta uma longa história na medicina tradicional (Rolnik; Olas, 2021). Arasan e Kaya, (2016) relatam o emprego de chá das espécies *Achillea aleppica* e *Achillea biebersteinii* para o alívio de desconfortos estomacais. Já as partes aéreas de *Chrysophthalmum montanum* podem ser fervidas e aplicadas para o tratamento de feridas.

Devido à sua rica biodiversidade, a família Asteraceae abriga uma ampla variedade de compostos fitoquímicos, que incluem polifenóis, ácidos fenólicos, flavonóides, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais, saponinas e lignanas, entre outros (Jafarinia; Jafarinia, 2019). Esses compostos são os responsáveis por conferir às espécies vegetais propriedades como anti-inflamatórias, antimicrobianas, atividades antioxidantes e hepatoprotetoras (Achika *et al.*, 2014).

3.2.1.1 *Eugenia pohliana*

Eugenia pohliana, conhecida popularmente como maçã do mato, é uma espécie que faz parte da família Myrtaceae (Figura 1). Essa planta, nativa do Brasil, é predominantemente encontrada em regiões elevadas da Caatinga (Júnior, 2014).

Figura 1: *Eugenia pohliana*



Fonte: Nascimento (2021)

Os estudos relacionados a *E. pohliana* são bastante limitados; no entanto, o gênero *Eugenia* é notável pela presença abundante de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides. Essas classes de substâncias são associadas a propriedades anti-inflamatórias (Costa *et al.*, 2016), antibacterianas e antioxidantes (Lazzaroto *et al.*, 2021), antifúngicas (de Souza *et al.*, 2018), e antinociceptivas (Falcão *et al.*, 2018).

Nascimento (2021), determinou a composição química do óleo essencial de folhas de *E. pohliana*, identificando em sua maioria compostos de natureza apolar como os sesquiterpeno, como (E)- β -cariofileno, δ cadinene, e α -cadinol e comprovou as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da espécie através dos ensaios biológicos.

Embora tenham sido realizadas algumas pesquisas iniciais sobre os compostos bioativos de *E. pohliana*, há uma carência significativa de informações e uma quantidade limitada de publicações científicas abordando tanto a composição química quanto os possíveis efeitos e aplicações farmacológicas dessa espécie.

Considerando os aspectos mencionados anteriormente, este estudo visa fornecer contribuições científicas sobre algumas propriedades farmacológicas do óleo essencial de *E. pohliana*. Vale ressaltar que o gênero *Eugenia* é reconhecido como uma fonte comprovada de metabólitos secundários utilizados na medicina popular, e várias ações dessa espécie já foram documentadas na literatura científica (Costa *et al.*, 2022, Nascimento *et al.*, 2022).

3.2.1.2 *Verbesina macrophylla*

A espécie *Verbesina macrophylla*, da família Asteraceae, é comumente denominada "assa peixe", "cambara branco" ou "cambara guaçu" e está presente em diversas regiões da América do Sul. Com distribuição confirmada no Nordeste brasileiro, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe. Além disso, é encontrada nos domínios fitogeográficos da Caatinga e da Mata Atlântica (Figura 2) (Flora e Funga do Brasil, 2021). Tradicionalmente empregada na elaboração de chás e infusões, essa espécie é reconhecida por seu potencial cicatrizante, utilizado no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas do trato urinário e respiratório, além de problemas renais,

inflamações e febre (de Veras *et al.*, 2021).

Estudos sobre a espécie *V. macrophylla* ainda são limitados, contudo, um trabalho conduzido por Veras e colaboradores (2021) se destacou ao extrair o óleo essencial das folhas dessa espécie. Os pesquisadores identificaram a presença de 31 compostos químicos, que representam aproximadamente 94 % da composição total do óleo. Dentre esses compostos, destacam-se sesquiterpenos, como o germacreno D, o germacreno D-4-ol, o biciclogermacreno, o (E)-cariofileno e o δ -cadineno.

Figura 2: *Verbesina macrophylla*



Fonte: Moreira (2023)

Os sesquiterpenos são responsáveis por uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades analgésicas (Ahmed *et al.*, 2001), anti-inflamatórias (Grafakou *et al.*, 2021), antioxidantes e antitumorais (Asker *et al.*, 2013), anticancerígena (Shams *et al.*, 2023), antimicrobianas (Milutinović *et al.*, 2022), antivirais (da Silva *et al.*, 2021) e antileishmanial (Girardi *et al.*, 2015).

A validação dessas atividades biológicas é crucial, pois oferece suporte à investigação de outras propriedades terapêuticas da espécie *V. macrophylla*, ao mesmo tempo em que fundamenta o seu reconhecido uso popular.

3.3 LEISHMANIOSES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICAS

As leishmanioses são patologias agrupadas em um grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) que afetam em número considerável as populações mais carentes e desfavorecidas em todo o mundo e que convivem com animais domésticos. Além desses fatores socioeconômicos, essa doença

infeciosa tem sido intensificada devido às condições precárias de saneamento básico e o pouco acesso da população aos serviços de saúde (Lisboa *et al.*, 2016, Burza *et al.*, 2018).

Ela é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* da ordem: Kinetoplastida e família: Trypanosomatidae. Geneticamente, esses parasitas possuem o seu material genético externo ao núcleo, dentro de uma organela mitocondrial especializada que é de extrema importância para a sobrevivência do parasita, conhecida como cinetoplasto (Do Monte-Neto, 2011).

Esse DNA extracelular, apesar de comum na ordem Kinetoplastida, configura uma vantagem importante no processo adaptativo dos parasitos ao ambiente que ele está, como a capacidade de resistir ao estresse oxidativo e de se proteger do sistema imunológico do organismo parasitado, instaurando dessa forma, o processo infeccioso (Balaña-Fouce *et al.*, 2014).

A leishmaniose também é considerada uma antropozoonose de grande preocupação para a saúde pública, encontrada em diferentes regiões do mundo, caracterizada por uma gama de manifestações clínicas. Ela ocupa a sexta posição das doenças negligenciadas, com um número de indivíduos infectados ultrapassando mais de 12 milhões de pessoas e prevalência estimada de 0,9 milhão de novos casos, resultando em cerca de 30 mil óbitos anualmente (Brasil, 2017, Who, 2022).

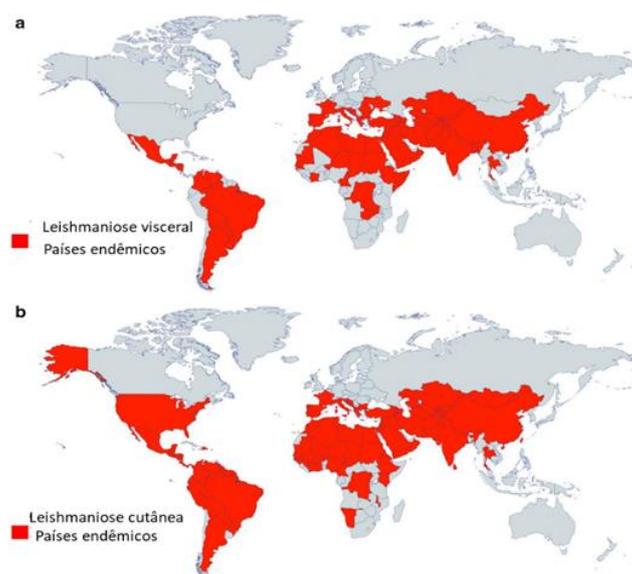
Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, as regiões ecoepidemiológicas que a leishmaniose está presente são as Américas, África Oriental, Norte da África e no Oeste e Sudeste Asiático. Apesar de ser uma patologia presente em 98 países e apresentar riscos para a saúde em mais de 1 bilhão de pessoas, em uma escala global, os países com maior incidência de casos são Índia, Sudão, Brasil, Etiópia e Somália (Dndi, 2020, Opas, 2022).

Entre as espécies abrigadas neste gênero, 22 espécies de protozoários tripanossomatídeos são considerados patogênicos para a população, dentre essas, 15 espécies são responsáveis pelas infecções notificadas nos seres humanos nas Américas (Opas, 2023). Vale salientar que, neste continente, as leishmanioses são transmitidas pela picada de insetos em um ciclo que envolve uma variedade de espécies de leishmânias, hospedeiros e vetores, influenciando verticalmente na epidemiologia da doença (Alexander; Russel, 1985, Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

Dependendo da linhagem de leishmania e do sistema imune do hospedeiro, as leishmanioses podem ser classificadas clinicamente por Leishmaniose visceral - LV, mucosa ou cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana- LTA) (Brasil, 2014, Gurung; Kanneganti, 2015). A patogenia dessas manifestações é influenciada pelas diferentes espécies de *Leishmania spp.*, sendo determinada por fatores genéticos e variações no ambiente. Adicionalmente, a resposta imunológica do hospedeiro também pode exercer um papel decisivo (Rossi; Fasel, 2018).

A figura 3 mostra a distribuição mundial dos países considerados endêmicos por leishmaniose visceral (a) e leishmaniose cutânea (b). No Brasil, as espécies de *Leishmanias* consideradas endêmicas são *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* (Sasidharan; Saudagar, 2021). Vale salientar que, algumas espécies do parasita apresentam maior afinidade pelos macrófagos da epiderme e derme, manifestando-se sob a forma clínica cutânea. Entretanto, quando este tropismo ocorre pelo tecido mucocutâneo a leishmaniose é caracterizada como mucocutânea, por fim, se ocorrer a afinidade pelo sistema reticuloendotelial a leishmaniose é caracterizada como visceral (Kulkarni *et al.*, 2014).

Figura 3: Distribuição geográfica de Leishmaniose visceral e Leishmania cutânea.



Fonte: Sasidharan; Saudagar (2021)

3.3.1 Formas Clínicas da leishmaniose- Leishmaniose Visceral Humana

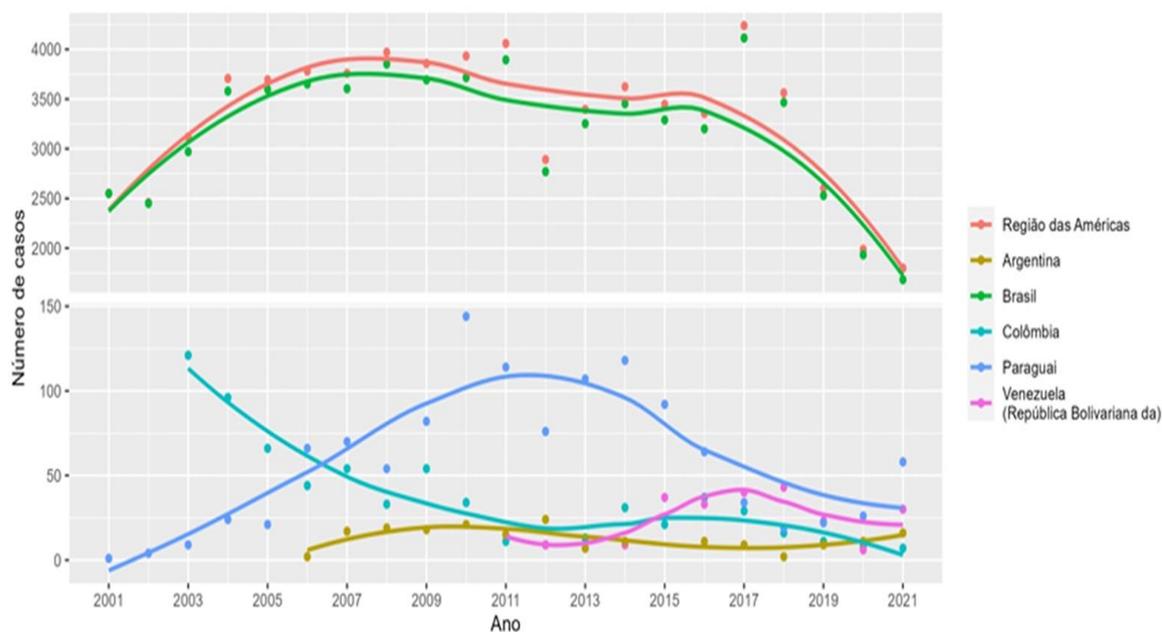
A *Leishmania Visceral* (LV) humana é uma patologia grave e severa que pode levar cerca de 85 - 90 % dos pacientes não tratados a óbito, apesar disso, ela pode ser prevenida e tratada (Ministério da Saúde, 2014). Classificada pelo Ministério da Saúde como de notificação compulsória, o registro dos casos suspeitos devem ser feitos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) como uma importante ferramenta para o controle da doença (Ministério da Saúde, 2014, Silva *et al.*, 2023).

Na América Latina, essa protozoose é transmitida pelos flebotomíneos da ordem Diptera, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* destacando-se como os principais vetores no Brasil as espécies *L. longipalpis*, principal vetor da *Leishmania chagasi*, e *L. cruzi* (Cruz *et al.*, 2021). Calazar, como também é conhecida, é transmitida habitualmente pela picada dos flebotomíneos fêmeas (mosquito-palha, birigui) infectados por parasitas leishmanias. Apesar de não transmitirem a Leishmaniose visceral (LV) para os humanos, nos centros urbanos, os cães são considerados verdadeiros hospedeiros e reservatórios da espécie *L. infantum*, por isso, quando os mosquitos se alimentam do sangue desses animais contaminados se tornam os vetores da LV (Benchimol, 2020, Silva *et al.*, 2023).

Entretanto, também existem outras formas de transmissão da leishmaniose visceral em humanos, como a transmissão vertical, nos procedimentos de transfusões de hemocomponentes e em acidentes ocupacionais com material biológico (Silva *et al.*, 2023). É considerada uma doença infecciosa sistêmica grave de ocorrência mundial e endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Brasil, 2014).

Segundo os dados epidemiológicos notificados pela OPAS (2022), entre os anos de 2001-2021 houveram 69.665 casos de LV. Entretanto, em 2021 houve um decréscimo dos casos de LV com uma redução de 9,5 % em relação a 2020 e de 57 % quando comparado com o ano de 2017, que foi considerado o ano de maior incidente (Figura 4).

Figura 4: Número de casos registrados entre os anos de 2001-2021 de leishmaniose visceral na Região das Américas.



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados notificados pelos programas nacionais de leishmanioses/ serviços de vigilância (2022)

Apesar desses dados epidemiológicos, em 2021 as cinco maiores taxas de incidência de LV ainda foram registradas no Brasil com mais de 2.520 novos casos de LV, com uma taxa de incidência de aproximadamente 1,2 casos a cada 100 mil habitantes, totalizando 93,5 % dos casos notificados. A região nordeste se destaca como responsável pelo maior número de registros no país, contribuindo com 49,1% dos casos. As cidades que apresentaram o maior número de casos de LV foram Fortaleza (Ceará), Belo Horizonte (Minas Gerais), São Luís (Maranhão), Araguaína (Tocantins) e Parauapebas (Pará). Consequentemente, o Brasil contribuiu com a taxa de letalidade mundial da doença em 9,7 % (OPAS/OMS, 2022).

A respeito do quadro clínico apresentado por essa patologia, pode ser assintomático ocorrendo em alguns casos, a cura espontânea do indivíduo; ou sintomático, desencadeando febre alta e prolongada, inapetência, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia (forma aguda) ou ainda, com o surgimento de edemas (forma crônica) e piora do comprometimento do sistema imunológico (Aguiar; Rodrigues, 2017; Teixeira, 2019).

3.3.2 Formas Clínicas da leishmaniose- Leishmaniose Tegumentar Americana- LTA (cutânea) e mucosa

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), também conhecida como leishmaniose cutânea (LC), representa um desafio significativo para a saúde pública em 85 países abrangendo quatro continentes: Américas, Europa, África e Ásia. Estimativas para cada ano mostram que cerca de 600.000 - 1 milhão de novos casos serão notificados mundialmente, inclusive no Brasil (Who, 2020).

Segundo a OPAS (2022), entre os anos de 2001-2021 foram notificados 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), com média anual de quase 53 mil casos, sendo 37,6 % notificados no Brasil. Mundialmente, entre os anos de 2017-2021 foi observada a redução em número de casos de LTA e LM em 24 % como reflexo da baixa no número de casos nos países de maior incidência como o Brasil (14,3 %), Colômbia (20,5 %), Nicarágua (71,2 %) e Peru (21,6 %).

As manifestações clínicas da LTA podem ocorrer sob quatro formas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (Tironi *et al.*, 2021). No Brasil, a LC e LMC são responsáveis por 90 % de todos os casos da doença no país, apresentando uma ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (Brasil, 2017, Vasconcelos *et al.*, 2018).

A forma localizada da leishmaniose cutânea é frequentemente causada por *L. guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *L. umbratilis*. Essa doença é marcada por lesões que ocorrem na face, membros superiores e inferiores.

Essas lesões se manifestam como úlceras arredondadas, com bordas elevadas e fundo granuloso, podendo ou não apresentar exsudação. Em geral, há uma propensão à cura espontânea, e a resposta ao tratamento costuma ser favorável (Caetano, 2019, Tironi *et al.*, 2021).

A leishmaniose cutânea difusa é causada pela *L. amazonensis* e é caracterizada por lesões mais severas que se disseminam pelo corpo devido a uma infecção descontrolada resultante de uma resposta humoral inadequada. Segundo Espinoza-Morales *et al.* (2017), essa condição é considerada um desafio na resposta ao tratamento.

A espécie mais comum é a *Leishmania Vianna brasiliensis*. Ela está dispersa pelo Brasil como um todo. No Mato Grosso chega predominar em mais de 90% dos casos notificados e está associada a leishmaniose cutânea

localizada, disseminada mucosa, cutâneo-mucosa (Abadías-Granado *et al.*, 2021). A leishmaniose mucocutânea está associada a *L. braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Hepburn, 2000, Belo Horizonte, 2007, Brasil, 2007).

Ela é descrita como uma fase crônica da leishmaniose cutânea localizada na face, resultante da disseminação dos parasitas para as mucosas nasal e oral. As lesões decorrentes dessa forma clínica podem afetar a região da orofaringe e laringe, progredindo para um estágio desfigurante (Showler; Boggild, 2017, Abadías-Granado *et al.*, 2021).

Por fim, a forma disseminada dessa síndrome é caracterizada por várias lesões papulares com aparência semelhante à acne, afetando diferentes áreas do corpo, incluindo a face e o tronco. Essa apresentação clínica pode estar relacionada à coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana- HIV (Hott, 2021). As duas espécies reconhecidas como responsáveis pela doença são a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*.

3.3.3 Ciclo de vida do parasita Leishmania e Transmissão da Leishmaniose

O ciclo biológico da *Leishmania* é considerado heteroxênico pois envolve dois hospedeiros diferentes: um mamífero e um inseto vetor. Os agentes etiológicos se apresentam sob duas formas de evolução distintas e consideradas essenciais para a transmissão eficiente da doença: a forma promastigota (flagelada), conhecida como a fase extracelular em que o parasita se desenvolve no trato digestivo de vetores invertebrados, como os flebotomíneos *Phlebotomus* sp. e *Lutzomyia* sp. (Figura 5), ou em meios de cultura axênicos; e na forma amastigota onde o parasita é intracelular obrigatório em vertebrados (hospedeiro humano) (Brasil, 2013, Who, 2017).

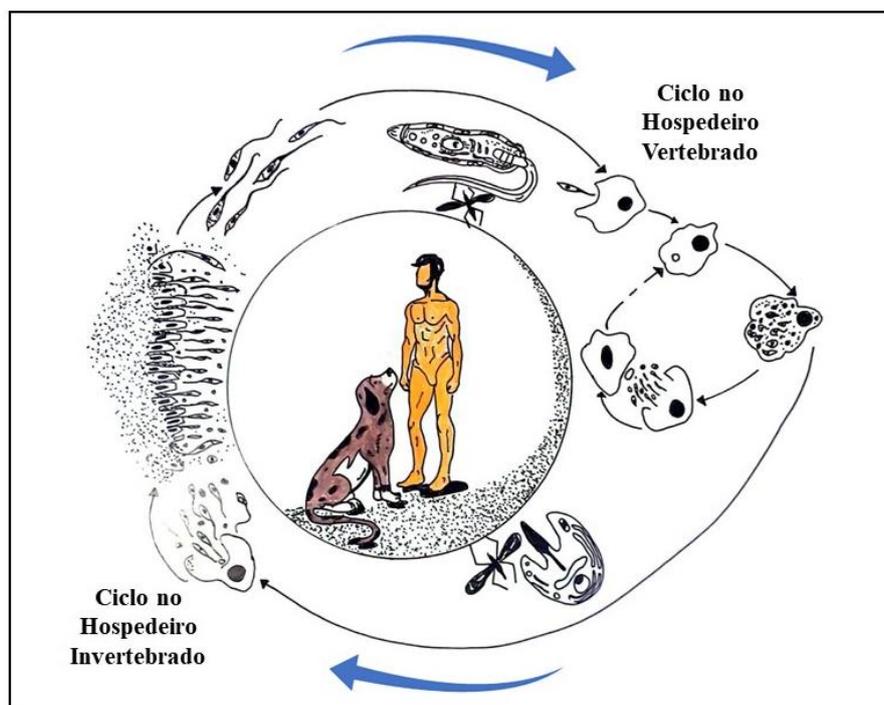
Figura 5: Fêmea adulta do flebotomíneo.



Fonte: Collins (2011)

A transmissão da leishmaniose tem início com a picada do flebotômíneo fêmea durante o repasto sanguíneo, quando ela ingere macrófagos infectados por amastigotas. No interior do trato digestivo do inseto vetor, ocorre a lise dos macrófagos, liberando as amastigotas, que posteriormente se transformam em sua forma promastigota e se aderem às microvilosidades do intestino- Figura 6 (Jimenez-marco *et al.*, 2016, Forrest *et al.*, 2020).

Figura 6: Ciclo de transmissão da leishmaniose.



Fonte: A autora (2023)

Dessa forma, as promastigotas avançam em seu processo de diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas. Nesse estágio, perdem a capacidade de divisão, mas adquirem mobilidade devido ao desenvolvimento do flagelo (Melby; Travi; Yaneth Osorio, 2019). Com isso, ocorre a metaciclogênese, uma etapa na qual os promastigotas metacíclicos atravessam o trato digestivo até alcançar a faringe do inseto. Nesse ponto, eles atingem seu estado infeccioso, permanecendo aderidos ao epitélio e sendo liberados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (Cortazzo; Aoki; Floeter-Winter, 2022).

Após a regurgitação pela pele do hospedeiro, as promastigotas adentram o sistema sanguíneo, onde são fagocitadas pelos macrófagos. Transformam-se novamente em amastigotas, multiplicando-se dentro dessas células e, como resultado, provocam a ruptura das membranas, facilitando a disseminação pelo sistema hematológico e linfático (Lisboa, 2016).

A propagação do parasita no organismo marca o início da fase visceral, podendo afetar órgãos como o baço, o fígado e a medula óssea, desencadeando sintomas graves e, se não tratada de maneira adequada, representando risco potencial de fatalidade (Mansueto *et al.*, 2014).

3.3.4 Tratamento da leishmaniose

O tratamento da leishmaniose encontra-se fundamentado na quimioterapia, pois a disponibilidade de medicamentos específicos para esse fim é considerada limitada e ultrapassada. Neste sentido, alguns desafios são enfrentados para a escolha adequada do tratamento devido a redução da eficácia medicamentosa, especialmente, com o surgimento de cepas resistentes; os custos dispendiosos de produção, a complexidade na administração e aos altos índices de toxicidade dos medicamentos causando efeitos deletérios ao paciente diminuindo a aceitação do tratamento por parte dos indivíduos infectados (Mohammed *et al.*, 2020, Sasidharan; Saudagar, 2021).

Inúmeras iniciativas foram realizadas no sentido de criar uma vacina contra o parasita, contudo, até o momento, não houve progressos substanciais nessa área, apenas para leishmaniose visceral canina. Assim, o protocolo terapêutico atual baseia-se em abordagens convencionais, tais como

antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina (Aruleba *et al.*, 2020, Sasidharan; Saudagar, 2021).

Os antimoniais pentavalentes (Sb, V) como o antimoniato de N-Metil Glucamina, utilizado a nível ambulatorial no tratamento da leishmaniose visceral e disponibilizado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde- SUS/Brasil, e o estibogluconato de sódio são os primeiros fármacos a serem utilizados no tratamento da leishmaniose, conforme as orientações da Organização Mundial de Saúde (Brasil, 2006).

Entretanto, o mecanismo de ação dessas drogas ainda não se encontra totalmente elucidado. Os antimoniatos utilizados no tratamneto das leishmanioses, são pró-drogas que passam por redução biológica, resultando na forma trivalente do antimonial (Sb, III), inibindo a tripanotiona redutase e as proteínas que possuem domínio de dedo de zinco (*zinc finger*) apresentando a ação terapêutica leishmanicida desejada (Aruleba *et al.*, 2020, Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

Com a resposta terapêutica insatisfatória e o surgimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e o isetionato de pentamidina foram introduzidas na terapia. O mecanismo de ação da anfotericina B é a nível de membrana sobre o ergosterol, desencadeando a formação de poros aquosos causando a desestabilização da membrana, desequilíbrio iônico e posterior morte celular (Alcazar-Fuoli; Mellado, 2012, Hendrickx *et al.*, 2019).

Contudo, os efeitos colaterais e adversos para os pacientes são relatados constantemente, por isso a preparação lipossomal é a mais utilizada devido a biodisponibilidade e as características farmacocinéticas da anfotericina B, e em pacientes que apresentam algum tipo comorbidade, ela é a única opção terapêutica para o tratamento da LV (Adler-Moore; Proffitt, 2002, Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

O isetionato de pentamidina tem apresentado melhor eficiência terapêutica contra a leishmaniose cutânea causada pela *L. guyanensis* em relação aos antimoniais pentavalentes, já se sabe que a diamidina aromática age contra o parasita através da ligação ao seu DNA presente no cinetoplasto, por intermédio de transportadores, e inibindo a ação da enzima mitocondrial topoisomerase II (Mishra *et al.*, 2007, No, 2016).

Outras drogas também são relatadas na literatura para o tratamento das

leishmanioses, como é o caso da miltefosina, conhecida pelo seu potencial anticancerígeno para combater o crescimento das células mamárias cancerosas, apresentou resultados significativos para uma taxa de cura de 91 % dos pacientes acometidos pela leishmaniose cutânea e de 95 % para os pacientes com diagnosticados com leishmaniose visceral (Sundar; Murray, 2005).

Sabe-se que a miltefosina induz a morte dos parasitas por apoptose além de estimular a atividade fagocitária dos macrófagos e linfócitos T. Estudos também demonstraram que esse medicamento estimula as espécies reativas de oxigênio liberando mais óxido nítrico que age contra o parasita dentro dos macrófagos. Apesar da eficácia leishmanicida, os efeitos adversos e colaterais são relatados (Wadhone *et al.*, 2009, Freitas-Junior *et al.*, 2012)

Diante da importância mundial para a eliminação dessas doenças tropicais, o cenário terapêutico limitado, a alta toxicidade das drogas ao organismo e o surgimento de parasitas cada vez mais resistentes aos tratamentos convencionais, diversos grupos de pesquisa têm se movimentado na procura por métodos alternativos (Nunes *et al.*, 2021).

Neste sentido, os produtos naturais são fortes candidatos no desenvolvimento de novas opções terapêuticas que sejam coadjuvantes para o tratamento eficaz das leishmanioses pois, eles dispõem uma rota biossintética composta por diversas classes de compostos químicos que apresentam princípio ativo combatendo o desenvolvimento e a progressão de vários tipos de doenças (Pedroso; Andrade; Pires, 2021).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos brutos, frações, óleos essenciais e os compostos fitoquímicos isolados de diferentes espécies vegetais são frequentemente investigados em relação às suas propriedades antioxidantes (Nascimento *et al.*, 2011, Nath *et al.*, 2013). Estes compostos promovem a remoção ou inativação de radicais livres, podendo levar à redução do risco de doenças crônicas (Fisa, 2009, Miranda *et al.*, 2016).

Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres. Apesar do termo antioxidante está implicitamente restrito aos compostos inibidores da

lipoperoxidação, eles também podem ser definidos mais amplamente como substâncias que quando presentes em baixas concentrações (comparadas a outras que oxidam um substrato) apresentam a capacidade de prevenir significativamente o processo de oxidação (Halliwell; Gutteridge, 2000).

De acordo com Saito *et al.* (2004), os antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres para assim inibir a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas e os danos no DNA. Os antioxidantes também apresentam a capacidade de restaurar o equilíbrio fisiológico e a modulação das vias biológicas, levando a proteção e a manutenção da saúde. Eles podem ser sintetizados naturalmente pelo organismo ou adquiridos pela alimentação saudável, rica em frutas e verduras. Nessa vertente, os óleos essenciais destacam-se entre os produtos naturais de alto teor antioxidante e são bem consumidos pela população devido ao seu potencial biológico (Nascimento *et al.*, 2018, Smeriglio *et al.*, 2019).

Para determinar a atividade antioxidante em sistemas biológicos, diferentes métodos podem ser utilizados, baseado no sequestro dos radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e 2,2-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS); poder de redução do ferro (FRAP), quantificação de produtos produzidos durante a peroxidação lipídica, sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, entre outros métodos (Craft *et al.*, 2012). Há um crescente interesse no potencial terapêutico de substâncias antioxidantes de plantas medicinais, como os óleos essenciais, principalmente para minimizar a cronicidade do processo inflamatório de diversas doenças desencadeada por radicais livres (Azmir *et al.*, 2013).

Dentre as substâncias identificadas como componentes dos óleos essenciais como atividade antioxidante estão os terpenos, cumarinas, latonas, fenóis, álcoois, álcoois terpenos, cetonas, óxidos, hidrocarbonetos, entre outros. Nesse sentido, várias pesquisas com plantas medicinais têm sido realizadas buscando identificar compostos que além de apresentarem propriedades antioxidantes, também sejam biologicamente ativos e apresentem baixa toxicidade (Potterat, 1997, Miranda *et al.*, 2016).

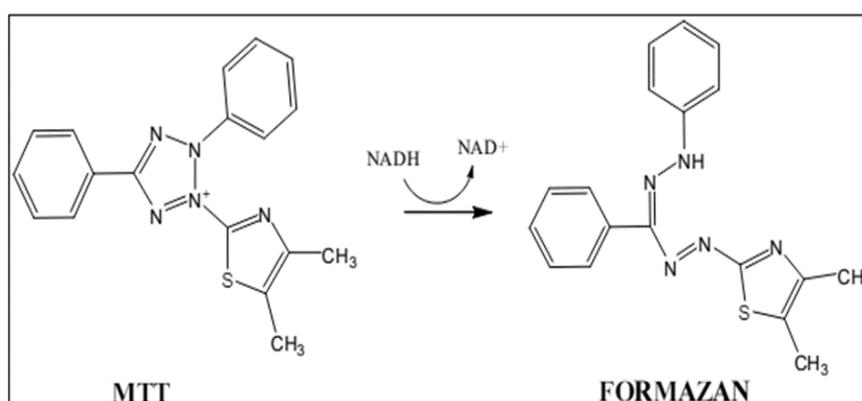
3.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade são frequentemente utilizados para avaliar o perfil citotóxico de novas substâncias e compostos que tenham a perspectiva de se tornar um produto farmacológico. Esses ensaios permitem avaliar: alterações na membrana com a utilização de corantes como o azul de Trypan e eosina; alterações morfológicas/ e de proliferação e na funcionalidade mitocondrial pelo teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (Riss *et al.*, 2019, Ghasemi *et al.*, 2021)

Do ponto de vista bioquímico, o MTT que é um sal tetrazólico, tem a capacidade de penetrar nas mitocôndrias das células viáveis com atividade metabólica, lá ocorre a conversão desse sal a cristais de formazan (Figura 7) através da presença da enzima succinil desidrogenase que reduz o anel tetrazólico do sal (Mosmann, 1983, Ghasemi *et al.*, 2021). Considerado um teste colorimétrico, pela conversão da cor amarela para púrpura, essa alteração de cor permite avaliar a viabilidade das células e o impacto citotóxico de inúmeros compostos de natureza distintas (Li; Zhou; Xu, 2019).

Para determinar o nível de citotoxicidade de um produto, ele deve ser colocado em concentrações pré-determinadas nas células de interesse (saudáveis ou neoplásicas) e incubado pelo tempo estabelecido, geralmente com mínimo de 24 horas e máximo de 72 horas (Berridge; Herst; Tan, 2005, Magalhães; Thá; Leme, 2018).

Figura 7: Reação de redução do MTT para formazan.



Fonte: Mosmann (1983)

3.6 EMBRIOTOXICIDADE UTILIZANDO *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*

Apesar dos estudos com plantas medicinais demonstrarem inúmeras atividades biológicas, a realização de testes para verificar a toxicidade dos produtos naturais é fundamental, principalmente de compostos isolados. Esses testes buscam identificar os efeitos decorrentes da interação entre os compostos e o organismo, visando identificar as margens de segurança para que estas substâncias não provoquem efeitos deletérios (Dutra *et al.*, 2016).

Embriões da espécie *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica) são utilizados em pesquisas relacionadas a biologia do desenvolvimento, tanto para estudos de embriologia comparada como também em investigações de embriotoxicidade de diversas substâncias (Yamamoto *et al.*, 2012, Hutchins; Bronner, 2019). Isso se deve ao fato de apresentarem semelhanças morfológicas com embriões de outros grupos de vertebrados e por serem sensíveis à ação de agentes químicos, principalmente no início do seu desenvolvimento, onde ocorre intensa proliferação celular (Kmecick *et al.*, 2019). Além do baixo custo, a facilidade de manejo e o rápido desenvolvimento são atrativos que tornam esta espécie um modelo viável em diversos campos de pesquisa (Vancamp; Darras, 2017, Kohl *et al.*, 2019).

3.7 MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÃO DE GALINHA

A membrana corioalantóica é uma membrana extraembrionária de dupla camada transparente, constituída por capilares, artérias e veias conectadas à circulação embrionária, sendo reconhecida como um tecido integral. Ela está presente nas aves, répteis e alguns mamíferos monotremados desempenhando um papel crucial durante o desenvolvimento embrionário desses animais (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014, Nowak-sliwinska *et al.*, 2018).

Graças à sua vascularização abrangente e facilidade de manipulação, a membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) representa um modelo que pode ser equiparado a um sistema *in vivo* intermediário e tem sido amplamente empregado como uma ferramenta de pesquisa *in vivo* para a avaliação da eficácia de fármacos angiogênicos e antiangiogênicos (Nowak-sliwinska *et al.*, 2018, Aurora *et al.*, 2023).

Este modelo experimental apresenta robustez na elucidação de inúmeros processos biológicos, pois ele avalia a migração das células pela membrana basal mimetizando o que ocorre nos estágios invasivos das neoplasias, por exemplo. A CAM oferece um tecido completo capaz de responder eficazmente a lesões, desencadeando reações inflamatórias clássicas e bem conhecidas (Li *et al.*, 2015)

Avanços significativos dessa técnica tem sido observados na literatura, como no estudo realizado por Huang *et al.* (2017), que utilizaram o modelo de CAM no estudo da angiogênese desenvolvendo através de métodos computacionais gráficos ambientes digitais que mimetizavam a angiogênese dos vasos sanguíneos em escala microscópica, com o formato de um cubo, possibilitando controlar a distribuição, direcionamento e o desenvolvimento dos vasos sanguíneos sobre as membranas da casca (Huang *et al.*, 2017).

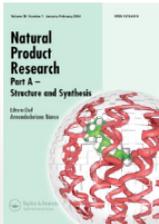
É importante ressaltar que o embrião de galinha não experimenta sensações de dor, uma vez que a inervação sensorial não se desenvolve nos estágios iniciais, até o décimo quarto dia do desenvolvimento embrionário. Por essa razão, em alguns países, procedimentos experimentais deste tipo são permitidos sem a necessidade de aprovação por comitês de experimentação animal, como nos Estados Unidos da América (EUA), União Europeia e Suíça, desde que conduzidos dentro desse intervalo de tempo específico (Vargas *et al.*, 2007, Schrage *et al.*, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido ao *Natural Product Research*.



Natural Product Research
Formerly *Natural Product Letters*

[Publish open access in this journal](#)

Publishes research on natural substances of land, sea, plants, microbes and animals, including structure elucidation, synthesis, and experimental biosynthesis.

Enter keywords, authors, DOI, etc This Journal

[Advanced search](#) [Citation search](#)

Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Eugenia pohliana* DC

Eliane Alves Bandeira De Carvalho^{ab}, Wêndeo Kennedy Costa^{a*}, João Victor de Oliveira Alves^a, Thiago Felix Da Silva^a, Maria Isabel De Assis Lima^{ab}, Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba^c, Bruno Olivera de Veras^a, Teresinha Gonçalves da Silva^c, Alisson Macário de Oliveira^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Eliete Cavalcanti da Silva^b, Marta Gerusa Soares de Lucena^b, Márcia Vanusa da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

^b Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

^c Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

*Corresponding Author: Eliane Alves Bandeira De Carvalho

Email: elicarvalho2000@gmail.com

Resumo

A composição química do óleo essencial de *Eugenia pohliana* foi analisada por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM). Foram identificados 38 compostos, representando 94,35% da composição do óleo. Os principais componentes foram β (E)-cariofileno (12,50%), δ -cadineno (11,24%) e α -cadinol (10,89%). O óleo essencial de *E. pohliana* apresentou atividade antileishmania significativa contra *Leishmania amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, com valores de IC₅₀ de 14,47 μ g/mL e 44,60 μ g/mL, respectivamente. A atividade antioxidante dos compostos foi avaliada pelos ensaios de sequestro de radicais DPPH, ABTS e Capacidade Antioxidante Total (CAT). O óleo essencial de *E. pohliana* não apresentou atividade significativa nos ensaios DPPH e ABTS, mas apresentou 82,08% de inibição no ensaio CAT. O perfil citotóxico do óleo essencial de *E. pohliana* foi avaliado pela determinação de seus valores de IC₅₀ contra células cancerígenas. O óleo apresentou atividade inibitória significativa contra MCF-7, NCI-H292, K-562 e HL-60.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Citotoxicidade; Leishmania; Myrtaceae.

1. Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas pela humanidade desde os primórdios, devido à sua eficácia terapêutica, acessibilidade e presença de moléculas bioativas. A medicina tradicional vem se tornando cada vez mais popular como forma de tratamento complementar, especialmente em países desenvolvidos, por ser considerada menos tóxicas e mais bem tolerada em comparação aos medicamentos sintéticos. Em contrapartida, em países em desenvolvimento, as plantas medicinais surge como uma alternativa que representada uma opção de tratamento disponível e acessível, sendo responsável por cerca de 80% dos serviços de atenção primária à saúde (El-Dahiyat *et al.*, 2020, Fino *et al.*, 2023).

Diante desse cenário, a busca por novos agentes farmacologicamente ativos a partir da triagem de fontes naturais tem se intensificado, contribuindo para descoberta de diversos compostos clinicamente relevantes. Tais substâncias têm desempenhando um papel fundamental no tratamento de diversas doenças, uma vez que se estima que mais de 75% dos fármacos utilizados no combate a infecções e cerca de 60% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer sejam provenientes de fontes naturais (Atanasov *et al.*, 2015, Nascimento *et al.*, 2022).

Entre as diversas espécies vegetais com potencial terapêutico, destaca-se *Eugenia pohliana*, conhecida popularmente como maçã-do-mato, pertencente a família Myrtaceae. É uma planta nativa do Brasil e vem despertando interesse científico por sua composição rica em metabólitos secundários com atividades biológicas. Especialmente os óleos essenciais e extratos naturais, que apresentam propriedades farmacológicas como atividades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Costa *et al.*, 2022, Nascimento *et al.*, 2022).

Apesar desse potencial, até o momento não há registros na literatura científica sobre suas propriedades leishmanicidas e os efeitos tóxicos dessa espécie. Considerando a importância da busca por novas alternativas terapêuticas contra leishmaniose, o presente estudo tem como objetivo investigar as propriedades leishmanicidas e a toxicidade dos óleos essenciais extraídos das folhas de *E. pohliana*.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal e extração de óleo essencial

As coletas de folhas de *Eugenia pohliana* foram realizadas no Parque Nacional do Vale do Catimbau, localizado no município de Buíque, Pernambuco, Brasil (8°30'57"S 37°20'59"W). A coleta foi realizada de acordo com as diretrizes do SisGen, o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado. Um exemplar com o número 91.440 foi depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrícola de Pernambuco. Por um período de três horas, as folhas foram submetidas a um procedimento de hidrodestilação em um dispositivo do tipo Clevenger. O óleo essencial obtido foi armazenado em recipientes de vidro com jarra a uma temperatura de 5 °C antes de ser submetido à análise química e ao bioensaio.

2.2 Caracterização química

Os resultados das análises de cromatografia gasosa (CG) foram utilizados para calcular as proporções relativas dos componentes do óleo essencial. As análises de CG foram realizadas em um Thermo TraceGC Ultra equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de silício compatível com VB-5 (ValcoBond 30 m 0,25 mm Id: espessura do filme: 0,25 mm). O nitrogênio foi utilizado como transportador de gás com vazão de 1 L/min e pressão de entrada de 30 psi. A quantidade relativa de cada componente foi calculada com base em sua área pictórica correspondente e expressa como uma porcentagem da área total do cromatograma. As análises foram realizadas em triplicata. A identificação dos compostos contidos no óleo essencial foi realizada por CG em conjunto com espectrometria de massas (CG-EM). Essas análises foram realizadas utilizando um instrumento quadripolar Agilent série 5975C GC/MSD com um capilar de cristal de silício não polido DB-5 com espessura de filme de 0,25 mm e resolução de 0,25 m. Um litro foi injetado em cada amostra de forma dividida (50:1). Hélio foi utilizado como transportador de gás com vazão de 1 mL/min e pressão constante de 7,0 psi. As temperaturas quadripolares foram fixadas em 230 °C e 150 °C, respectivamente. Os espectros de massa foram conduzidos a 70 eV (no

modo EI) com velocidade de variação de 1,0 variação de m/z 35-350. A identificação dos componentes individuais foi realizada por comparação com os valores dos índices de retenção relatados anteriormente, obtidos pela coinjeção de amostras de óleo essencial com uma combinação de hidrocarbonetos lineares C9–C30 e calculados usando a equação de Van Dool e Kratz (1963). Posteriormente, os dados de MS coletados para cada componente foram combinados com os dados de espectro de massa do sistema GC-MS (MassFinder 4, empresa de consultoria científica do Dr. Hochmuth em Hamburgo, Alemanha); o banco de dados de espectro de massa NIST08 (ChemSW Inc. em Fairfield, Califórnia, Estados Unidos); o Wiley RegistryTM of the Mass Spectrometry 9th Edition (Wiley, Hoboken, Nova Jersey, Estados Unidos); e outros dados de espectro de massa disponíveis publicamente (Adams, 2009). As análises foram realizadas em triplicado.

2.3 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*

2.3.1. Cultivo de promastigotas de *Leishmania* spp.

Os parasitas foram obtidos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (UFPE). As formas promastigotas das espécies de *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram mantidas a 26°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose - Himedia Laboratories) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Invitrogen Corporation), 0,2% de hemina e 0,1% de antibióticos (10000U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de estreptomicina (Gibco by Life Technologies) a 26°C em estufa B.O.D. Em nossos experimentos, foram utilizados parasitas em estágios iniciais de desenvolvimento.

2.3.2 Avaliação da atividade antipromastigota utilizando a metodologia MTT

Com base no método colorimétrico MTT, que mede a atividade metabólica das células a partir da redução das enzimas mitocondriais do parasita, a CI50 (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento do parasita em relação ao controle) foi estabelecida para testar o efeito do óleo essencial sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp. (Mosmann, 1983). Distribuídas em placas de 96 fendas, foram cultivadas culturas com inóculo inicial de 2×10^6 parasitas/mL, que se encontravam em fase de crescimento exponencial. O óleo essencial foi diluído em LIT em concentrações que variaram de 3,25 a 200 µg/mL. Anfotericina

B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como controle positivo, enquanto o meio de cultura e o solvente DMSO (0,1%) foram utilizados como controles negativos. As placas contendo o parasita e o composto foram incubadas a 37 °C em uma incubadora de CO₂ por 72 horas.

Cada dose de MTT (5 mg/mL) foi adicionada posteriormente, e as placas foram incubadas por três horas a 37 °C em uma incubadora BOD. Após esse tempo, o meio e o excesso de MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada pote, com um tempo de incubação de 30 minutos para dissolver os cristais de formazano. As placas foram lidas a 595 nm usando um leitor de microplacas (BioRad Mark Microplate Spectrophotometer). A densidade óptica média (D.O.) das polos contendo o fármaco foi comparada com a densidade óptica média das polos controle. Os experimentos foram realizados em triplets. Para definir o nível de citotoxicidade, a concentração (CI₅₀) que mata 50% das células viáveis foi determinada por meio de análise de regressão não linear.

2.4 Avaliação da atividade antioxidante

2.4.1 Ensaio DPPH (Sequenciamento de Radicais Livres)

Uma mistura de 250 mL de DPPH 1 mM (em metanol) foi misturada com 40 µL de óleo essencial em uma faixa de concentrações (de 31,25 a 1,000 µg/mL) para testar a capacidade de sequestrar o radical DPPH. O experimento foi conduzido à temperatura ambiente e na ausência de luz por 25 minutos. O padrão foi utilizado como controle positivo, enquanto o metanol foi utilizado como controle negativo. A absorvância de cada solução foi medida a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (BioTek UQuant MQX200). A seguinte equação foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição (I%): $I\% = [(AcAs)/(Ac)]100$, onde Ac é a absorvância do controle e as é a absorvância da amostra.

2.4.2 Ensaio ABTS

Amostras (10 µL) de óleo essencial (31,25 a 1000 µg/mL) foram misturadas por 6 minutos com 1 mL do radical ABTS, e os resultados foram então lidos em espectrofotômetro a 734 nm. Como antioxidante basal, foi utilizado ácido ascórbico, e as atividades de inibição foram calculadas com base na quantidade de ABTS removida. $\% = [(AcAs)/(Ac)]100$, onde Ac é a absorvância do controle e as é a absorvância da amostra.

2.4.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Amostras (100 μ L) do óleo essencial ou do ácido ascórbico foram combinadas com 1 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de gordura saturada e 4 mM de acetato de amônio). Os tubos foram aquecidos a 95 °C por 90 minutos e, em seguida, resfriados à temperatura ambiente, enquanto a absorbância de cada reação foi medida a 695 nm. A reação controle foi composta por 100 μ L de metanol misturado a 1 mL da solução reagente. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico (1 mg/mL). A capacidade antioxidante das amostras foi calculada como a atividade antioxidante relativa em relação ao ácido ascórbico usando a fórmula: $CAT\% = [(AaAc)/(AaaAc)]100$, onde Aa é a absorbância da amostra, Ac é a absorbância do controle e Aaa é a absorbância do ácido ascórbico.

2.5 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi determinada pelo método MTT. As linhagens celulares utilizadas nos testes de citotoxicidade incluíram as células não tumorais Vero (células epiteliais renais de macaco), L-929 (fibroblastos murinos) e as linhagens tumorais NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e HeLa (carcinoma cervical), cultivadas em meio de cultura DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e K-562 (leucemia mielocítica aguda) em meio RPMI, ambas suplementadas com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. A cultura foi mantida em estufa atmosférica com 5% de CO₂ no Laboratório de biofarmatox na sala da cultura de células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

As linhagens celulares foram incubadas após serem plaqueadas em uma placa de 96 poços com uma concentração de 2×10^5 ou 3×10^6 células/mL. Após 24 horas, as amostras do estudo foram adicionadas em concentrações variando de 6,25 a 200 μ g/mL. Após 72 horas de tratamento, cada poço recebeu 25 μ L de MTT (5 mg/mL) e, após 3 horas de incubação, o meio de cultura contendo o MTT foi aspirado e 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. Em um comprimento de onda de 560 nm, um leitor automático de microplacas foi usado para medir a absorbância. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e a concentração (IC₅₀) que pode reduzir a viabilidade das células em 50% em comparação ao controle foi calculada para determinar o nível de citotoxicidade usando regressão não linear.

2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram examinados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos como valores medianos com desvio-padrão (DP). As diferenças estatisticamente significativas foram calculadas utilizando a análise de variância em uma única direção (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni ou Dunnett (se necessário). Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p > 0,05$.

3. Resultados e Discussão

Caracterização química do óleo essencial de *E. pohliana*

Utilizando GC-MS, a caracterização química do óleo essencial de *E. pohliana* revelou 38 compostos, representando 94,35% do total (Tabela 1). Os três principais componentes do óleo que merecem atenção especial são β (E)-cariofileno (15,56%), δ -cadineno (11,24%) e α -cadinol (10,89%). Em estudos anteriores, foi demonstrado que a composição química do óleo essencial extraído das folhas de *E. pohliana* variava em rendimento e número de constituintes.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *Eugenia pohliana*.

Componete	RI ^a	RI ^b	%	Componete	RI ^a	RI ^b	%
α -pinene	931	932	0.34	δ -cadinene	1526	1522	11.24
β -pinene	973	974	0.67	trans-cadina- 1,4- diene	1534	1533	0.13
Limonene	1027	1024	0.06	α -cadinene	1539	1537	1.02
δ -elemene	1337	1335	3.19	α -Calacorene	1544	1544	0.70
α -cubebene	1349	1348	0.11	Elemol	1550	1548	0.12
α -ylangene	1371	1373	0.25	Germacrene B	1558	1559	0.52
α -copaene	1375	1374	0.62	Palustrol	1568	1567	0.78
β -elemene	1392	1389	3.06	Spathulenol	1578	1577	1.69
α -gurjunene	1410	1409	1.73	Globulol	1585	1590	2.57
β -(E)-cariofileno	1421	1417	12.50	Guaiol	1593	1600	2.41
α -humulene	1454	1452	3.09	Ledol	1604	1602	1.48

Allo-aromadendrene	1461	1458	1.50	1,10-di-epi-cubenol	1616	1618	0.74
trans-candina-1(6),4-diene	1474	1475	1.63	1-epi-cubenol	1629	1627	1.53
γ -muurolene	1477	1478	1.34	tau-Muurolol	1645	1644	10.81
α -amorphene	1481	1483	4.51	α -cadinol	1659	1652	10.89
β -selinene	1487	1489	1.36	Shyobunol	1692	1700	0.10
Bicyclogermacrene	1498	1500	8.13	eudesm-7(11)-en-4- α -ol	1697	1700	0.10
γ -cadinene	1515	1513	3.37	Total			94.29

RI^a = Taxa de retenção determinada; RI^b = Índice de retenção obtido de Adams (2007); % = área de composto em relação ao óleo essencial de *M. tenella*.

Uma análise química dos óleos essenciais coletados no verão e no inverno revelou que o óleo obtido no verão continha 35 compostos diferentes, sendo os principais β -cariofileno (12,56%), δ -cadineno (11,24%), α -cadinol (10,89%) e epi- α -muurolol (10,81%). Durante esse período, a extração do óleo no inverno produziu 35 compostos diferentes, incluindo δ -cadineno (20,23%), bicyclogermacrene (13,13%), epi- α -muurolol (10,90%) e α -cadinol (9,09%) (Costa *et al.*, 2022).

Outro óleo extraído das folhas de *E. pohliana* apresentou coloração âmbar, e a caracterização química revelou 38 compostos, representando 98,73% do total. De acordo com Nascimento *et al.* (2022) os sesquiterpenos (E)-cariofileno (15,56%), α -cadineno (11,24%) e α -cadinol (10,89%) foram os componentes predominantes. Essa variação é realmente capaz de ocorrer dependendo da sazonalidade, irrigação, isolamento, disponibilidade de nutrientes, temperatura, radiação e predadores. Alterações quantitativas e qualitativas nos constituintes químicos ocorrem dentro e entre espécies do mesmo gênero (Matias *et al.*, 2016; Luz *et al.*, 2020).

Atividade Leishmanicida

As espécies de *Leishmania amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram cultivadas na presença de concentrações de óleo essencial de *E. pohliana* variando de 3,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Após 72 horas de exposição,

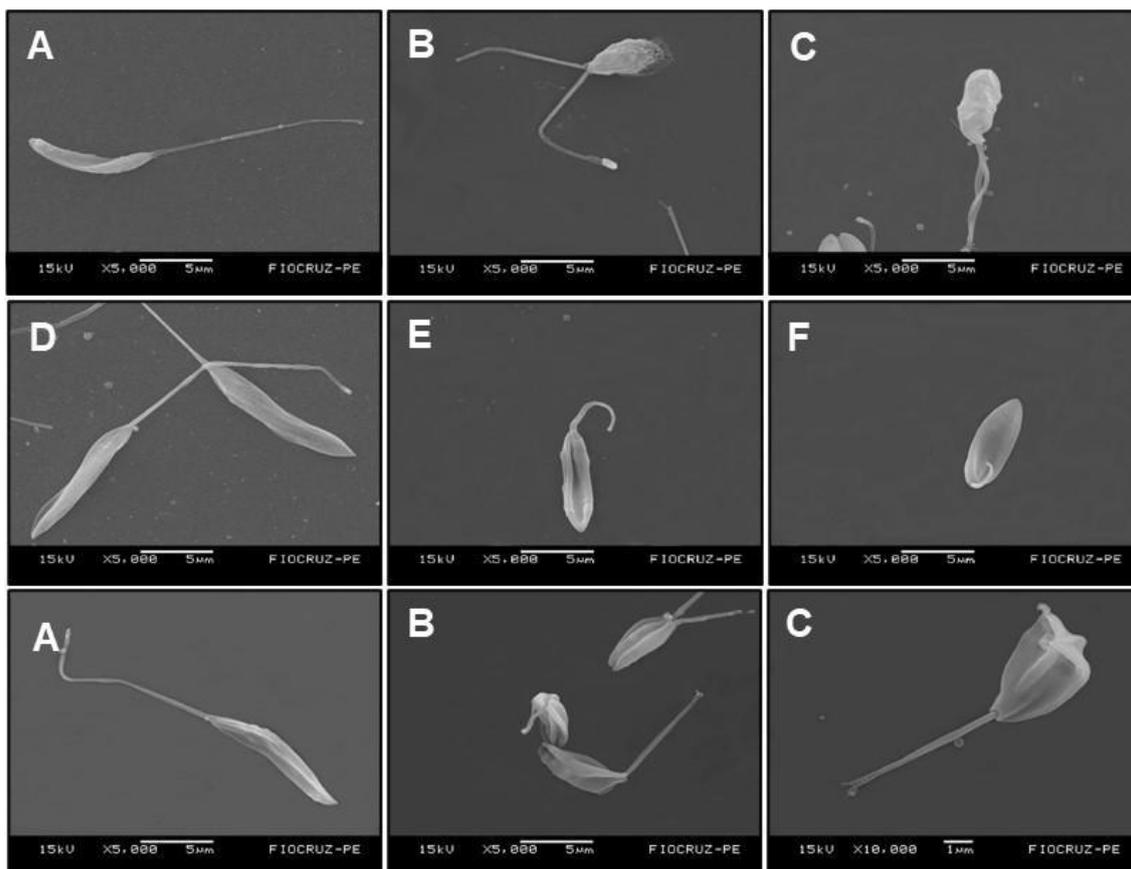
houve uma redução significativa, dose-dependente, na capacidade de multiplicação dos parasitas. O óleo essencial de *E. pohliana* apresentou atividade contra *L. amazonensis* com IC₅₀ de 35,46 ± 0,96 µg/mL, *L. infantum* com IC₅₀ de 44,60 ± 0,94 µg/mL, *L. braziliensis* com IC₅₀ de 38,85 ± 0,95 µg/mL e *L. guyanensis* com IC₅₀ de 14,47 ± 0,96 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito antileishmania do óleo essencial de *Eugenia pohliana*.

Species	<i>Eugenia pohliana</i> essential oil
	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>L. amazonensis</i>	35.46±0.96
<i>L. infantum</i>	44.60±0.94
<i>L. braziliensis</i>	38.85±0.95
<i>L. guyanensis</i>	14.47±0.96

A análise por microscopia eletrônica de varredura revelou visualmente a influência do óleo de *E. pohliana* nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Devido à sua alta concentração inibitória (CI₅₀), a avaliação por microscopia eletrônica de varredura não foi conduzida para *L. infantum*. O β-cariofileno, de acordo com a pesquisa conduzida por Leite *et al.* (2013), demonstrou atividade notavelmente significativa no contexto clínico em relação a *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Os resultados do estudo indicaram que o β-cariofileno exibiu efeitos relevantes e clinicamente promissores contra esses organismos, destacando seu potencial terapêutico em relação a essas condições específicas. Esta descoberta enfatiza a importância do β-cariofileno como um agente com propriedades farmacológicas valiosas, abrindo caminho para futuras investigações e potenciais aplicações clínicas no tratamento de infecções associadas a esses parasitas.

Figura 1: Influência do tratamento com óleo essencial de *E. pohliana* nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.



(A-C) Micrografias eletrônicas de *Leishmania amazonensis*. (A) Grupo controle com DMSO a 0,1%, observa-se corpo alongado, topologia de membrana preservada e flagelo intacto. (B-C) Grupo tratado com *Eugenia pohliana* (1xIC₅₀), observa-se encurtamento do corpo, membrana enrugada e flagelo duplo com presença de bolhas. (D-F) Micrografias eletrônicas de *Leishmania braziliensis*. (D) Grupo controle com DMSO a 0,1%, observa-se corpo alongado, topologia de membrana preservada e flagelo intacto. (E-F) Grupo tratado com *Eugenia pohliana* (1xIC₅₀), observa-se diminuição do tamanho do corpo do parasita e encurtamento do flagelo. (G-I) Micrografias eletrônicas de *Leishmania guyanensis*. (G) Grupo controle com DMSO a 0,1%, observa-se corpo alongado com topologia de membrana e flagelo preservados. (H-I) Grupo tratado com *Eugenia pohliana* (1 x IC₅₀), observa redução no comprimento do corpo, além de encurtamento do flagelo.

Atividades Antioxidantes

O método de eliminação de radicais DPPH, o experimento ABTS e a capacidade antioxidante total (CAT) foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante dos compostos. O óleo essencial de *E. pohliana* não apresentou

atividade nos métodos de eliminação de radicais DPPH e ABTS, porém apresentou uma porcentagem de inibição de 82,08% no teste CAT.

Essa atividade pode ser atribuída à presença de β -cariofileno, que demonstrou atividade antioxidante *in vitro*, estimulando a remoção de radicais livres, e atividade *in vivo*, como demonstrado pelo aumento dos níveis de glutamato no fígado induzido por Nrf (Francomano *et al.*, 2019). Há um interesse crescente no potencial uso terapêutico de substâncias antioxidantes de origem vegetal, particularmente para reduzir a cronicidade do processo inflamatório subjacente à maioria das doenças crônicas desencadeadas por radicais livres (Costa *et al.*, 2022).

o perfil citotóxico do óleo essencial de *E. pohliana*

A IC₅₀ contra células cancerígenas foi utilizada para avaliar o perfil citotóxico do óleo essencial de *E. pohliana*. Perfis inibitórios contra as linhagens tumorais MCF-7 (16,89 \pm 0,86), HL-60 (23,55 \pm 0,88), K-562 (29,74 \pm 0,96), NCI-H292 (32,15 \pm 0,88) e HeLa (33,63 \pm 0,97) foram significativamente demonstrados por *E. pohliana*. O óleo essencial de *E. pohliana* não apresentou citotoxicidade contra a linhagem não tumoral Vero (60,44 \pm 0,91), indicando um potencial como agente anticancerígeno (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade citotóxica de *Eugenia pohliana* em linhagens de células tumorais através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento

	L-929	Vero	HeLa	IC ₅₀ \pm R ² MCF-7	NCI-H292	K-562	HL-60
<i>E. pohliana</i>	60,97 \pm 0,81	60,44 \pm 0,91	33,63 \pm 0,97	16,89 \pm 0,86	32,15 \pm 0,88	29,74 \pm 0,96	23,55 \pm 0,88

O efeito citotóxico deste óleo pode ser causado pelo principal componente, o β -cariofileno. Segundo Dahham (2015), o β -cariofileno demonstrou ter a capacidade de atuar no processo de metástase, inibindo a migração, a clonogenicidade e as alterações morfológicas em células cancerígenas do cólon. Este composto induz apoptose por fragmentação e condensação nuclear, incluindo a ruptura do potencial da membrana mitocondrial. De acordo com diferentes pesquisas recentes, o δ -cadineno tem diversas aplicações, incluindo o tratamento de parasitas, inflamação e células malignas (Hui *et al.*, 2015).

Os outros dois compostos predominantes no óleo essencial de *Eugenia pohliana*, δ -cadineno e α -cadinol, apresentam um amplo espectro de atividade biológica e também podem ser responsáveis pelo potencial leishmanicida desta espécie.

Uma atividade leishmanicida significativa do δ -cadineno foi identificada contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* (CI50 4 μ g/mL), em um estudo experimental *in vitro*. O composto foi 5 vezes mais eficaz do que o trans-cariofileno, r-humuleno, e não apresentou citotoxicidade para fibroblastos renais e células epiteliais renais humanas, mesmo na concentração mais alta testada (40 μ g/mL). A anfotericina B, por outro lado, foi citotóxica para ambos, com CI50 de 0,6 μ g/mL, para células epiteliais renais humanas (Zheljazkov *et al.*, 2008).

Costa *et al.* (2013) demonstraram que o δ -cadineno possui atividade tripanocida eficaz. Este mesmo composto apresenta propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias, conforme destacado por Taher *et al.* (2015). Além disso, Silva *et al.* (2019) observaram que o δ -cadineno extraído de *Eugenia brasiliensis* possui notável atividade antimicrobiana.

Em estudos com outras espécies da família Myrtaceae, observou-se que o α -cadinol está presente em plantas com diversas atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana de *Myrcia tomentosa* (Sa *et al.*, 2017) e a atividade repelente e inseticida de *Eucalyptus occidentalis* (Bande-Borujeni *et al.*, 2018).

Pacheco *et al.* (2021) investigaram as propriedades químicas e a atividade antibacteriana contra três cepas de *Listeria monocytogenes* do óleo essencial (OE) extraído das folhas de *Campomanesia aurea* (Myrtaceae) em diferentes estações do ano. Os resultados mostraram que o principal componente identificado foi o sesquiterpeno α -cadinol, representando 10,72% do OE extraído em abril e 12,79% do OE em outubro. Foi observada atividade bacteriostática e antibiofilme significativa no óleo contra cepas de *Listeria monocytogenes*, especialmente no óleo extraído no verão, que apresentou maior porcentagem do sesquiterpeno α -cadinol.

4. Conclusão

A análise do óleo essencial de *E. pohliana*, composto principalmente por β (E)-cariofileno, δ -cadineno e α -cadinol, demonstrou atividade significativa contra *Leishmania amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*,

indicando seu potencial para o tratamento da leishmaniose. Demonstrou forte capacidade antioxidante no experimento CAT. Além disso, o óleo demonstrou efeitos inibitórios significativos em diversas linhagens celulares cancerígenas, incluindo MCF-7, NCI-H292, K-562 e HL-60. Essas descobertas destacam a importância de *Eugenia pohliana* como um valioso recurso natural para o desenvolvimento de fármacos. Mais pesquisas são necessárias para compreender os mecanismos de ação e investigar as aplicações clínicas dos compostos bioativos encontrados no óleo essencial.

5. Referências

ATANASOV, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, 33(8), 1582-1614.

COSTA, E. V.; Dutra, L. M.; Salvador, M. J.; Ribeiro, L. H.; Gadelha, F. R.; Carvalho, J. E. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, v. 27, n. 7, p. 997-1001, 2013.

COSTA, W. K., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., Silva, V. B. G., de Aguiar, J. C. R. D. O. F., Navarro, D. M. D. A. F., ... & da Silva, M. V. (2022). Influence of seasonal variation on the chemical composition and biological activities of essential oil from *Eugenia pohliana* DC leaves. **Chemistry & Biodiversity**, 19(9), e202200034.

COSTA, W. K.; Oliveira, J. R. S.; Oliveira, A. M.; Santos, I. B. S.; Cunha, R. X.; Freitas, A. F. S.; Silva, J. W. L. M.; Silva, V. B. G.; Aguiar, J. C. R. O. F.; Silva, A. G.; Navarro, D. M. A. F.; Lima, V. L. M.; Silva, M. V., da. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112059, 2019.

DAHAM, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B., Ezzat, M. O., Majid, A. S., & Majid, A. M. (2015). The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, 20(7), 11808-11829.

EL-DAHIYAT, F., Rashrash, M., Abuhamdah, S., Abu Farha, R., & Babar, Z. U. D. (2020). Herbal medicines: a cross-sectional study to evaluate the prevalence and predictors of use among Jordanian adults. **Journal of pharmaceutical policy and practice**, 13, 1-9.

FINO, L., Al-Absi, G., Alnatour, D., Al-Darraji, M., Shehadeh, M., & Suaifan, G. (2023). Medicinal plants of Jordan: Scoping review. **Heliyon**.

FRANCOMANO, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., ... & Sinicropi, M. S. (2019). β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. **Applied Sciences**, 9(24), 5420.

HUI, L. M., Zhao, G. D., & Zhao, J. J. (2015). δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. **International journal of clinical and experimental pathology**, 8(6), 6046.

LUZ, T. R. S. A., Leite, J. A. C., de Mesquita, L. S. S., Bezerra, S. A., Silveira, D. P. B., de Mesquita, J. W. C., ... & Coutinho, D. F. (2020). Seasonal variation in the chemical composition and biological activity of the essential oil of *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze. **Industrial crops and products**, 153, 112600.

LAGO, J. H. G.; Souza, E. D.; Mariane, B.; Pascon, R.; Vallim, M. A.; Martins, R. C. C.; Baroli, A. A.; Carvalho, B. A.; Soares, M. G.; Santos, R. T.; Sartorelli, P. dos. Avaliação química e biológica de óleos essenciais de duas espécies de Myrtaceae — *Eugenia uniora* Terra Plinia trunciora (O. Berg.) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.

MATIAS, E. F., Alves, E. F., Silva, M. K., Carvalho, V. R., Figueredo, F. G., Ferreira, J. V., ... & Costa, J. G. (2016). Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, 87, 45-53.

NASCIMENTO, A. L., Guedes, J. B., Costa, W. K., de Veras, B. O., de Aguiar, J. C. R. D. O. F., Navarro, D. M. D. A. F., ... & da Silva, M. V. (2022). Essential oil from the leaves of *Eugenia pohliana* DC. (Myrtaceae) alleviate nociception and acute inflammation in mice. **Inflammopharmacology**, 30(6), 2273-2284.

PACHECO, L. A., Ethur, E. M., Sheibel, T., Buhl, B., Weber, A. C., Kauffmann, C., Marchi, M. I., Freitas, E. M., & Hoehne, L. Chemical characterization and antimicrobial activity of *Campomanesia aurea* against three strains of *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Biology**, 81(1), 69-76. 2021.

SA, F. A. S.; Paula, J. A. M.; Santos, P. A.; Oliveira, L. A. R.; Oliveira, G. A. R.; Liao, L. M.; Paula, J. R.; Silva, M. R. R. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC Leaves. **Molecules**, v. 22, p. 1-10, 2017.

TAHER, Y. A.; Samud, A. M.; El-Taher, F. E.; Ben-Hussin, G.; Elmezogi, J. S.; Al-Mehdawi, B. F.; Salem, H. A. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. **Libyan Journal of Medicine**, v. 10, p. 1-8, 2015.

4.2 ARTIGO 2

Artigo a ser submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*.



Potencial farmacológico do óleo essencial das folhas de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake

Eliane Alves Bandeira De Carvalho^{ab}, Wêndeo Kennedy Costa^a, João Victor de Oliveira Alves^a, Thiago Felix Da Silva^a, Maria Isabel De Assis Lima^{ab}, Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba^c, Bruno Olivera de Veras^a, Teresinha Gonçalves da Silva^c, Alisson Macário de Oliveira^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Eliete Cavalcanti da Silva^b, Marta Geresa Soares de Lucena^b, Márcia Vanusa da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil.

^b Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

^c Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

*Autor correspondente: Eliane Alves Bandeira De Carvalho

E-mail: elicarvalho2000@gmail.com

Resumo

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais têm revelado uma fonte promissora para a identificação de moléculas com potencial terapêutico. Alguns estudos destacam a eficácia de várias espécies, incluindo aquelas do gênero *Verbesina*, a espécie *V. macrophylla*, conhecida como "assa-peixe", é

particularmente destacada por seu uso popular no tratamento de inflamações, problemas renais e febre. O estudo visa avaliar o potencial farmacológico dessa espécie, considerando seus compostos químicos identificados anteriormente e seu uso tradicional. Folhas de *V. macrophylla* foram coletadas em Camocim de São Félix. O estudo buscou avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial contra diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, a atividade antioxidante foi avaliada por meio dos ensaios DPPH, ABTS e capacidade antioxidante total (TAC). O potencial citotóxico do óleo essencial foi investigado em linhas celulares cancerígenas, incluindo NCI-H292, HeLa, MCF-7, HL-60 e K-562. O óleo essencial de *V. macrophylla* revelou uma redução na multiplicação dos parasitas. O óleo apresentou potente atividade antioxidante quando comparada ao padrão utilizado. Além disso, exibiu citotoxicidade em linhagens tumorais, sugerindo um potencial terapêutico multifacetado. O estudo ressalta a importância de explorar as plantas medicinais na busca por tratamentos mais eficazes e acessíveis, enfrentando os desafios associados à variedade de quadros patológicos.

Palavras-Chaves: Antioxidante; Antitumoral; Citotoxicidade; Caatinga; Leishmania.

1. Introdução

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais têm revelado uma fonte promissora para a identificação de moléculas com potencial terapêutico. No entanto, é imperativo conduzir estudos que validem tanto as propriedades terapêuticas quanto a segurança toxicológica dessas plantas. Isso é crucial para assegurar a utilização dessas plantas para fins terapêuticos e para fornecer informações essenciais no desenvolvimento de novos medicamentos (Garima *et al.*, 2020, Khan *et al.*, 2022).

Alguns estudos demonstraram que diversas espécies são utilizadas na prática da medicina tradicional e vêm sendo submetidas a rigorosas avaliações e validações no que concerne ao seu potencial terapêutico. Alguns estudos demonstraram a eficácia de plantas no tratamento de dor, inflamação, infecções bacterianas, infecções fúngicas, problemas cardiovasculares, doenças

neurodegenerativas e como gastroprotetora (Haro-González *et al.*, 2021, Ashokkumar *et al.*, 2022, Zhao *et al.*, 2022).

O gênero *Verbesina* compreende um conjunto de plantas pertencentes à família Asteraceae, contando aproximadamente com 300 espécies. A maior diversidade dessas espécies é observada no México e nos Andes. As plantas pertencentes ao gênero *Verbesina* apresentam características que variam de subarbustivas a arbóreas, possuindo folhas alternadas a opostas, com lâminas que podem ser inteiras, pinatífidas a pinatipartidas. Sua capitulescência é corimboide, e os capítulos podem ser discoides ou radiados, enquanto as cipselas são aladas e aristadas (García-Bores *et al.*, 2020, Veras *et al.*, 2021, Powers *et al.*, 2022, Mehal *et al.*, 2023).

Dentre as espécies do gênero *Verbesina*, a espécie *V. macrophylla* que é conhecida popularmente como “assa-peixe” e é utilizada para tratar inflamações, problemas renais e febre. A planta é um arbusto que pode chegar a 3 metros de altura e é encontrada em populações densas em remanescentes de floresta atlântica e caatinga. As flores de *V. macrophylla* são brancas e apresentam estilete exposto com ramos abertos exibindo as linhas estigmáticas (Bezerra *et al.*, 2018, García-Bores *et al.*, 2020, Veras *et al.*, 2021, Moreira *et al.*, 2023).

Estudos químicos anteriores sobre os fitoconstituintes dessa espécie resultaram na identificação de sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos. Além disso, as comunidades têm empregado essa espécie na elaboração de chás, infusões e extratos, utilizando-os como remédios populares para tratar diversas condições, incluindo diabetes, hipertensão, infecções e inflamações (Mora *et al.*, 2013, Veras *et al.*, 2021). Diante disso, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial farmacológico de *V. macrophylla*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

As amostras de folhas da espécie *V. macrophylla* foram coletadas no município de Camocim de São Félix, localizado nas coordenadas geográficas 08°21'31" S e 35°45'43" C, uma coleta de material vegetal foi realizada. Uma exsicata desse material foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob o número de registro 55.081.

Durante um período de três horas, as folhas foram submetidas a um processo de hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Anteriormente esse óleo foi caracterizado quimicamente por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas, a caracterização demonstrou a presença de 31 componentes representando 94% de sua composição total, os compostos majoritários foram germacrene D (25,50%), germacrene D-4-ol (18,84%), bicyclogermacrene (11,33%), (E)-caryophyllene (9,88%) e δ -cadinene (4,27%) (Veras et al., 2021).

2.2 Avaliação da atividade leishmanicida in vitro

2.2.1. Cultivo das formas promastigotas das *Leishmania*

Os parasitos foram adquiridos no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (UFPE). As formas promastigotas das espécies de *Leishmania*, incluindo *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, foram cultivadas na fase exponencial de crescimento em meio LIT (Liver Infusion Tryptose - Himedia Laboratories). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation) inativado, 0,2% de hemina e 0,1% de antibióticos (10.000U/mL de penicilina e 10.000 μ g/mL de estreptomicina, Gibco by Life Technologies), sendo mantidos em estufa de B.O.D a 26°C.

2.2.2. Avaliação da atividade antipromastigota pelo método do MTT

Para testar a ação do óleo essencial sobre as formas promastigotas de *Leishmania* spp, foi determinada a IC₅₀ (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento dos parasitas em relação ao controle) a partir do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), que avalia a atividade metabólica das células com base na redução de enzimas mitocondriais do parasito (MOSMANN,1983). As culturas com inóculo inicial de 2×10^6 parasitas/mL, em fase exponencial de crescimento, foram distribuídas em placas de 96 poços. O óleo essencial foi diluído em meio LIT nas concentrações de 3,25 a 200 μ g/mL. A Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi utilizada como controle positivo e como controle negativo foi utilizado meio de cultura e o solvente DMSO (0,1%). As placas contendo os parasitas e os compostos foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂ por 72 horas.

Posteriormente foi adicionado a cada poço 20 μL de MTT (5mg/mL) e as placas foram incubadas por 3 horas em estufa de BOD a 37°C. Após esse período, o meio e o excesso de MTT foi aspirado e foram adicionados 100 μL de DMSO em todos os poços com incubação por 30 minutos para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas em um leitor de microplacas (BioRad Mark Microplate Spectrophotometer) em 595 nm. A densidade óptica (D.O.) média dos poços com a droga foram comparadas com a D.O. média dos poços controles. Os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração que inibe 50% das células viáveis (IC_{50}) foi calculada para definição do grau de citotoxicidade, através de regressão não linear.

2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

2.3.1 Ensaio DPPH (Sequenciamento de Radicais Livres)

Uma mistura de 250 μL de DPPH 1 mM (em metanol) foi misturada com 40 μL do óleo essencial em uma faixa de concentrações (de 31,25 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para testar a capacidade de sequestrar o radical DPPH. O experimento foi conduzido em temperatura ambiente e na ausência de luz por 25 minutos. O Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo, enquanto o metanol foi utilizado como controle negativo. A absorbância de cada solução foi medida a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (BioTek UQuant MQX200). A seguinte equação foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição (I%): $I\% = [(AcAs)/(Ac)]100$, onde Ac é a absorbância do controle e como é a absorbância da amostra.

2.4.2 Ensaio ABTS

Amostras (10 μL) de óleo essencial (31,25 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram misturadas por 6 minutos com 1 mL do radical ABTS e os resultados foram lidos em espectrofotômetro a 734 nm. Como antioxidante padrão, foi utilizado ácido ascórbico e as atividades de inibição foram calculadas com base na quantidade de ABTS removida. $\% = [(AcAs)/(Ac)]100$, onde Ac é a absorbância do controle e como é a absorbância da amostra.

2.4.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Amostras (100 μL) do óleo essencial ou do ácido ascórbico foram combinadas com 1 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de

gordura de sódio e 4 mM de acetato de amônio). Os tubos foram aquecidos a 95°C durante 90 minutos, depois arrefecidos até à temperatura ambiente, posteriormente a absorvância de cada reação foi medida a 695 nm. A reação controle foi 100 µL de metanol misturado com 1 mL da solução reagente. O padrão utilizado foi ácido ascórbico (1 mg/mL). A capacidade antioxidante das amostras foi calculada como a atividade antioxidante relativa em relação ao ácido ascórbico utilizando a fórmula: $CAT\% = [(AaAc)/(AaaAc)]100$, onde Aa é a absorvância da amostra, Ac é a absorvância do controle, e Aaa é a absorvância do ácido ascórbico.

2.5 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi determinada pelo método MTT. As linhagens celulares utilizadas em testes de citotoxicidade incluíram as células não tumorais, Vero (células epiteliais de rim de macaco), L-929 (fibroblastos murinos), e as linhagens tumorais NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e HeLa (carcinoma cervical), cultivadas em meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e K-562 (leucemia mielocítica aguda) em meio RPMI, ambos, suplementados com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. A cultura foi mantida em estufa atmosférica com 5% de CO₂ do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

As linhagens celulares foram incubadas após serem plaqueadas numa placa de 96 poços com uma concentração de 2×10^5 ou 3×10^6 células/mL. Após 24 horas, as amostras do estudo foram adicionadas em concentrações variando de 6,25 a 200 µg/mL. Após 72 horas de tratamento, cada poço recebeu 25 µL de MTT (5 mg/mL) e após 3 horas de incubação, o meio de cultura contendo o MTT foi aspirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. A um comprimento de onda de 560 nm, foi utilizado um leitor automático de microplacas para medir a absorvância. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, e a concentração (IC₅₀) que pode reduzir a viabilidade das células em 50% em comparação ao controle foi calculada para determinar o nível de citotoxicidade por meio de análise de regressão não linear.

2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão (\pm DP). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou Dunnett's (quando necessário). Os valores foram considerados significativamente diferentes em $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

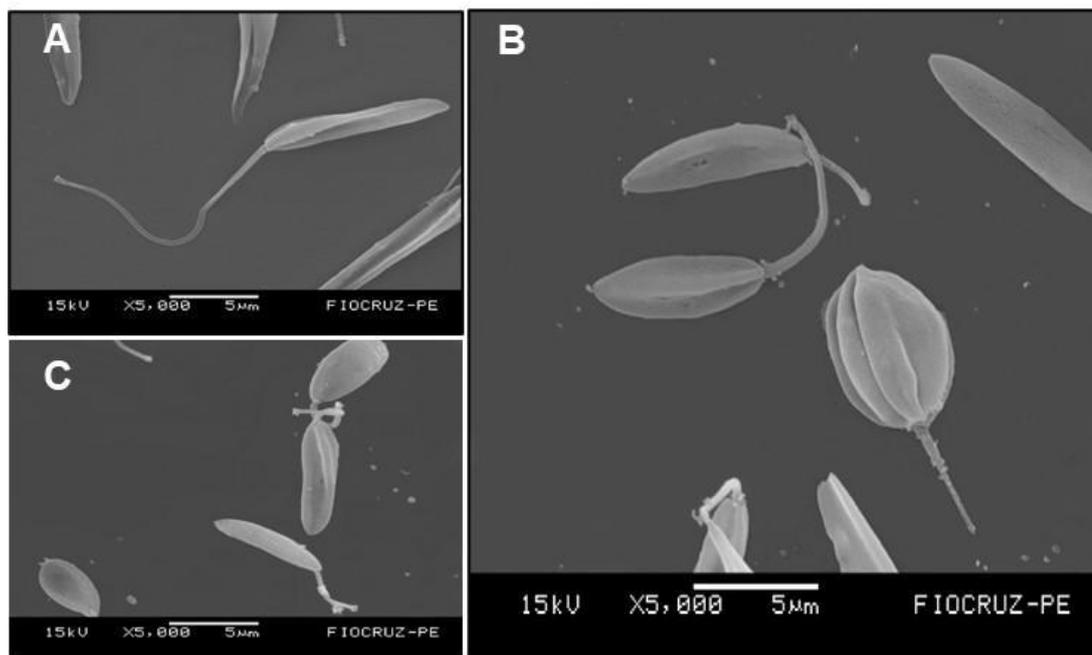
As espécies *Leishmania amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram cultivadas na presença de óleo essencial de *V. macrophylla* em concentrações variando de 3,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Após 72 horas de exposição, observou-se uma redução significativa e dose-dependente na capacidade de multiplicação dos parasitas. O óleo essencial de *V. macrophylla* demonstrou atividade contra *L. amazonensis*, com um IC_{50} de $43,14 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$, *L. infantum*, com IC_{50} de $38,22 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$, *L. braziliensis*, com IC_{50} de $178,40 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$, e *L. guyanensis*, com IC_{50} de $36,09 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito antileishmanial do óleo essencial de *Verbesina macrophylla*.

Espécie	Óleo essencial de <i>Verbesina macrophylla</i>
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. amazonensis</i>	$43,14 \pm 0,97$
<i>L. infantum</i>	$32,22 \pm 0,97$
<i>L. braziliensis</i>	$178,40 \pm 0,99$
<i>L. guyanensis</i>	$36,09 \pm 0,98$

A análise por microscopia eletrônica de varredura revelou visualmente a influência do óleo de *V. macrophylla* nas formas promastigotas de *L. infantum*. As imagens mostram que o grupo controle DMSO 0,1%, apresenta forma do corpo alongada com topologia da membrana e flagelo preservados. Já os grupos tratados com *V. macrophylla* ($1 \times \text{IC}_{50}$), apresenta diminuição no tamanho e variação no formato do corpo, além de encurtamento do flagelo.

Figura 1: Influência do tratamento com óleo essencial de *V. macrophylla* nas formas promastigotas de *L. infantum*.



O tratamento das Leishmanioses enfrenta desafios significativos devido à presença de cepas resistentes e à carência de fármacos de amplo espectro capazes de combater eficazmente as diversas formas evolutivas dos tripanossomatídeos. A resistência a medicamentos compromete a eficácia dos protocolos terapêuticos, tornando imperativo buscar alternativas inovadoras. Nesse contexto, a busca por agentes terapêuticos derivados de plantas medicinais tem ganhado destaque (Scarim *et al.*, 2020; Akbari, Oryan, Hatam, 2021; Ramalingam *et al.*, 2022).

A biodiversidade vegetal oferece uma vasta gama de compostos bioativos que podem apresentar atividade antileishmania. A descoberta e o desenvolvimento de fitoterápicos promissores podem não apenas superar as limitações dos tratamentos convencionais, mas também proporcionar opções terapêuticas mais acessíveis e sustentáveis. Investir em pesquisas que explorem o potencial das plantas medicinais no combate à *Leishmania* pode representar um avanço crucial na luta contra essa enfermidade negligenciada, contribuindo para estratégias mais efetivas e adaptáveis diante das complexidades associadas à variedade de parasitas envolvidos (Pereira *et al.*, 2021, Zarenezhad *et al.*, 2021, Mahmoudvand *et al.*, 2022).

Em um estudo sobre os constituintes bioativos de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce, da família Asteraceae, análises cromatográficas revelaram que o óleo essencial extraído das suas folhas é caracterizado pela predominância de D-germacreno e trans-cariofileno. O óleo essencial demonstrou atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como ação tripanocida frente a tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no nosso trabalho, onde a *Verbesina macrophylla* também integrante da família Asteraceae, apresentou como composto majoritário o D-germacreno e foi igualmente ativo contra *Leishmania amazonensis*, sugerindo um potencial terapêutico do óleo em tratamentos contra doenças parasitárias como leishmaniose e doença de Chagas (Martins *et al.*, 2017).

Moreira *et al.* (2019) relataram em sua pesquisa que os óleos essenciais de *Melampodium divaricatum* e *Casearia sylvestris* exibiram atividade leishmanicida significativa. As duas espécies apresentaram o mesmo perfil de compostos majoritários (E-cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno), porém em concentrações distintas. O *Melampodium divaricatum*, com maior concentração de E-cariofileno, apresentou melhor atividade contra as formas promastigotas com IC₅₀ de 24,2 µg/mL, sendo mais ativo que o composto E-cariofileno (IC₅₀ de 49,9 µg/mL). Possivelmente a ação sinérgica dos componentes desse óleo foi responsável pelo aumento da eficácia. A anfotericina B apresentou maior citotoxicidade contra macrófagos J774-A1 (CC₅₀ de 3,7 µg/mL), enquanto o E-cariofileno foi significativamente menos citotóxico (CC₅₀ de 62,1 µg/mL), indicando um perfil de segurança potencialmente melhor para uso terapêutico.

No estudo realizado por Veras *et al.*, (2021) foi relatado na composição química do óleo de *V. macrophylla* a presença de β-cariofileno como composto majoritário. Leite *et al.* (2013) destacou a relevância do β-cariofileno, um composto que se mostrou clinicamente eficaz contra *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Essa substância, pertencente à classe dos sesquiterpenos, demonstrou atividade farmacológica notável, sugerindo seu potencial como agente terapêutico em infecções causadas por esses patógenos.

O β -cariofileno ainda é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o que pode contribuir para seu impacto positivo em processos infecciosos e inflamatórios, como os provocados pelas espécies mencionadas. A identificação de compostos naturais com essa capacidade terapêutica fortalece a busca por alternativas inovadoras no desenvolvimento de tratamentos para doenças parasitárias (Koyama *et al.*, 2019, Scandiffio *et al.*, 2020, Hu *et al.*, 2022).

Diante disso, foram utilizados os métodos de eliminação radical DPPH, o experimento ABTS e capacidade antioxidante total (CAT) para avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *V. macrophylla*. Os resultados demonstram que o óleo essencial de *V. macrophylla* apresenta uma capacidade de redução do radical DPPH em $20,2 \pm 0,89$, já para o CAT $77,54 \pm 5,57$, entretanto não foi observada capacidade e eliminação do radical ABTS.

Essa atividade antioxidante pode estar relacionada aos compostos majoritários. O germacreno D, um sesquiterpeno encontrado no óleo essencial, tem sido identificado por exibir notável atividade antioxidante *in vitro*. Sua capacidade de atuar como agente antioxidante revela-se significativa na neutralização de radicais livres e na redução do estresse oxidativo. Este fenômeno é crucial, pois o estresse oxidativo está associado a uma variedade de processos patológicos, incluindo doenças crônicas, doenças degenerativas e processos infecciosos (Stranden *et al.*, 2003, Noge; Becerra, 2009, Oladeji *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2022).

Adicionalmente o β -cariofileno, também é descrito por apresentar propriedades antioxidantes. A capacidade do composto em neutralizar os radicais livres e reduzir o estresse oxidativo sugere seu potencial papel na proteção contra danos celulares associados a várias condições de saúde. No contexto da leishmaniose, a atividade antioxidante do β -cariofileno pode desempenhar um papel fundamental na mitigação do dano oxidativo induzido pelo parasita, contribuindo assim para a eficácia do tratamento (Gushiken *et al.*, 2022, Xiu *et al.*, 2022).

Muitas plantas medicinais contêm compostos bioativos que, além de exibirem propriedades antioxidantes, demonstram a capacidade de induzir citotoxicidade seletiva em células tumorais. Essa dualidade funcional sugere que os compostos responsáveis pela proteção celular contra danos oxidativos

também podem desempenhar um papel significativo na inibição do crescimento e na promoção do apoptose em células cancerosas. A exploração dessa associação pode levar à descoberta de agentes terapêuticos mais eficazes, oferecendo uma abordagem natural para o tratamento do câncer (Wang *et al.*, 2013, Garima *et al.*, 2020, Esmeeta *et al.*, 2022).

Diante disso, foi realizada a avaliação da citotoxicidade em diferentes linhagens de células. *Verbesina macrophylla* demonstrou perfis de IC₅₀ significativos nas linhagens tumorais HeLa (1,81±0,95), HL-60 (15,29±0,93), K-562 (21,04±0,89), MCF-7 (29,38±0,90) e NCI-H292 (30,72±0,97). Esse efeito citotóxico observado pode ser atribuído aos componentes majoritários. O óleo essencial de *V. Macrophylla* não apresentou citotoxicidade frente à linhagem não tumoral L-929 (62,53 ±0,86), indicando um perfil de segurança promissor para aplicações terapêuticas futuras. (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade citotóxica de *Verbesina macrophylla* em linhagens de células tumorais através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento.

	L-929	Vero	HeLa	IC ₅₀ ± R ²			
				MCF-7	NCI-H292	K-562	HL-60
<i>V. macrophylla</i>	62,53±0,86	39,56±0,92	1,81± 0,95	29,38±0,90	30,72±0,97	21,04±0,89	15,29±0,93

Em um estudo de revisão conduzido por Saab et al. (2018), foi evidenciado o potencial biológico do gênero Cedro e um aspecto de destaque na análise da literatura foi a atividade anticancerígena dos óleos essenciais das folhas do Cedro libani, que possuem como componentes majoritários o D-germacreno e β-cariofileno, apontados como responsáveis pela bioatividade da espécie. Estes achados estão em consonância com os resultados obtidos em nossa pesquisa, onde o óleo essencial de *Verbesina macrophylla*, que também tem como composto majoritário o D germacreno, apresentou um alto potencial citotóxico frente as células cancerígenas testadas, com atividade seletiva para as células de tumor cervical humano (HeLa), com uma de IC₅₀ 1,8 µg/mL.

O óleo essencial derivado da *Blepharocalix salicifolius*, apresentou atividade antifúngica contra o *Paracoccidioides brasiliensis* (156,25 µg·mL) e também exibiu atividade citotóxica contra a linhagem celular de carcinoma

mamário MDA-MB-231 (46,60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$), sendo mais seletivo para as células cancerígenas que para linhagem celular normal de mama MCF-10A (314.44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$). Não foi citotóxico, mas interferiu seletivamente no metabolismo celular das linhagens malignas. O composto majoritário dessa espécie foi o biciclogermacreno com um percentual de 17,50% (Furtado *et al.*, 2018).

Ao abordar a atividade citotóxica do óleo essencial de *P. aequale*, Silva *et al.* (2016) destacaram que esta eficácia pode ser atribuída principalmente à associação sinérgica entre os sesquiterpenos D-germacreno e Bicyclogermacreno. Adicionalmente Dahham (2015) descreveu que o β -cariofileno foi comprovadamente reconhecido por sua capacidade de interferir no processo de metástase, inibindo a migração, clonogenicidade e alterações morfológicas em células cancerígenas de cólon. Além disso, esse composto induz a apoptose por meio de fragmentação e condensação nuclear, incluindo a perturbação do potencial de membrana mitocondrial. Estes achados são corroborados pelos resultados obtidos em nossa pesquisa, sobre a atividade do óleo essencial de *Verbesina macrophylla*.

4. Conclusão

Os resultados deste estudo revelam que o óleo essencial de *V. macrophylla* emerge como um agente multifuncional de grande interesse biotecnológico e farmacêutico. Demonstrou-se de forma consistente que esse óleo essencial apresenta atividade antileishmania, destacando-se como um potencial alternativo terapêutico no combate às leishmanioses. Além disso, a evidência de atividade antioxidante aponta para a capacidade do óleo em mitigar danos oxidativos, sugerindo benefícios potenciais em condições relacionadas ao estresse oxidativo. O achado adicional de citotoxicidade em linhagens tumorais revela a versatilidade deste composto, oferecendo promissoras implicações no desenvolvimento de tratamentos contra o câncer. Assim, o óleo essencial de *V. macrophylla* destaca-se como uma fonte rica e diversificada de compostos bioativos, reforçando sua relevância na busca por terapias inovadoras e ampliando as possibilidades de sua aplicação em diversos campos da saúde.

Referências

AKBARI, M., Oryan, A., & Hatam, G. (2021). Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology letters**, 233, 80–86.

ASHOKKUMAR, K., Simal-Gandara, J., Murugan, M., Dhanya, M. K., & Pandian, A. (2022). Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities. **Phytotherapy research: PTR**, 36(7), 2839–2851.

BEZERRA, L. D. A., Mangabeira, P. A. O., de Oliveira, R. A., Costa, L. C. D. B., & Da Cunha, M. (2018). Leaf blade structure of *Verbesina macrophylla* (Cass.) FS Blake (Asteraceae): ontogeny, duct secretion mechanism and essential oil composition. **Plant Biology**, 20(3), 433-443.

DAHAM, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B., Ezzat, M. O., Majid, A. S., & Majid, A. M. (2015). The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, 20(7), 11808-11829.

DE VERAS, B. O., de Oliveira, J. R. S., de Menezes Lima, V. L., do Amaral Ferraz Navarro, D. M., de Oliveira Farias de Aguiar, J. C. R., de Medeiros Moura, G. M., da Silva, J. W., de Assis, C. R., M. V., & de Souza Lopes, A. C. (2021). The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. **Journal of ethnopharmacology**, 265, 113248.

ESMEETA, A., Adhikary, S., Dharshnaa, V., Swarnamughi, P., Ummul Maqsummiya, Z., Banerjee, A., Pathak, S., & Duttaroy, A. K. (2022). Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. **Biomedecine & pharmacotherapie**, 153, 113384.

FURTADO, F. B., Borges, B. C., Teixeira, T. L., Garces, H. G., Almeida Junior, L. D. D., Alves, F. C. B., ... & Fernandes Junior, A. (2018). Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Blepharocalyx salicifolius*. **International journal of molecular sciences**, 19(1), 33.

GARCÍA-BORES, A. M., Álvarez-Santos, N., López-Villafranco, M. E., Jácquez-Ríos, M. P., Aguilar-Rodríguez, S., Grego-Valencia, D., ... & del Carmen Benítez-Flores, J. (2020). *Verbesina crocata*: A pharmacognostic study for the treatment of wound healing. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27(11), 3113-3124.

GARIMA, S., Ajit Kumar, P., Marcy, D. M., Sakthivel, R., Bhim Pratap, S., & Nachimuthu Senthil, K. (2020). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the management of cancer and diabetes. **Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan**, 40(6), 1007–1017.

GUSHIKEN, L. F. S., Beserra, F. P., Hussni, M. F., Gonzaga, M. T., Ribeiro, V. P., de Souza, P. F., Campos, J. C. L., Massaro, T. N. C., Hussni, C. A., Takahira, R. K., Marcato, P. D., Bastos, J. K., & Pellizzon, C. H. (2022). Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin

wound excision model. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2022, 9004014.

HARO-GONZÁLEZ, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. **Molecules** (Basel, Switzerland), 26(21), 6387.

HU, Q., Zuo, T., Deng, L., Chen, S., Yu, W., Liu, S., Liu, J., Wang, X., Fan, X., & Dong, Z. (2022). β -Caryophyllene suppresses ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion via activation of the NRF2/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, 102, 154112.

KHAN, A., Akram, M., Thiruvengadam, M., Daniyal, M., Zakki, S. A., Munir, N., Zainab, R., Heydari, M., Mosavat, S. H., Rebezov, M., & Shariati, M. A. (2022). Anti-anxiety Properties of Selected Medicinal Plants. **Current pharmaceutical biotechnology**, 23(8), 1041–1060.

KOYAMA, S., Purk, A., Kaur, M., Soini, H. A., Novotny, M. V., Davis, K., Kao, C. C., Matsunami, H., & Mescher, A. (2019). Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. **PloS one**, 14(12), e0216104.

LIU, J., Chen, C., Wan, X., Yao, G., Bao, S., Wang, F., Wang, K., Song, T., Han, P., & Jiang, H. (2022). Identification of the sesquiterpene synthase AcTPS1 and high production of (-)-germacrene D in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial cell factories**, 21(1), 89.

MAHMOUDVAND, H., Ghasemian Yadegari, J., Khalaf, A. K., Hashemi, M. J., Dastyarhaghighi, S., & Salimikia, I. (2022). Chemical composition, antileishmanial, and cytotoxic effects *Ferula macrecolea* essential oil against *Leishmania tropica*. **Parasite epidemiology and control**, 19, e00270.

MARTINS M. M., De Aquino F. J. T., De Oliveira A., Do Nascimento E. A., Chang R., Borges M. S., et al. (2015). Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliiana* (Less) druce (Asteraceae). **J. Essent. Oil Bear. Plants** 18, 561–569.

MOREIRA, R. R. D.; Santos, A. G. dos; Carvalho, F. A.; Perego, C. H.; Crevelin, E. J.; Crotti, A. E. M.; Cogo, J.; Cardoso, M. L. C.; Nakamura, C. V. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 61, e33, 2019.

MEHAL, K. K., Kaur, A., Singh, H. P., & Batish, D. R. (2023). Investigating the phytotoxic potential of *Verbesina encelioides*: effect on growth and performance of co-occurring weed species. **Protoplasma**, 260(1), 77–87.

MOREIRA, G.L. *Verbesina* in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16375>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

NOGE, K., & Becerra, J. X. (2009). Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). **Molecules** (Basel, Switzerland), 14(12), 5289–5297.

OLADEJI, O. S., Adelowo, F. E., Oluyori, A. P., & Bankole, D. T. (2020). Ethnobotanical Description and Biological Activities of *Senna alata*. Evidence-based complementary and alternative **medicine** : eCAM, 2020, 2580259.

PEREIRA, P. S., Oliveira, C. V. B., Maia, A. J., Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D. M., Vega-Gomez, M. C., Rolón, M., Coronel, C., Duarte, A. E., Barros, L. M., Kamdem, J. P., Siyadatpanah, A., Wilairatana, P., & Coutinho, H. D. M. (2021). Cytotoxicity of Essential Oil *Cordia verbenaceae* against *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Molecules** (Basel, Switzerland), 26(15), 4485.

POWERS, C. N., Mayo, J. A., Moriarity, D. M., Vogler, B., Setzer, W. N., & McFeeters, R. L. (2022). Identification of Anticryptococcal Bornyl Compounds from *Verbesina turbacensis* and Their Structure-Activity Relationships. **Planta medica**, 88(14), 1341–1347.

RAMALINGAM, K., Gangwar, S., Balodi, D. C., Anand, A., Yadav, S., Biswas, S., Karunakaran Sasikala, A. K., Gupta, K. C., Batra, S., & Goyal, N. (2022). *Leishmania donovani* Dipeptidylcarboxypeptidase Inhibitor as a Potential Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 66(8), e0236121.

SAAB, A. M., Gambari, R., Sacchetti, G., Guerrini, A., Lampronti, I., Tacchini, M., ... & Efferth, T. (2018). Phytochemical and pharmacological properties of essential oils from *Cedrus* species. *Natural product research*, 32(12), 1415-1427. Scandiffio, R., Geddo, F., Cottone, E., Querio, G., Antoniotti, S., Gallo, M. P., Maffei, M. E., & Bovolín, P. (2020). Protective Effects of (E)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. **Nutrients**, 12(11), 3273.

SCARIM, C. B., Chelucci, R. C., Dos Santos, J. L., & Chin, C. M. (2020). The use of Sulfonamide Derivatives in the Treatment of Trypanosomatid Parasites including *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania* ssp. **Medicinal chemistry** (Sharjah (United Arab Emirates)), 16(1), 24–38.

SILVA, J. K. R., Pinto, L. C., Burbano, R. M., Montenegro, R. C., Andrade, E. H. A., & Maia, J. G. S. (2016). Composition and cytotoxic and antioxidant activities of the oil of *Piper aequale* Vahl. **Lipids in health and disease**, 15(1), 1-6.

STRANDEN, M., Liblikas, I., König, W. A., Almaas, T. J., Borg-Karlson, A. K., & Mustaparta, H. (2003). (-)-Germacrene D receptor neurones in three species of heliothine moths: structure-activity relationships. **Journal of comparative physiology**. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology, 189(7), 563–577.

WANG, S. J., Zheng, C. J., Peng, C., Zhang, H., Jiang, Y. P., Han, T., & Qin, L. P. (2013). Plants and cervical cancer: an overview. **Expert opinion on investigational drugs**, 22(9), 1133–1156.

XIU, Z., Zhu, Y., Han, J., Li, Y., Yang, X., Yang, G., Song, G., Li, S., Li, Y., Cheng, C., Li, Y., Fang, J., Li, X., & Jin, N. (2022). Caryophyllene Oxide Induces Ferritinophagy by Regulating the NCOA4/FTH1/LC3 Pathway in Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in pharmacology**, 13, 930958.

ZARENEZHAD, E., Agholi, M., Ghanbariasad, A., Ranjbar, A., & Osanloo, M. (2021). A nanoemulsion-based nanogel of Citrus limon essential oil with leishmanicidal activity against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **Journal of parasitic diseases** : official organ of the Indian Society for Parasitology, 45(2), 441–448.

ZHAO, H., Ren, S., Yang, H., Tang, S., Guo, C., Liu, M., Tao, Q., Ming, T., & Xu, H. (2022). Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & pharmacotherapy* = *Biomedecine & pharmacotherapie*, 154, 113559.

4.3 ARTIGO 3

Artigo a ser submetido ao *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.



Embriotoxicidade dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia pohliana* DC. e *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake da Caatinga

Eliane Alves Bandeira De Carvalho^{ab}, Wêndeo Kennedy Costa^{a*}, João Victor de Oliveira Alves^a, Thiago Felix Da Silva^a, Maria Isabel De Assis Lima^{ab}, Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba^c, Bruno Olivera de Veras^a, Teresinha Gonçalves da Silva^c, Alisson Macário de Oliveira^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Eliete Cavalcanti da Silva^b, Marta Gerusa Soares de Lucena^b and Márcia Vanusa da Silva^a

^a *Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil*

^b Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

^c Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil

*Autor correspondente: Eliane Alves Bandeira De Carvalho

E-mail: elicarvalho2000@gmail.com

Resumo

Este estudo foca na avaliação dos efeitos embriotóxicos dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia pohliana* e *Verbesina macrophylla*, plantas nativas da Caatinga brasileira. Embora esses óleos essenciais apresentem propriedades bioativas notáveis, como antinociceptivas, anti-inflamatórias e antimicrobianas, a necessidade de estudos toxicológicos é crucial para garantir a segurança de seu uso como plantas medicinais. O ensaio de embriotoxicidade foi conduzido em ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*. A análise morfológica e morfométrica dos embriões revelou variações significativas na largura do tubo neural no grupo tratado com *V. macrophylla*. Além disso, a análise da membrana corioalantóica indicou variações na vasculogênese e angiogênese, afetando a anastomose vascular e o peso da CAM nos embriões tratados com *V. macrophylla*. Embora não tenham sido observadas malformações evidentes, o estudo destaca a importância da avaliação embriotoxicológica para compreender os potenciais efeitos adversos durante o desenvolvimento embrionário dessas plantas medicinais da Caatinga.

Palavras-Chaves: Caatinga; Embriotoxicidade; *Gallus gallus domesticus*; Plantas medicinais; Toxicologia.

1. Introdução

A Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro abrigam uma rica variedade de flora que desperta crescente interesse científico. Esta região árida e única, marcada por uma vegetação adaptada às condições desafiadoras do semiárido, revela uma grandeza de plantas dotadas de propriedades bioativas notáveis. A busca por compostos terapêuticos tem conduzido pesquisadores a explorar a diversidade botânica da Caatinga, reconhecendo-a como uma fonte valiosa de potenciais medicamentos e substâncias benéficas à saúde humana (Bieluczyk *et al.*, 2025).

Dentre as notáveis espécies que enriquecem a diversidade da flora na Caatinga, destacam-se *Eugenia pohliana* DC. e *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F. Blake, evidenciando-se não apenas pela sua presença marcante, mas também pelas propriedades singulares contidas em seus óleos essenciais. Estas plantas, são adaptadas às condições climáticas específicas da Caatinga, e apresentam-se como verdadeiras fontes de compostos bioativos. *E. pohliana* tem sido objeto de estudos recentes que evidenciam seus efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos (Costa *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2022).

Da mesma forma, a *V. macrophylla* é extensivamente utilizada por comunidades na elaboração de chás, infusões e extratos, sendo reconhecida como remédio tradicional para tratar diversas condições, incluindo diabetes, hipertensão, infecções e inflamações (Mora *et al.*, 2013, Veras *et al.*, 2021).

Apesar da aplicação farmacológica, os estudos toxicológicos de plantas medicinais desempenham um papel crucial na garantia da segurança e eficácia desses recursos naturais, que há séculos têm sido utilizados na medicina tradicional em diversas culturas ao redor do mundo. A eficácia terapêutica está intrinsecamente ligada à segurança. Estudos toxicológicos ajudam a estabelecer uma relação equilibrada entre benefícios terapêuticos e possíveis riscos à saúde, fornecendo dados essenciais para a validação das propriedades medicinais das plantas (Bouyahya *et al.*, 2021).

Diante disso, o estudo da embriotoxicidade de plantas medicinais desempenha um papel crucial, fornecendo informações essenciais sobre os potenciais efeitos dessas plantas durante a fase crítica do desenvolvimento embrionário. Sua relevância é evidenciada em diversas áreas: em primeiro lugar,

oferece uma base para a segurança na gravidez, permitindo que mulheres grávidas façam escolhas informadas sobre alternativas naturais para tratar condições de saúde (Santos; Volejo, 2021).

Além disso, contribui para o desenvolvimento de medicamentos, identificando substâncias benéficas que possam ser seguras para uso durante a gestação. Adicionalmente, compreender os efeitos das plantas medicinais no desenvolvimento embrionário possibilita a prevenção de malformações congênitas associadas ao uso inadequado dessas substâncias. Diante disso, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos embriotóxicos dos óleos essenciais provenientes das folhas de *E. pohliana* DC. e *V. macrophylla* (Cass.) S.F. Blake, ambas espécies da Caatinga.

2. Metodologia

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

As folhas de *E. pohliana* foram coletadas no Parque Nacional do Vale do Catimbau, situado no município de Buíque, Pernambuco, Brasil (8°30'57"S 37°20'59"W), e uma exsicata identificada com o número 91.440 foi depositado na Herbaria Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agropecuário de Pernambuco. As folhas da espécie *V. macrophylla* foram coletadas no município de Camocim de São Félix (08°21'31"S e 35°45'43"W), e uma exsicata desse material foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho, vinculado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, com o número de registro 55.081. As folhas foram submetidas a um processo de hidrodestilação durante três horas, e cada espécie gerou um óleo essencial, que foi armazenado em recipientes de vidro a uma temperatura de 5 °C antes de ser submetido aos bioensaios.

2.2 Ensaio de Embriotoxicidade

2.2.1 Desenho experimental

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*, da linhagem COBB, foram cedidos gentilmente pela G3 Agroavícola, localizada na Fazenda Santa Teresinha, Rod. PE 95 km 20, Riacho das Almas – PE/Brasil (8°08'23.0"S 35°51'52.1"W). O manejo dos embriões e o procedimento histológico de montagem total foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT),

vinculado ao Departamento de Histologia e Embriologia, do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O emblocamento em parafina e os cortes transversais dos embriões foram realizados no Laboratório de Histotécnica do mesmo departamento. Esta pesquisa foi realizada com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) número 0053/2022.

2.2.2 Grupos experimentais

Foram utilizados 120 ovos fertilizados da espécie *Gallus gallus domesticus*, sendo 60 destinados para a técnica de montagem total e 60 para a realização dos cortes transversais. Ao chegar da granja, os ovos foram colocados no laboratório por 12 horas em temperatura de 22°C para amenizar o estresse decorrente do deslocamento. Após esse período, a casca foi higienizada com papel toalha umedecido com etanol 70%. Para retomar o processo de desenvolvimento, os ovos foram colocados por duas horas em uma incubadora automática, com temperatura de aproximadamente 37,5°C e umidade relativa de 65% a 75%. Após o período de duas horas de incubação, os ovos destinados à técnica de montagem total foram retirados da incubadora e divididos em três grupos, contendo 20 ovos cada: G1 (PBS pH 7,0 + DMSO (0,1%), grupo controle), G2 (72 µg/ml do óleo essencial de *Eugenia pohliana*) e G3 (77 µg/ml do óleo essencial de *Verbesina macrophylla*). Foi realizado o procedimento de ovoscopia, que possibilitou a visualização da câmara de ar. Neste local, utilizando uma seringa de insulina foram injetados 100 µL das soluções de cada grupo. Em seguida, os ovos foram selados com fita adesiva, identificados e incubados por 48 horas.

2.2.3 Processamento dos ovos fertilizados

Após a incubação por 48 horas, todos os ovos fertilizados foram retirados simultaneamente da incubadora e colocados por 30 minutos na geladeira para dessensibilizar os embriões. As cascas dos ovos foram quebradas com o auxílio de uma tesoura, possibilitando a visualização do disco embrionário, onde foi adicionado o fixador Bouin por um minuto. Cada disco embrionário foi retirado com uma tesoura de ponta fina e transferido para uma placa de Petri contendo água destilada, na qual o excesso de vitelo foi removido com o auxílio de um

pincel. Em seguida, os embriões foram transferidos para uma placa de Petri contendo o fixador Bouin, por duas horas. Após esse período, os embriões foram armazenados em tubos tipo Falcon contendo etanol 70%, onde permaneceram até a realização do procedimento histológico de montagem total.

2.2.4 Procedimento histológico de montagem total

Para a realização da técnica de montagem total, de acordo com Kmecick et al. (2019), os embriões armazenados em tubos do tipo Falcon, com etanol 70%, foram hidratados com água destilada e imersos no corante Hematoxilina por 30 segundos. Em seguida, foi realizada a desidratação dos embriões através de uma bateria crescente de etanol (70%, 80%, 90% e duas de 100%), por dez minutos cada. Para o processo de diafanização, os embriões receberam dois banhos consecutivos de xilol, com duração de dez minutos cada. Para a montagem das preparações, os embriões foram transferidos das placas de Petri para lâminas, onde foi adicionado o Bálsamo do Canadá e por último a lamínula. No processo de secagem, as preparações foram colocadas em uma estufa com temperatura de aproximadamente 50°C por uma semana.

2.2.5 Procedimento histológico de cortes transversais

Para a realização dos cortes transversais, seguindo o procedimento adaptado de Silva et al. (2021), foram utilizados 60 ovos fertilizados divididos em três grupos (G1, G2 e G3) contendo 20 ovos cada. Após o período de 48 horas de incubação, os ovos foram processados e os embriões foram removidos e armazenados em tubos Falcon contendo etanol 70%. Os embriões foram submetidos a uma bateria crescente etanólica (70%, 80%, 90% e 100%) por dez minutos cada, foram diafanizados em xilol por dez minutos e impregnados em parafina líquida na estufa (60°C) pelo mesmo período de tempo. Para o processo de emblocamento, cada embrião foi retirado da estufa e colocado em esquadros de Leuckart contendo parafina líquida por 30 minutos em temperatura ambiente até a secagem completa do bloco. Para obter as secções transversais, cada bloco foi cortado no micrótomo com a espessura de 4 µm. Para iniciar o procedimento histológico, as lâminas foram imersas em dois banhos consecutivos de xilol, por cinco minutos cada, um banho contendo uma solução de etanol (100%) e xilol, por três minutos e passaram por uma bateria etanólica

decrecente (100%, 90% e 70%) por três minutos cada. Na etapa de coloração, as lâminas foram imersas em água destilada por um minuto, coradas com hematoxilina por três minutos, receberam um banho em água corrente por cinco minutos, foram imersas em etanol 70% por um minuto e coradas com eosina por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas nos etanóis 90% e 100% por um minuto cada, receberam um banho contendo uma solução de etanol (100%) e xilol por um minuto e foram diafanizadas em dois banhos consecutivos de xilol, por cinco e dez minutos respectivamente. Para finalizar as preparações, foi adicionado Entellan® sobre os cortes transversais e colocada a lamínula.

2.2.6 Procedimento para a análise morfológica dos embriões

A captura das imagens para a análise morfológica dos embriões foi realizada em um microscópio óptico com câmera digital acoplada (MOTICAM 1000 1.3M Pixel–USB 2.0, QUIMIS), utilizando o Software MOTIC Image Plus 2.0. As fotomicrografias da montagem total foram realizadas com o aumento de 40x e as fotomicrografias dos cortes transversais foram obtidas utilizando o aumento de 400x. O estadiamento dos embriões foi realizado de acordo com o modelo de Hamburger e Hamilton (1951).

2.2.7 Procedimento para a análise morfométrica dos embriões

A análise morfométrica dos embriões foi realizada utilizando o Software MOTIC Image Plus 2.0. A largura do tubo neural foi mensurada em todos os embriões desenvolvidos por 48 horas, pertencentes ao estágio 15, na altura dos pares de somitos 10º, 15º e 20º com o intuito de padronizar a análise. A primeira medida da região cefálica foi realizada em todos os embriões do mesmo estágio, traçando uma reta a partir do diencéfalo ao seu lado oposto, tendo como referência o olho em formação. A segunda medida da região cefálica foi realizada em todos os embriões do estágio 15, traçando uma reta a partir do mesencéfalo em direção ao telencéfalo.

2.3 Avaliação da membrana corioalantóica

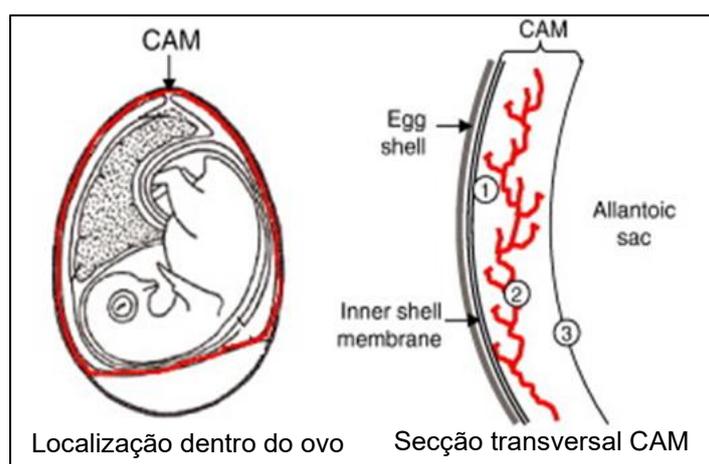
2.3.1 Ensaio angiogênico

Ovos de galinha White Leghorn (Lote 23/001bck/2023) fertilizados foram incubados a 37 °C em atmosfera umidificada (>60 % humidade relativa). Após estocagem prévia em sala fria, os ovos foram incubados em chocadeira (Ref.

IP35), à temperatura de 38,5 °C equipada com ventilação forçada, controle digitalizado de umidade (33 %) e rolamento automático de ovos a cada 2 horas. Após 72 horas de incubação (dia embrionário – E3, estágio 20-HH) dos ovos, foi realizada uma abertura de aproximadamente 100 mm² na casca para a implantação aleatória de um anel de sílica (10 mm DI) para a deposição das soluções testes, em seguida eles foram vedados e re-incubados (38,5 °C) na chocadeira por 12 dias (Hamburger; Hamilton, 1951, Auerbach *et al.*, 1974).

No décimo dia de incubação (dias embrionários – E10, estágio 36-HH) os ovos foram divididos em quatro grupos contendo 6 ovos cada: G1- 2x IC50 (70,92µg/mL) do óleo essencial (OE) de *Eugenia pohliana* DC; G2- 2x IC50 (76,44µg/mL) do óleo essencial (OE) de *Verbesina macrophylla*; G3 (PBS pH 7,0 + DMSO 0,1%) grupo controle da substância e G4 (Solução salina 0,9%, grupo controle negativo). Os tratamentos foram iniciados e realizados por meio de suportes–discoides de papel filtro (1 disco/embrião), com cerca de 2 mm de diâmetro implantados no terço externo da membrana corioalantóica (Figura 1), onde vasos capilares estavam crescendo (vasos de pequeno calibre). As amostras foram pipetadas (1 mL das substâncias testes e das soluções controles) nos suportes de papel filtro sobre a CAM em câmara de fluxo.

Figura 1: Membrana corioalantóide (CAM-assay).



A – Localização da CAM em embrião com casca após 12 dias. B – Secção da CAM com 10 – 12 dias de incubação. Com a conclusão dos tratamentos, as janelas na casca foram novamente fechadas e os ovos re-incubados (38,5°C) por mais 24 horas (E15; estágio 41-HH). Com doze dias de incubação, os ovos

foram retirados da chocadeira. O efeito angiogênico foi observado considerando o número de vasos formados em volta do disco e expressa como porcentagem de vasos no limite do disco, em relação ao controle negativo. Adaptado de Vargas et al, 2007.

2.3.1 Processamento histológico

Os tecidos previamente fixados em formaldeído tamponado à 10 % por 48 horas, foram submetidos ao processamento histológico e corados em Hematoxilina-Eosina. Este procedimento teve início com uma desidratação tecidual com subsequentes imersões de 30 minutos em concentrações crescentes de Álcool etílico (Synth, Brasil) 70 %, 80 %, 90 % e 100 % (duas vezes). Após esta etapa, as amostras foram diafanizadas em dois banhos consecutivos contendo solução de Xilol PA (Anidrol, Brasil) por 30 minutos cada. Na sequência, o material biológico foi submetido a duas imersões de 30 minutos cada em Parafina Histológica (Easy Path, Brasil) líquida mantida em Estufa à 60 °C. Após a imersão em parafina, os embriões foram emblocados em disposição longitudinal. Os blocos confeccionados, foram cortados sequenciadamente de 5µm de espessura em Micrótomo RM2235 (Leica Biosystem, Brasil) pescados em lâminas foscas de vidro para coloração. As lâminas, primeiramente, permaneceram cerca de 10 min em estufa à 60 °C para desparafinização e posteriormente foram realizados dois banhos consecutivos de 5 minutos cada em solução contendo Xilol PA (Anidrol, Brasil).

Foi realizada uma reidratação tecidual através de uma sequência de banhos de 3 minutos das lâminas em soluções decrescentes de Álcool Etílico (Synth, Brasil) 100 % (três vezes), 90 %, 80 % e 70 %, finalizando a hidratação com um banho de 10 minutos em água corrente. Assim, os cortes histológicos foram imersos em Hematoxilina por 5 minutos, seguido de uma lavagem em água corrente por 5 minutos, até remoção do excesso da coloração. Na sequência, os cortes foram contra corados com Eosina durante 2 minutos. Em seguida, os mesmos foram submetidos a banhos de 5 minutos em Álcool Etílico (Synth, Brasil) 100 % e 70 %, seguido de dois banhos em Xilol PA (Anidrol, Brasil) por 5 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas em lâmina-lamínula com o auxílio de Enterlan (Merck, Alemanha).

2.4 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados provenientes da morfometria foi realizada através do programa GraphPad Prism 7.0. Foi utilizado o teste T com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). A análise estatística do ensaio de membrana corioalantóica foi realizada utilizando o teste paramétrico T de Student pareado e expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Todos os testes foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) e intervalo de confiança de 95%. Os resultados que foram submetidos ao teste KS, apresentou distribuição de Gauss normal, sendo este o motivo do teste T paramétrico pareado.

3. Resultados e discussão

Embriões de aves, principalmente da espécie *Gallus gallus domesticus*, são utilizados como modelo experimental na área de biologia do desenvolvimento, tanto em estudos de embriologia comparada, como também em testes de embriotoxicidade (Albuquerque; Veiga; Wernke, 2019). Os principais atrativos, que favorecem a escolha desta espécie, incluem as semelhanças morfológicas com embriões pertencentes a outros grupos de vertebrados e a alta sensibilidade à ação de agentes químicos (Kmecick *et al.*, 2019). Em vista disso, este trabalho utilizou embriões de *Gallus gallus domesticus* como modelo para investigar possíveis efeitos embriotóxicos do óleo essencial de *E. pohliana* e *V. macrophylla*.

A incubação dos 60 ovos fertilizados, destinados a técnica de montagem total, durante o período de 48 horas resultou em 60 embriões, demonstrando, portanto, uma taxa de 100% de fertilidade. Nas granjas, onde ocorre a produção de ovos em larga escala, os lotes devem atingir pelo menos 96,7% de fertilidade (COBB-VANTRESS, 2008). Essa taxa pode sofrer variações, sendo relatados valores de 88,09% (Bertin *et al.*, 2019) e 92,2% (Marques *et al.*, 2017). Isso pode ocorrer devido à influência de fatores nutricionais, ambientais, genéticos, a idade das matrizes e a senescência reprodutiva dos machos (King'ori, 2011, Lemaître; Gaillard, 2017).

Durante o manejo dos embriões, para a remoção do disco embrionário, comumente ocorrem perdas em decorrência do rompimento da membrana vitelina. Diante disso, foram contabilizados 49 embriões, sendo 17 no G1, 16 no

G2 e 16 no G3. Díaz *et al.* (2020) utilizaram seis embriões por grupo para avaliar os efeitos teratogênicos do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek) sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Em outro estudo, Wagh e Shinde (2022) utilizaram cinco embriões por grupo para avaliar os efeitos teratogênicos do Modafinil, um fármaco neurotrópico utilizado no tratamento de distúrbios do sono. Isso demonstra que a quantidade de embriões processados em nossa pesquisa corrobora com a quantia relatada em outros estudos de embriotoxicidade sendo, portanto, considerada aceitável pela literatura científica.

Os 49 embriões provenientes da incubação por 48 horas e processados através da técnica de montagem total foram estadiados de acordo com o modelo proposto por Hamburger e Hamilton (1951). Através desse método de classificação, a idade aproximada dos embriões é determinada de acordo com a morfologia de estruturas em desenvolvimento, tais como, linha primitiva, tubo neural, somitos e vesículas encefálicas. No grupo G1 foram identificados embriões pertencentes aos estádios 12 (5,89%), e 15 (94,1%). No grupo G2 foram evidenciado o estágio 15 (100%) e no G3 foram identificados os estádios 12 (6,25%), 13 (6,25%), 14 (6,25%) e 15 (81,25%), conforme observado na tabela 1.

Tabela 1: Estadiamento dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, incubados por 48 horas, de acordo com o modelo de Hamburger e Hamilton (1951).

Grupos	Total de embriões	Estádios de desenvolvimento			
		12	13	14	15
G1: PBS + DMSO (0,1%)	17	1	---	---	16
	%	5,89%	---	---	94,1%
G2: 72 µg/ml do óleo essencial de <i>Eugenia pohliana</i> DC.	16	---	---	---	16
	%	---	---	---	100%
G3: 77 µg/ml do óleo essencial de <i>Verbesina</i>	16	1	1	1	13

macrophylla (Cass.) S. F.

Blake.

% 6,25% 6,25% 6,25% 81,25%

(---) Ausente.

Fonte: Autoria própria.

Nos grupos G1 e G3 foram identificadas variações de estádios entre os embriões. Nossos achados corroboram com a pesquisa de Silva et al. (2021) que, ao realizarem o estadiamento em embriões de 48 horas, tratados com a lignana iangambina, proveniente de *Ocotea duckei* Vattimo-Gil, identificaram a presença dos estádios 13, 14 e 15. Em outro estudo, no qual foi investigada a embriotoxicidade da riparina III, um alcaloide isolado de *Aniba riparia* (Nees) Mez, a variação obtida foi ainda mais significativa, sendo identificados os estádios 9, 10, 11 e 12 (Lima et al., 2017).

As variações de estádios, comumente observadas entre os embriões de *Gallus gallus domesticus* em desenvolvimento, podem ser influenciadas por um conjunto de fatores metabólicos e ambientais (Branum; Tazawa; Burggren, 2016). Dentre os principais fatores se destacam, o intervalo de tempo entre postura, transporte e o armazenamento dos ovos e também as condições de incubação, como umidade relativa, incidência de luz na casca, temperatura e as concentrações de oxigênio e CO₂ (Boleli et al., 2016; Pokhrel et al., 2018).

Entretanto, apesar de a incubadora artificial mimetizar um ambiente considerado ideal para o desenvolvimento embrionário, alguns parâmetros não podem ser modificados. Estes incluem o peso e o tamanho dos ovos, porosidade da casca, qualidade e disponibilidade de nutrientes no albúmen e na gema, além da própria genética da espécie (Oviedo-Rondón; Velleman; Wineland et al., 2020).

A análise morfológica dos embriões de *Gallus gallus domesticus* incubados por 48 horas foi realizada com os embriões pertencentes ao estágio 15, por este prevalecer em ambos os grupos, possibilitando uma análise comparativa do tubo neural e dos somitos em desenvolvimento. Em todos os embriões analisados, tanto os pertencentes ao grupo controle (G1), como também aqueles que foram tratados com 72 µg/ml do óleo essencial de *Eugenia pohliana* DC. (G2) e 77 µg/ml do óleo essencial de *Verbesina macrophylla*

(Cass.) S. F. Blake. (G3), não foram observadas malformações no tubo neural, tanto na região cefálica quanto na região caudal.

O neuróporo anterior, abertura localizada na região cefálica do tubo neural, se fechou por completo em todos os embriões. Este evento morfológico, que ocorre entre os estádios 11 e 12, corrobora com a descrição de Hamburger e Hamilton (1951), pois segundo os autores esta característica corresponde ao desenvolvimento normal da porção anterior do tubo neural.

Diferente do nosso estudo, Kusumaningrum, Rahayu e Puryatni (2015) ao analisarem embriões tratados com a curcumina, isolada de *Curcuma longa* Linn, observaram um retardo no fechamento do neuróporo anterior de maneira dependente da dose. Siripattanaphol *et al.* (2020) também relataram o mesmo retardo no processo de oclusão do neuróporo anterior em embriões tratados com cloridrato de metformina, um produto natural obtido a partir de *Galega officinalis* Linn. De acordo com Sigmirean (2022) o fechamento incompleto da região cefálica do tubo neural resulta em uma malformação denominada anencefalia. Segundo Schimp *et al.* (2021) esta malformação é considerada a forma mais grave de defeito do tubo neural, sendo caracterizada pela ausência de grande parte do tecido cerebral e dos ossos do crânio, e a sua ocorrência é incompatível com a vida.

Na região anterior do tubo neural, os embriões de ambos os grupos apresentaram as cinco vesículas encefálicas secundárias (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo). Foi observada similaridade morfológica e ausência de malformações, sinalizando que o óleo essencial de *Eugenia pohliana* DC. e o óleo essencial de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S. F. Blake. não interferem no desenvolvimento da região cefálica de embriões de *Gallus gallus domesticus*.

Diferente dos nossos resultados, Chaisriram *et al.* (2018) ao analisarem embriões tratados com rifampicina, antibiótico comumente utilizado no tratamento da tuberculose, observaram um retardo na formação das vesículas encefálicas secundárias. Seelarak *et al.* (2020) também observaram o mesmo retardo na região anterior do tubo neural em embriões tratados com tartrazina, corante frequentemente utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

A importância de investigar a morfologia das vesículas encefálicas secundárias se justifica devido ao fato destas estruturas serem essenciais ao

desenvolvimento do cérebro. De acordo com Harris (2015), malformações na região anterior do tubo neural ocasionam distúrbios neurológicos como a microcefalia, na qual o cérebro e o crânio apresentam o tamanho reduzido. Como consequência os indivíduos portadores desta condição clínica podem sofrer atrasos no desenvolvimento, paralisia cerebral, deficiência intelectual e crises de epilepsia (Becerra-Solano; Mateos-Sánchez; López-Muñoz, 2021).

As vesículas ópticas de todos os embriões apresentaram desenvolvimento normal, sendo possível visualizar o cálice óptico completamente formado e o contorno duplo distinto na região da íris, corroborando com a morfologia descrita por Li *et al.* (2019).

Diferente dos nossos resultados, Roongruangchai *et al.* (2018) ao analisarem embriões tratados com glutamato monossódico, produto utilizado como aditivo alimentar, observaram um formato irregular do copo óptico, anoftalmia (ausência do olho) e microftalmia (tamanho do olho reduzido). De acordo com Hosseini e Taber (2018), a ocorrência de malformações nas vesículas ópticas ocasiona graves efeitos na visão, uma vez que o funcionamento do olho depende do desenvolvimento normal das suas estruturas.

Os somitos de todos os embriões tiveram desenvolvimento normal, sendo caracterizados como estruturas mesenquimais, de morfologia cuboide, dispostas em ambos os lados do tubo neural e da notocorda, conforme descrito por Ward *et al.* (2018).

Diferente do nosso estudo, Roongruangchai *et al.* (2018) observaram um retardo no desenvolvimento dos somitos de embriões expostos ao glifosato, herbicida de amplo espectro utilizado na agricultura. De acordo com Duess *et al.* (2020), a interferência de substâncias químicas durante o desenvolvimento embrionário pode ocasionar falhas nos processos de sinalização ou formação dos somitos.

A justificativa em realizar investigações morfológicas com ênfase nos somitos é relacionada ao fato destas estruturas serem os precursores embrionários dos segmentos ósseo e muscular em adultos. Segundo Draga *et al.* (2019), durante o processo de maturação dos somitos, as suas células se diferenciam originando o dermatomo, o miótomo e o esclerótomo, precursores da derme, dos músculos, e das vértebras e costelas, respectivamente.

Em toda a extensão caudal do tubo neural, dos embriões de ambos os grupos, foi identificado o fechamento do neuróporo posterior e não foram observadas malformações. Resultados semelhantes foram relatados por Emon *et al.* (2015) ao analisarem a morfologia do tubo neural de embriões expostos ao benzoato de sódio, um conservante utilizado na indústria alimentícia.

A similaridade morfológica observada em nossos achados sugere que o óleo essencial de *Eugenia pohliana* DC. e o óleo essencial de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S. F. Blake. não interferem no fechamento da região caudal do tubo neural de embriões de *Gallus gallus domesticus*. Segundo Lee e Gleeson (2020), o fechamento incompleto do neuróporo posterior é responsável pela anomalia congênita denominada espinha bífida, caracterizada pela protusão da medula espinhal. As condições clínicas associadas a esta malformação podem incluir disfunção da bexiga e do intestino, anormalidades no quadril, joelho e pé, além de paralisia das pernas (Tsujimura *et al.*, 2011, Lim; Yi, 2021).

Figura 2. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*.

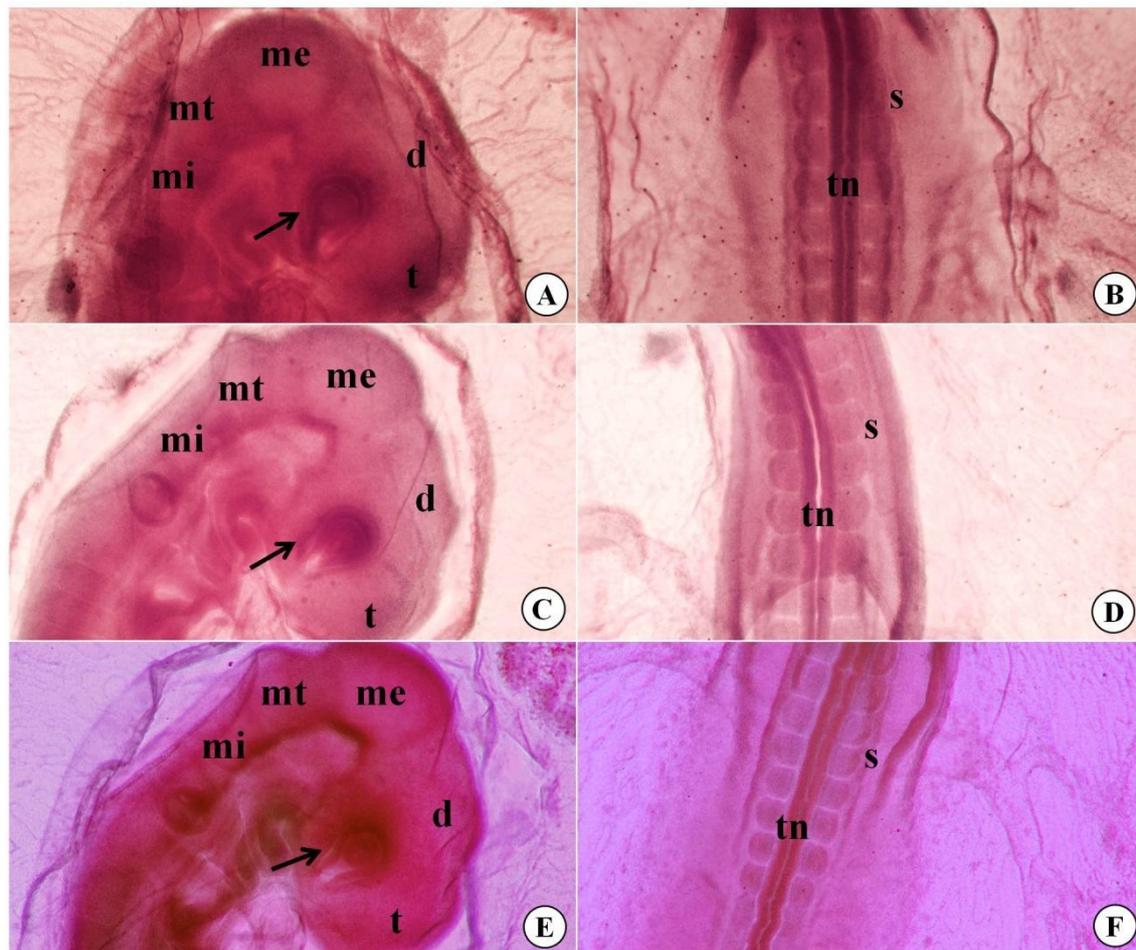


Processados através da técnica de montagem total, incubados por 48 horas e pertencentes ao estágio 15, sendo G1 (A), G2 (B) e G3 (C). Na extremidade caudal (A, B e C) é observado que houve regressão da linha primitiva (ponta de seta). Coloração hematoxilina. Aumento de 100x

Na extremidade caudal do tubo neural, o nó de Hensen regrediu em todos os embriões, portanto, foi observado que não houve persistência da linha primitiva (Figura 2). Segundo Cinelli *et al.* (2021), falhas durante o processo de regressão da linha primitiva originam um teratoma sacrococcígeo, tumor localizado na base do cóccix, constituído histologicamente por tecidos derivados dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. De acordo

com Nakamura *et al.* (2020), indivíduos acometidos por este tumor podem apresentar comprometimento das funções intestinais e urológicas e dificuldades de locomoção. As fotomicrografias dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, incubados por 48 horas, podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3: Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*



Processados através da técnica de montagem total, incubados por 48 horas e pertencentes ao estágio 15, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Na região cefálica (A, C e E) são visualizadas as vesículas encefálicas secundárias: telencéfalo (t), diencefalo (d), mesencefalo (me), metencefalo (mt) e mielencefalo (mi); também podem ser observadas as vesículas ópticas (seta). Na região caudal (B, D e F) são observados os somitos (s) dispostos aos pares no tubo neural (tn). Coloração hematoxilina. Aumento de 40x.

A análise morfológica das estruturas internas dos embriões de *Gallus gallus domesticus* incubados por 48 horas foi realizada a partir de cortes transversais em 60 embriões. Em todos os embriões analisados, não foram observadas malformações e ambos os grupos (G1, G2 e G3) apresentaram semelhanças morfológicas.

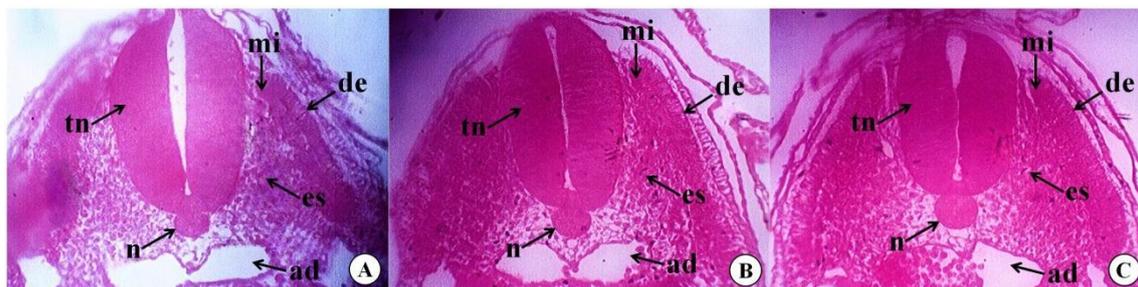
A aorta dorsal de todos os embriões apresentou morfologia considerada normal. A aorta dorsal em aves, como o *Gallus gallus domesticus*, é formada por meio de um processo conhecido como arco aórtico. No caso do *Gallus gallus domesticus*, a aorta dorsal é derivada, em parte, dos arcos aórticos durante o processo de morfogênese embrionária. Uma malformação na aorta dorsal pode comprometer a eficiência do sistema circulatório, resultando em uma entrega inadequada de oxigênio e nutrientes para os tecidos e órgãos em desenvolvimento. Isso pode levar a deficiências no crescimento e desenvolvimento celular. O padrão geral de formação da aorta dorsal por meio de arcos aórticos é uma característica comum nos vertebrados, incluindo as aves (Jaffredo *et al.*, 2013)

O tubo neural de todos os embriões demonstrou características dentro da normalidade, com o teto e o assoalho mais delgados do que as paredes laterais, não sendo identificada a presença de defeitos, e a notocorda apresentou o seu característico formato arredondado. O tubo neural dá origem ao cérebro e à medula espinhal. Defeitos nessa estrutura podem resultar em anormalidades no desenvolvimento dessas partes críticas do sistema nervoso central, afetando funções motoras, sensoriais e cognitivas.

Nos embriões de todos os grupos (G1, G2 e G3), a estrutura dos somitos continuou preservada, sendo possível visualizar claramente as delimitações entre dermatomo, miótomo e esclerótomo. Os somitos são segmentos mesodérmicos encontrados ao longo do eixo do embrião vertebrado. Eles são formados durante o desenvolvimento embrionário e são fundamentais para a formação da coluna vertebral, dos músculos e de outras estruturas associadas (Gilbert; Barresi, 2019).

As fotomicrografias dos embriões de *Gallus gallus domesticus*, incubados por 48 horas, e processados através da técnica de cortes transversais podem ser observadas na Figura 3.

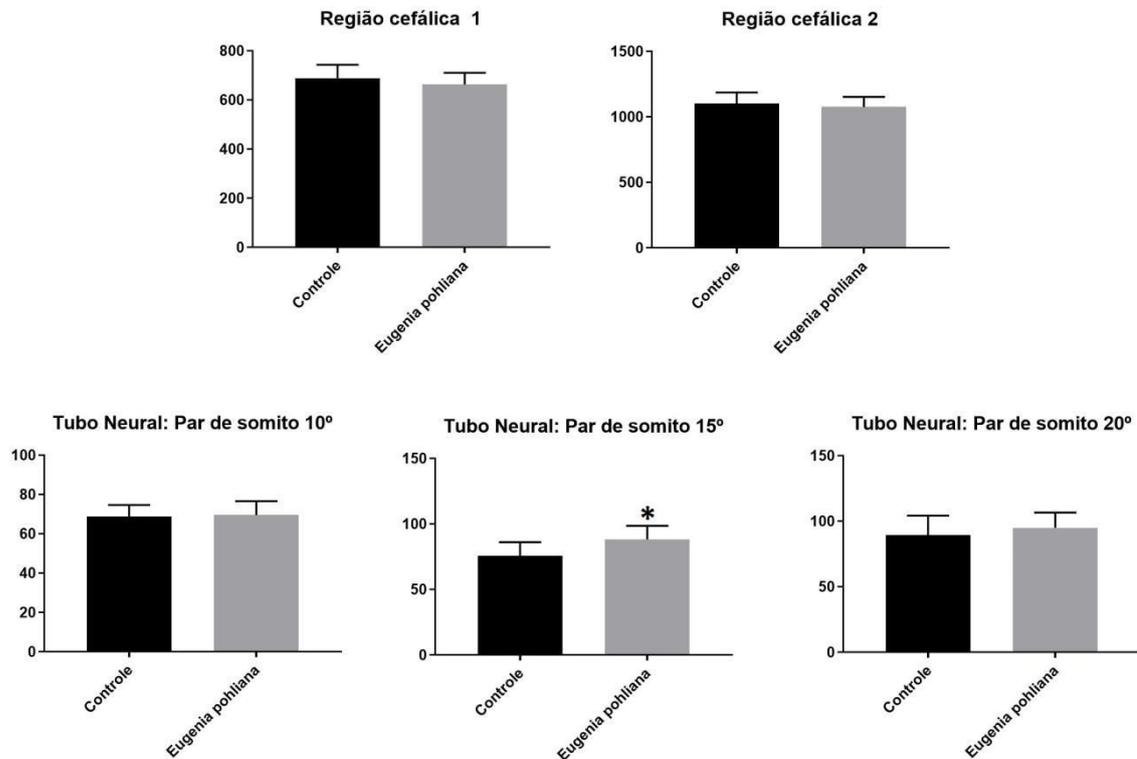
Figura 4: Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus*, processados pela técnica de corte transversal, incubados por 48 horas.



G1 (A), G2 (B) e G3 (C). Podem ser visualizados o tubo neural (tn) com o teto e o assoalho com espessura delgada, a notocorda (n) com delimitação arredondada e a aorta dorsal (ad). Também é possível visualizar o somito em processo de diferenciação dividido em dermatomo (de), miótomo (mi) e esclerótomo (es). Coloração hematoxilina - eosina. Aumento de 400x.

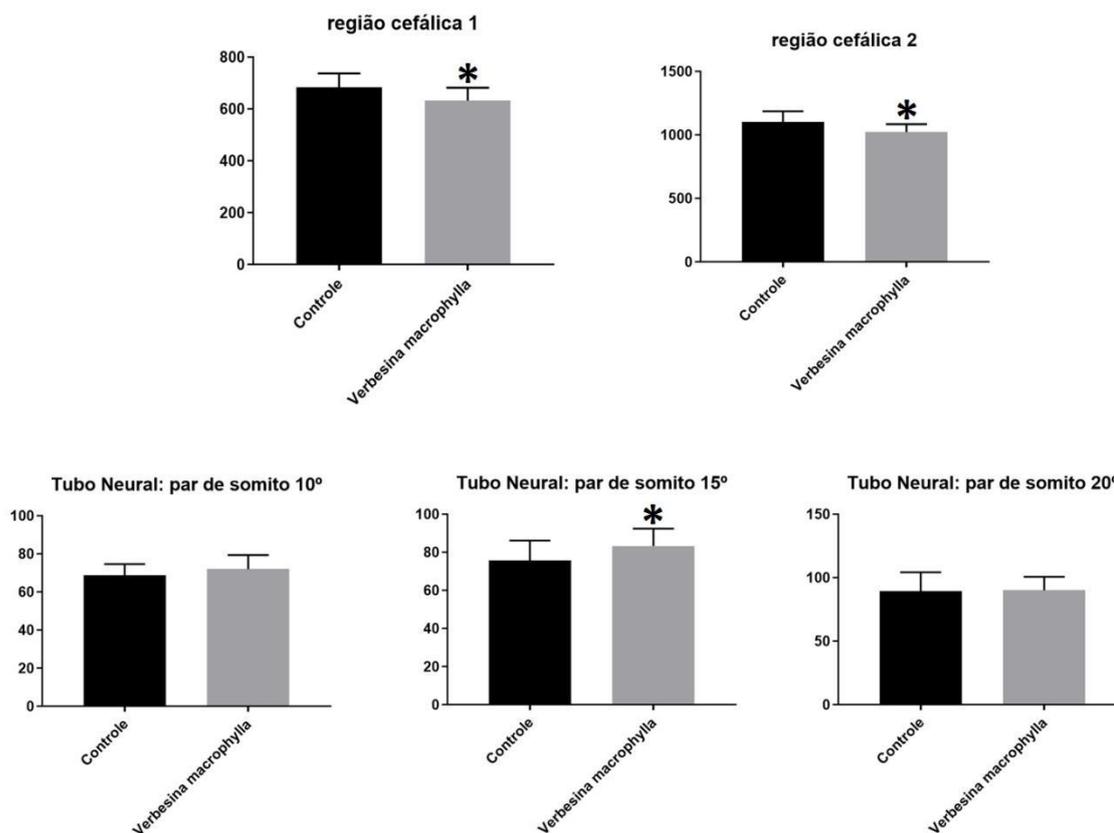
A análise estatística realizada a partir dos dados morfométricos da região cefálica e do tubo neural demonstrou que alguns achados morfométricos apresentaram variações estatísticas significativas. Na comparação com o grupo controle (G1), o grupo tratado com o óleo essencial de *Eugenia pohliana* DC. (G2) apresentou variação estatística significativa da largura do tubo neural na altura do 15º par de somitos (Figura 4). Com relação à comparação do grupo controle (G1) com o grupo tratado com o óleo essencial de *Verbesina macrophylla* (Cass.) S. F. Blake foram identificadas variações estatísticas significativas na região cefálica 1 e 2, e também da largura do tubo neural na altura do 15º par de somitos (Figura 5).

Figura 4: Análise da morfometria da região cefálica e do tubo neural dos embriões de *Gallus gallus domesticus* tratados com *Eugenia pohliana*.



Incubados por 48 horas, no estágio 15. São observados os dados comparativos entre o grupo controle (G1) e a *Eugenia pohliana* DC. (G2). Variação estatística significativa (*).

Figura 5. Análise estatística da morfometria da região cefálica e do tubo neural dos embriões de *Gallus gallus domesticus* tratados com *Verbesina macrophylla*.



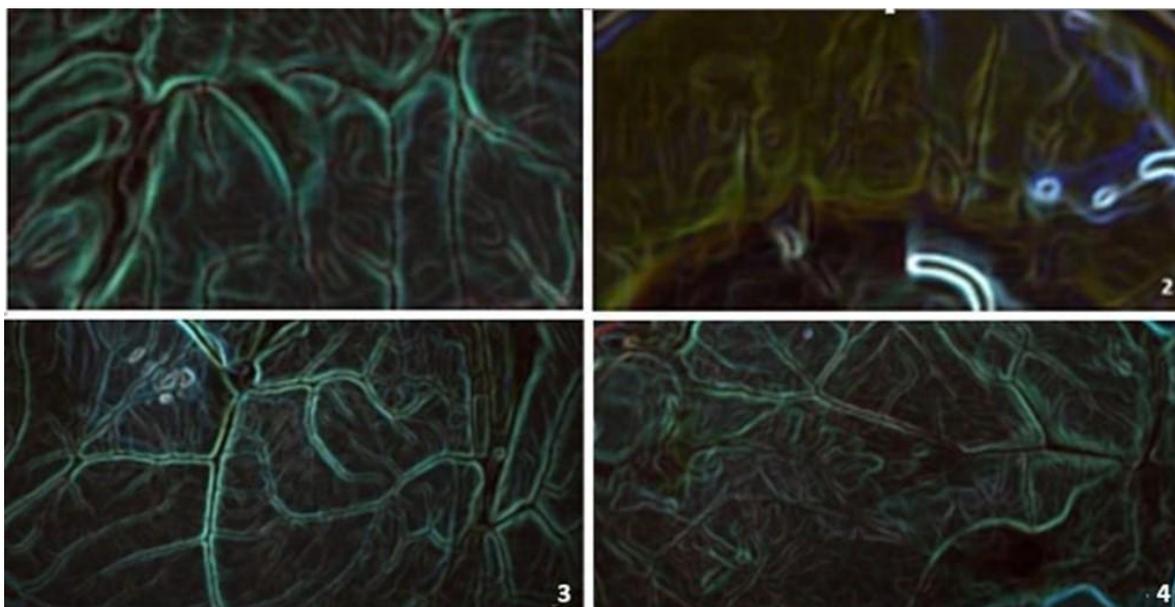
Incubados por 48 horas, no estágio 15. São observados os dados comparativos entre o grupo controle (G1) e a *Verbessina macrophylla* (Cass.) S. F. Blake. (G3). Variação estatística significativa (*).

A avaliação da membrana corioalantóica (CAM) em ovos de galinha desempenha um papel significativo em estudos de embriotoxicidade. A membrana corioalantóica é uma membrana extraembrionária que envolve o embrião durante o desenvolvimento embrionário. A CAM é altamente vascularizada e desempenha um papel importante no suprimento de nutrientes e oxigênio para o embrião. Qualquer substância embriotóxica pode afetar o desenvolvimento normal da CAM, tornando-a uma ferramenta sensível para detectar efeitos adversos.

No estudo foi possível observar que houve diferença significativa ($p < 0,5$) entre os embriões dos grupos tratados (G1 e G3) e os embriões tratados dos grupos (G2) da neovasculação após 12 dias de incubação tanto após o período

de incubação de 3 como de 7 dias, quando comparados com o grupo controle negativo (solução salina a 0,9 %) (figura 6).

Figura 6: Rede vascular da remodelação da membrana corioalantóide (CAM-assey) em embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação. Após tratamento: G1 (2x IC₅₀ do OE de *Eugenia pohliana* DC); G2 (2x IC₅₀ do OE de *Verbesina macrophylla*); G3 (PBS pH 7,0 + DMSO 0,1. Grupo controle negativo G4 (Solução salina 0,9%).



Os ovos embrionados dos tratamentos G1, G2 e G3 e controle negativo (solução salina 0,9 %) (Figura 7). A quantificação dos vasos que representam a vasculogênese e angiogênese indica a que a distribuição e densidade dos vasos na CAM foi irregular. Nos grupos 1 e 3 parece que houve mais estímulos a formação de novos do que no grupo 2, isto quando comparados entre si e com o grupo controle negativo (Tabela 2).

Figura 7: Quantificação da vasculogênese (V) e da angiogênese em embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação. Classificação dos vasos de acordos com os grupos experimentais e controle do CAM-assey.

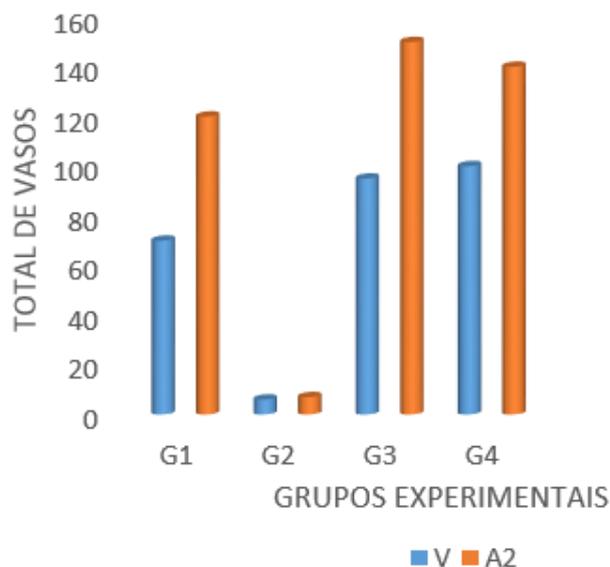


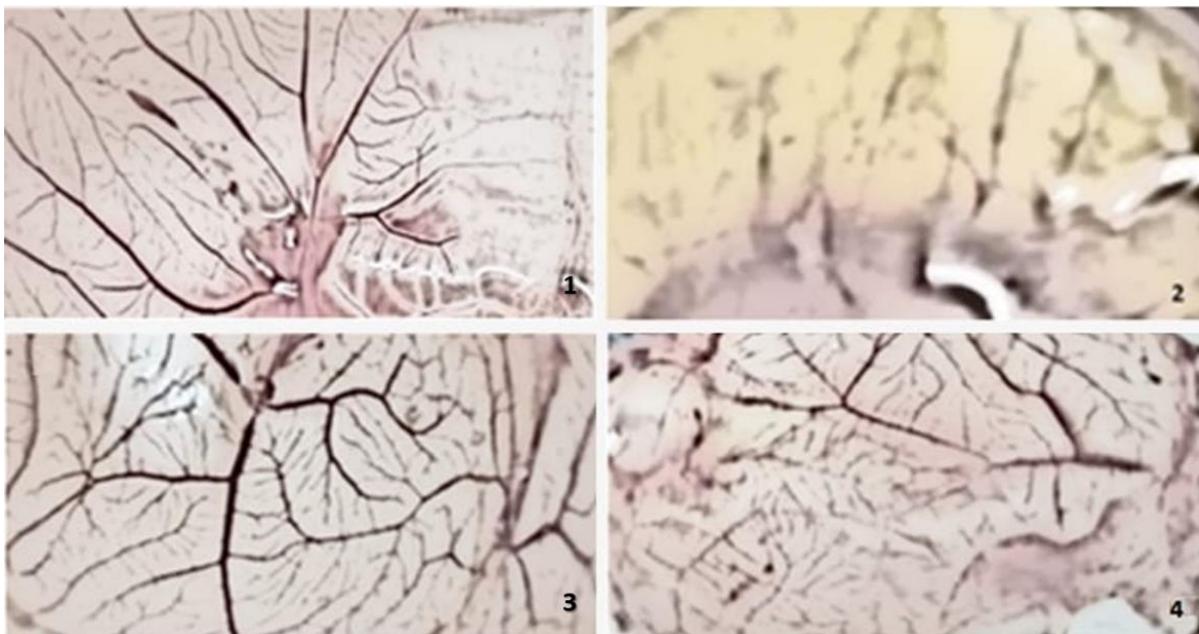
Tabela 2: Quantificação da vasculogênese e neovasculogênese em CAM-assey, em embriões (n= 6) de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação. Valores expressos em média e erro padrão da média.

GRUPOS	1	2	3	4
VG	70 ± 0,1	6 ± 1,1	95 ± 0,7	100 ± 0,0
AV	120 ± 0,8	7 ± 1,0	150 ± 1,5	140 ± 0,5
AMV (%)	86	0	89	97
RV	20 ± 0,7	4 ± 1,1	22 ± 0,6	27 ± 0,9
PCAM	19 ± 0,4	11 ± 0,0	21 ± 0,4	27 ± 0,1

Vasculogênese (VG), Angiogênese (AV), Anastomose Vascular (AMV), Realimento dos Vasos (RV), Peso da CAM (PCAM).

Houve registro da anastomose vascular em CAM-assey nos tratamentos dos grupos estudados (tabela 2, figura 8). Os grupos G1 e G3 apresentaram resposta a maturação vascular significativa ($p < 0,5$) quando comparados entre si, mas pouco significativo ($p < 0,5$) em relação ao grupo controle negativo durante o desenvolvimento embrionário de 12 dias de incubação. As hierarquias das estruturas vasculares apresentaram morfologia preservada, exceto no grupo tratado G2 (figura 8).

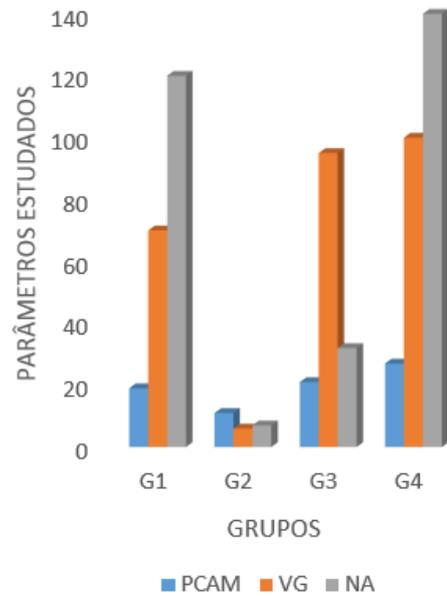
Figura 8: Rede vascular madura evidenciando o efeito proliferativo e antiproliferativo em membrana corioalantóide (CAM-assey) em embriões de *Gallus gallus domesticus* no 12º dia de incubação.



Após tratamento: G1 (2x IC₅₀ do OE de *Eugenia pohliana* DC); G2 (2x IC₅₀ do OE de *Verbesina macrophylla*); G3 (PBS pH 7,0 + DMSO 0,1. Grupo controle negativo) G4 (Solução salina 0,9%).

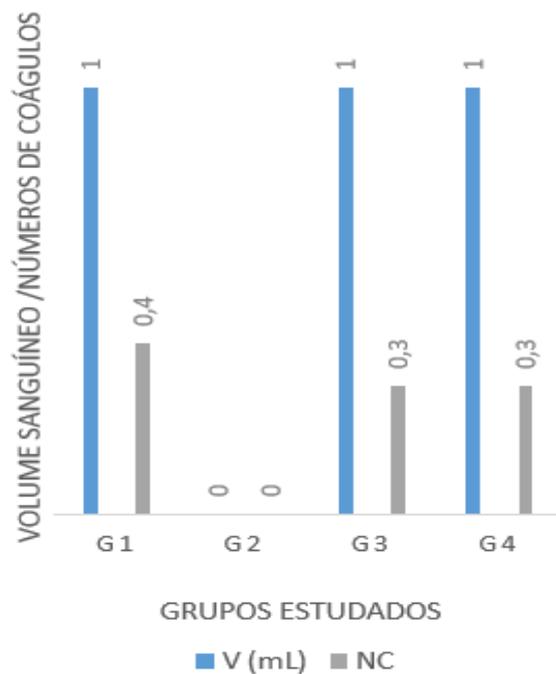
As membranas CAM dos grupos apresentam peso diferentes, como evidenciados nos grupos G1, e G3, suas membranas foram mais pesadas ($p < 0,5$) que demais grupos, contudo o grupo controle negativo apresentou um peso maior para este tecido. Esta resposta talvez seja em função da densidade dos vasos principais e secundários que apresentam anastomose (figura 9).

Figura 9: Peso da membrana corioalantóide (PCAM), Vasculogênese (VG) e angiogênese (AV) em CAM-assey de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação.



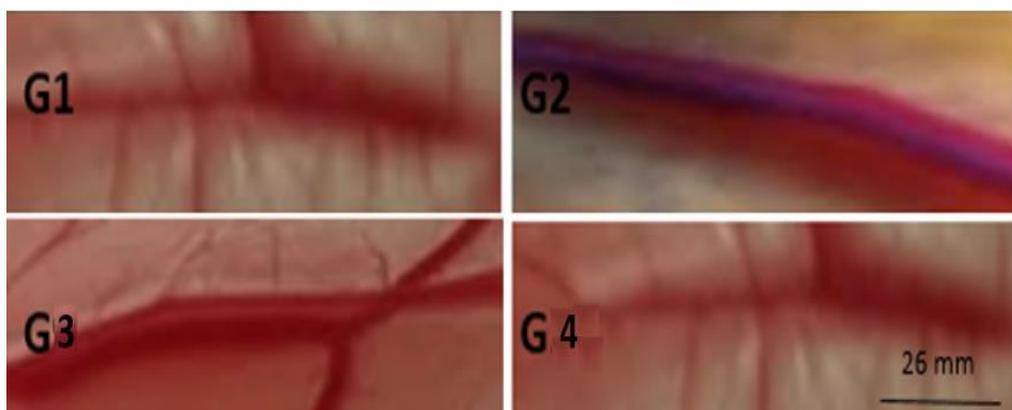
A atividade proliferativa dos vasos em CAM-assey dos embriões estudados foi evidenciada nos grupos G1, G3 e G4 e a antiproliferativa no grupo G2. Essa condição de maturação dos vasos talvez interfira na perfusão dos fluidos vasculares (figura 10 e 11).

Figura 10: Volemia (V) de fragmento (26 mm) de um vaso principal e número de coágulos (NV) em membrana corioalantóide (CAM-assey) de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação.



O sangue presente nos vasos principais revelou que havia sangue coagulado nos embriões dos grupos G2 e G3, o que impedia de quantificar o volume no seu interior, bem como fazer outras avaliações. Foi identificado nos demais grupos a presença de coágulos, sangue com coloração vermelho escarlate (figura 11).

Figura 11: Fragmento (26 mm) de um vaso principal em membrana corioalantóide (CAM-assey) de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação.



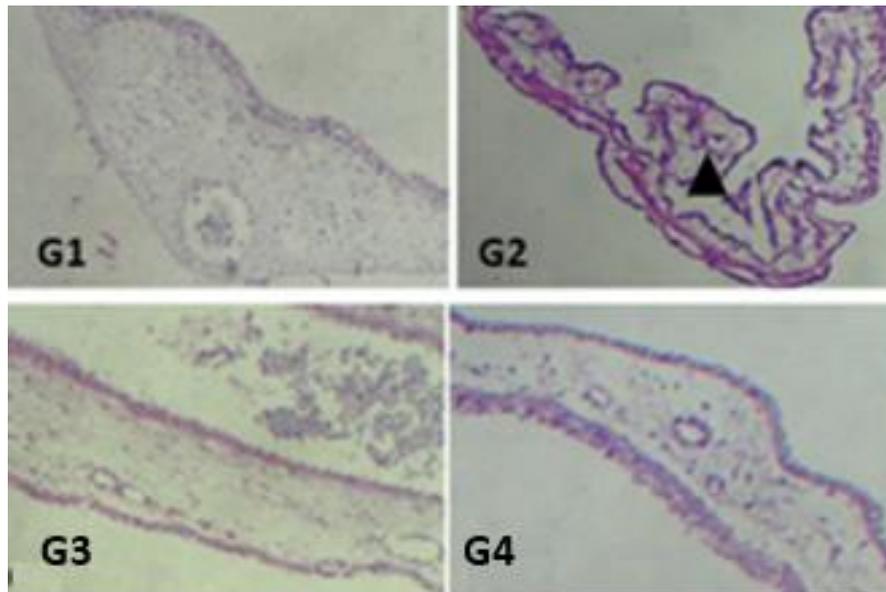
O número de coágulo (NC) variou entre os grupos ($p < 0,5$). Com a exposição do sangue e com o auxílio de uma lupa estereoscópica os coágulos foram visualizados nas seguintes ordens: **0,3 NC** (G3, G4), **0,4 NC** (G1), e nos grupos 2, a coagulação foi total (figura 8). Os coágulos encontrados possivelmente interferiram na perfusão do sangue. A morfologia da membrana corioalantóide (CAM-assey) se caracteriza por apresentar complexo vascular (a), os folhetos ectoderma (b), endoderma (c), mesoderma (d), epitélio (e) (figura 12).

Figura 12: Fotomicrografia do fragmento do grupo controle negativo (G4) evidenciando os folhetos embrionários na membrana corioalantóide (CAM-assey) de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação.



A histologia da membrana corioalantóide (CAM-assey) corados com hematoxilina-eosina dos grupos tratados e controle apresentou homogenia morfológica em relação aos três folhetos embrionários (figura 13). Nos grupos G1, G3 e G4 foi observado vasos sanguíneos regulares, alguns recém formados e algumas possivelmente com eritrócitos. No entanto nos grupos G2, a membrana corioalantóide apresentou-se pouco preservada. No G2 os vasos estavam amorfos (cabeça de seta).

Figura 13: Fotomicrografia do fragmento dos grupos estudados evidenciando os aspectos morfológicos dos constituintes da membrana corioalantóide (CAM-assey) de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 12 dias de incubação.



4. Conclusão

Com base nas observações morfológicas realizadas, constatou-se que os óleos essenciais obtidos de *E. pohliana* e de *V. macrophylla* não induziram malformações no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, nas condições experimentais adotadas. Contudo, é importante destacar que certos parâmetros morfométricos apresentaram variações estatisticamente significativas. Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de conduzir novos estudos com o objetivo de aprofundar a compreensão acerca da toxicidade associada a esses óleos essenciais. A investigação adicional permitirá uma análise mais abrangente dos efeitos dessas substâncias. Essa abordagem mais abrangente é essencial para garantir uma compreensão abrangente e precisa dos efeitos desses óleos essenciais, subsidiando assim possíveis aplicações seguras e eficazes.

Referências

- ALBUQUERQUE, C. A. C.; VEIGA, C. B.; WERNKE, Â. Análise dos efeitos do ácido p-cumárico de *Eugenia catharinensis* em embriões de *G. domesticus* tratados com acetato de chumbo. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 8, p. 11909-11926, 2019.
- BECERRA-SOLANO, L. E.; MATEOS-SÁNCHEZ, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, E. Microcephaly, an etiopathogenic vision. **Pediatrics & Neonatology**, v. 62, n. 4, p. 354-360, 2021.
- BERTIN, A.; MOCZ, F.; CALANDREAU, L.; PALME, R.; LUMINEAU, S.; DARMAILLACQ, A. S.; DICKEL, L.; ARNOULD, C.; HOUDELIER, C. Human behaviour at the origin of maternal effects on offspring behaviour in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). **Physiology & behavior**, v. 201, p. 175-183, 2019.
- BIELUCZYK, Wanderlei et al. From overgrazed land to forests: assessing soil health in the Caatinga biome. **Journal of Environmental Management**, v. 374, p. 124022, 2025.
- BOLELI, I. C.; MORITA, V. S.; MATOS-JR, J. B.; THIMOTHEO, M.; ALMEIDA, V. R. Poultry egg incubation: integrating and optimizing production efficiency. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, p. 1-16, 2016.
- BOUYAHYA, Abdelhakim et al. Moroccan antidiabetic medicinal plants: Ethnobotanical studies, phytochemical bioactive compounds, preclinical investigations, toxicological validations and clinical evidences; challenges, guidance and perspectives for future management of diabetes worldwide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 147-254, 2021.
- BRANUM, S. R.; TAZAWA, H.; BURGGREN, W. W. Phenotypic developmental plasticity induced by preincubation egg storage in chicken embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Physiological reports**, v. 4, n. 4, p. e12712, 2016.
- CINELLI, D. P.; STOICA, I.; ATWAN, F. PARAN, S. A rare presentation of Sacrococcygeal Teratoma as recurrent natal cleft abscess in childhood. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 64, p. 101727, 2021.
- CHAISRIRAM, N.; PLAKORNKUL, V.; ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; SRIPAORAYA, K.. The teratogenic effect of rifampicin on the developing chick embryo. In: **Rangsit Graduate Research Conference: RGRC**, v. 13, n. 2561, p. 2981-2987, 2018.
- COBB-VANTRESS. **Guia de manejo de incubação**. Guapiaçu - SP, Brasil. 2008.

- DÍAZ, K. R.; TORRES, E.; MARÍN, L.; GAYOZO, E. Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. **Steviana**, v. 12, n. 1, p. 29-39, 2020.
- DRAGA, M.; HEIM, K.; BATKE, R.; WEGELE, M.; PRÖLS, F.; SCAAL, M. Somite development in the avian tail. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 4, p. 716-724, 2019.
- DUESS, J. W.; GOSEMANN, J. H.; PURI, P.; THOMPSON, J. Teratogenesis in the chick embryo following post-gastrulation exposure to Y-27632-effect of Y-27632 on embryonic development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 409, p. 115277, 2020.
- EMON, S. T.; ORAKDOGEN, M.; USLU, S.; SOMAY, H. Effects of the popular food additive sodium benzoate on neural tube development in the chicken embryo. **Turkish Neurosurgery**, v. 25, n. 2, p. 294-297, 2015.
- GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.
- HARRIS, S. R. Measuring head circumference: update on infant microcephaly. **Canadian Family Physician**, v. 61, n. 8, p. 680-684, 2015.
- HOSSEINI, H. S.; TABER, L. A. How mechanical forces shape the developing eye. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 137, p. 25-36, 2018.
- AFFREDO, T.; LEMPEREUR, A.; RICHARD, C.; BOLLEROT, K.; GAUTIER, R.; CANTO, P. Y.; DREVON, C.; SOUYRI, M.; DURAND, C. Dorso-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 51, n. 4, p. 232-238, 2013.
- KING'ORI, A. M. Review of the factors that influence egg fertility and hatchability in poultry. **International Journal of poultry science**, v. 10, n. 6, p. 483-492, 2011.
- KMECICK, M.; COSTA, M. C. V.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.

- KUSUMANINGRUM, E.; RAHAYU, I. D.; PURYATNI, A. Efek supresi curcumin pada organogenesis dan morfogenesis embrio ayam umur 48 jam. **Majalah Kesehatan FKUB**, v. 2, n. 4, p. 186-195, 2015.
- LEE, S.; GLEESON, J. G. Closing in on Mechanisms of Open Neural Tube Defects. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 7, p. 519-532, 2020.
- LEMAÎTRE, J. F.; GAILLARD, J. M. Reproductive senescence: new perspectives in the wild. **Biological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 2182-2199, 2017.
- LI, S.; BAI, S.; QIN, X.; ZHANG, J.; IRWIN, D. M.; ZHANG, S.; WANG, Z. Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry science**, v. 98, n. 8, p. 3278-3291, 2019.
- LIM, S. W.; YI, M. Illness Experiences of Adults with Spina Bifida: Protecting the Whole Self. **Asian Nursing Research**, v. 15, n. 1, p. 67-75, 2021.
- LIMA, L. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, R. M. P. L.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C. Riparin III effect on the development of neural tube embryos of *Gallus gallus*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 14, p. 178-185, 2017.
- MARQUES, I. E.; CHACÓN, Z. M. R.; PARRA, W. D. J. G.; ALE, V. M. M. Incubação artificial de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Paraíso Pedrês no município de Tabatinga, Estado do Amazonas. **Revista Científica de Avicultura e Suinocultura**, v. 3, n. 1, 2017.
- NAKAMURA, M.; MORIYA, K.; HONDA, S.; ARA, M.; NISHIMURA, Y.; KON, M.; CHIBA, H.; KITTA, T.; SHINOHARA, N. Congenital urogenital sinus anomaly in a patient with sacrococcygeal teratoma. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 61, p. 101587, 2020.
- NASCIMENTO, A. L., GUEDES, J. B., COSTA, W. K., DE VERAS, B. O., DE AGUIAR, J. C. R. D. O. F., NAVARRO, D. M. D. A. F., ... & DA SILVA, M. V. (2022). Essential oil from the leaves of *Eugenia pohliana* DC. (Myrtaceae) alleviate nociception and acute inflammation in mice. *Inflammopharmacology*, 30(6), 2273-2284.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O.; VELLEMAN, S. G.; WINELAND, M. J. The role of incubation conditions in the onset of avian myopathies. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 545045, 2020.

- POKHREL, N.; BEN-TAL COHEN, E.; GENIN, O.; RUZAL, M.; SELA-DONENFELD, D.; CINNAMON, Y. Effects of storage conditions on hatchability, embryonic survival and cytoarchitectural properties in broiler from young and old flocks. **Poultry science**, v. 97, n. 4, p. 1429-1440, 2018.
- ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; PLAKORNKUL, V.; SRIPAORAYA, K.; BOONMARK, W.; ROONGRUANGCHAI, K. The teratogenic effects of monosodium glutamate (MSG) on the development of chick embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 6, p. 514-522, 2018a.
- ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; PLAKORNKUL, V.; SRIPAORAYA, K.; VIJITSOMBAT, N.; ROONGRUANGCHAI, K. The teratogenic effects of glyphosate based herbicide (GBH) on the development of chick Embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 5, p. 419-428, 2018b.
- SANTOS, Regineide Xavier; VOLEJO, Iara Pacheco Gomes. Estudo experimental in vivo e in vitro de plantas medicinais nos processos de embriotoxicidade e teratogenicidade. *Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar*, v. 10, p. 227-240, 2021.
- SCHIMP, J.; DORNIA, C.; FANGHÄNEL, J.; PROFF, P.; BLANCK-LUBARSCH, M.; WEINGÄRTNER, J.; KIRSCHNECK, C. Morphometric characteristics of anencephalic skulls – A comparative study. **Annals of Anatomy- Anatomischer Anzeiger**, v. 233, p. 151607, 2021.
- SEELARAK, K.; PLAKORNKUL, V.; ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; RUNGRUANG, T. The Teratogenic Effects of Tartrazine, Food Dye, on the Development of Chick Embryos. In: **Rangsit Graduate Research Conference: RGRC**, v. 15, n. 2563, p. 2713-2718, 2020.
- SILVA, T. F.; CASTRO, M. I. A. L.; LUCENA, M. G. S.; SILVA, C. V. N. S.; PEIXOTO, L. R.; CARVALHO, E. A. B.; PAZ, S. T.; GUIMARÃES, B. L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C. Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos. **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 3, p. 135-139, 2021.
- SIGMIREAN, V. Retrospective study on anencephaly and its correlation with other neural tube defects. **Acta Medica Transilvanica**, v. 27, n. 1, p. 31-33, 2022.
- SIRIPATTANAPHOL, K.; RUNGRUANG, T.; PLAKORNKUL, V.; VIRAVUD, Y.; ROONGRUANGCHAI, J. Teratogenic Effects of Metformin Hydrochloride on

- Developing Chick Embryo. In: **Rangsit Graduate Research Conference: RGRC**, v. 15, n. 2563, p. 2706-2712, 2020.
- TSUJIMURA, R.; MOMINOKI, K.; KINUTANI, M.; SHIMOKAWA, T.; DOIHARA, T.; NABEKA, H.; WAKISAKA, H.; KOBAYASHI, N.; MATSUDA, S. Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida. **Neuroscience research**, v. 71, n. 1, p. 85-91, 2011.
- VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, 1162-1176, 2007.
- WAGH, P.; SHINDE, H. Teratogenic and biochemical effects of Modafinil on embryogenesis of *Gallus gallus domesticus*. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 7, p. 1184-1193, 2022.
- WARD, L.; PANG, A. S. W.; EVANS, S. E.; STERN, C. D. The role of the notochord in amniote vertebral column segmentation. **Developmental biology**, v. 439, n. 1, p. 3-18, 2018.

5. CONCLUSÕES

As investigações aprofundadas revelaram as notáveis propriedades terapêuticas das espécies *Eugenia pohliana* e *Verbesina macrophylla*, destacando seus usos populares na Caatinga brasileira no tratamento de diversas condições patológicas. A análise do óleo essencial de *E. pohliana* evidenciou expressiva atividade antileishmania, oferecendo uma alternativa promissora no combate a diferentes espécies do parasita. O óleo essencial revelou-se inibitório contra linhagens cancerígenas, apresentando significativa atividade inibitória nas linhagens MCF-7, NCI-H292, K-562 e HL-60. O óleo essencial de *V. Macrophylla* demonstrou impacto significativo na redução da multiplicação de parasitas, sugerindo seu potencial como agente leishmanicida. Além da atividade leishmanicida, o óleo de *V. macrophylla* apresentou potente atividade antioxidante, superando padrões de referência, e revelou citotoxicidade em linhagens tumorais, indicando um potencial terapêutico diversificado. O estudo expandiu-se para a avaliação dos efeitos embriotóxicos, utilizando ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* como modelo experimental. No grupo tratado com *V. macrophylla*, foram observadas variações significativas na largura do tubo neural e impactos na vasculogênese e angiogênese, destacando a

importância de avaliações abrangentes. As descobertas ressaltam a relevância da exploração das propriedades terapêuticas das plantas medicinais para o desenvolvimento de tratamentos eficazes e acessíveis. Além disso, sublinham a indispensabilidade de avaliações toxicológicas abrangentes, especialmente em contextos delicados, como o desenvolvimento embrionário, reforçando a importância da segurança desses compostos no panorama da saúde humana.

6. REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I.; DIAGO, A.; CERRO, P. A.; PALMA-RUIZ, A. M.; GILABERTE, Y. Leishmaniasis cutânea y mucocutânea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v.112, nº 7, p. 601-618, 2021.
- ACHIKA, J.; ARTHUR, D.; GERALD, I.; ADEDAYO, A. A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 7, p. 1–8, 2014.
- ADLER-MOORE, J.; PROFFITT, R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 49, p. 21–30, 2002.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Unimontes Científica**, v. 19, nº 1, p. 191-204, 2017.
- AHMED, M.; RAHMAN, M. T.; ALIMUZZAMAN, M.; & SHILPI, J. A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 72, nº 8, p. 919-921, 2001.
- ALBERGARIA, E. T.; SILVA, M. V.; SILVA, A. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE – Brasil. **Revista Fitos**, v. 13, n. 3, p. 137-154, 2019.
- ALBUQUERQUE, C. A. C.; VEIGA, C. B.; WERNKE, Â. Análise dos efeitos do ácido p-cumárico de *Eugenia catharinensis* em embriões de *G. domesticus* tratados com acetato de chumbo. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 8, p. 11909-11926, 2019.
- ALVES, M. S. et al. Avaliação da atividade antineoplásica e antiviral do monoterpeno Ascaridol presente em plantas da caatinga: estudo in sílico. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal, PB, v. 13, n. 3, p. 23-26, 2019.
- ARASAN, S.; & KAYA, I. Some important plants belonging to lamiaceae family used in folkloric medicine in Savur (Mardin/Turkey) area and their application areas. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, nº 5, p. 337-340, 2016.
- ARAÚJO, A. M.; RODRIGUES, E. M.; MOURA, D. C. Etnobotânica das plantas medicinais no município de Parari, Paraíba, Brasil. **Geosul**, v. 36, n. 78, p. 659-679, 2021.
- ARAÚJO, S. M. S. A região semiárida do Nordeste do Brasil: questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Rios eletrônica, revista científica da FASETE**, ano 5, n. 5, p. 89-98, 2011
- ASKER, M. M. S; MOHAMED, S. F.; MAHMOUD, M. G.; & EL SAYED, O. H. Antioxidant and Antitumor Activity of a New Sesquiterpene Isolated from Endophytic fungus *Aspergillus glaucus*. **International Journal of PharmTech Research**, v. 5, nº 2, p. 391-397, 2013.

- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n° 4, p. 426–436, 2013.
- BALANÍA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; GARCÍA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n° 3, p. 326-337, 2014.
- BAPTISTEL, A. C.; COUTINHO, J. M. C. P.; LINS NETO, E. M. F.; MONTEIRO, J. M. Plantas medicinais utilizadas na comunidade de Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 406-425, 2014.
- BAPTISTEL, A.C.; COUTINHO, J.M.C.P.; LINS NETO, E.M.F.; MONTEIRO, J.M. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico / Medicinal plants used in the Community Santo Antônio, city of Currais, Southern Piauí, Brazil: an ethnobotanical approach. **Rev. bras. plantas med.**, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 406-425, 2014.
- BARBOSA, A. M. R.; SILVA, S. M.; SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, J. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como medicinais por parteiras no município de Serra Talhada – PE. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. 1-9, 2022.
- BARBOSA, D.C.A. Estratégias de germinação e crescimento de espécies lenhosas da caatinga com germinação rápida. pp. 172-174. In: ARAÚJO, E.L; MOURA, A.N; SAMPAIO, E.V.S.B; GESTINARI, L.M.S.; CARNEIRO, J.M.T. (eds.) **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da flora do Brasil**. Recife: Imprensa Universitária, 2003.
- BECERRA-SOLANO, L. E.; MATEOS-SÁNCHEZ, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, E. Microcephaly, an etiopathogenic vision. **Pediatrics & Neonatology**, v. 62, n. 4, p. 354-360, 2021.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; & TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127–152, 2005.
- BERTIN, A.; MOCZ, F.; CALANDREAU, L.; PALME, R.; LUMINEAU, S.; DARMAILLACQ, A. S.; DICKEL, L.; ARNOULD, C.; HOUELIER, C. Human behaviour at the origin of maternal effects on offspring behaviour in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). **Physiology & behavior**, v. 201, p. 175-183, 2019.
- BEZERRA FILHO, C. M.; SILVA, L. C. N.; SILVA, M. V.; LØBNER-OLESEN, A.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Antimicrobial and antivirulence action of *Eugenia brejoensis* essential oil *in vitro* and *in vivo* invertebrate models. **Frontiers in Microbiology**, v. 19, n° 11, p. 424, 2020.

- BOLELI, I. C.; MORITA, V. S.; MATOS-JR, J. B.; THIMOTHEO, M.; ALMEIDA, V. R. Poultry egg incubation: integrating and optimizing production efficiency. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, p. 1-16, 2016.
- BRANUM, S. R.; TAZAWA, H.; BURGGREN, W. W. Phenotypic developmental plasticity induced by preincubation egg storage in chicken embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Physiological reports**, v. 4, n. 4, p. e12712, 2016.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, **editora do Ministério da Saúde**, p. 1-122, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Leishmaniose Visceral**, p. 25, 2019.
- BRITO, P. V. S. et al. Análise comparativa da umidade da vegetação de áreas de caatinga preservada, agricultura irrigada e sequeiro. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, Recife, v. 2 n. 3, p. 493-498, 2017.
- BURZA, S. Leishmaniasis. **Lancet**. [s.l.], v. 392, nº 1, p. 951-970, 2018.
- CARDOSO D, MOONLIGHT PW, RAMOS G, OATLEY G, DUDLEY C. Defining Biologically Meaningful Biomes Through Floristic, Functional, and Phylogenetic Data. **Front. Ecol. Evol.** 9:723558, 2021.
- CARVALHO, K.S.; CRUZ, RÔMULO C. D.; GOMES, I. A. S. Plant species from Brazilian Caatinga: a control alternative for *Aedes aegypti*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 26, n. 2, p. 102051, 2023.
- CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, nº 8, p. 2442-2451, 2011.
- CHAISRIRAM, N.; PLAKORNKUL, V.; ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; SRIPAORAYA, K.. The teratogenic effect of rifampicin on the developing chick embryo. In: **Rangsit Graduate Research Conference: RGRC**, v. 13, n. 2561, p. 2981-2987, 2018.
- CHAISRIRAM, N.; PLAKORNKUL, V.; ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; SRIPAORAYA, K.. The teratogenic effect of rifampicin on the developing chick embryo. In: **Rangsit Graduate Research Conference: RGRC**, v. 13, n. 2561, p. 2981-2987, 2018.
- CINELLI, D. P.; STOICA, I.; ATWAN, F. PARAN, S. A rare presentation of Sacrococcygeal Teratoma as recurrent natal cleft abscess in childhood. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 64, p. 101727, 2021.

- COBB-VANTRESS. Guia de manejo de incubação. **Guapiaçu** - SP, Brasil. 2008.
- CORTAZZO, L.; AOKI, J. I.; FLOETER-WINTER, L. M. Finding correlations between mRNA and protein levels in leishmania development: is there a discrepancy?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 852902, 2022.
- COSTA, W. K., DE OLIVEIRA, A. M., DA SILVA SANTOS, I. B., SILVA, V. B. G., DE AGUIAR, J. C. R. D. O. F., NAVARRO, D. M. D. A. F., ... & DA SILVA, M. V. (2022). Influence of seasonal variation on the chemical composition and biological activities of essential oil from *Eugenia pohliana* DC leaves. **Chemistry & Biodiversity**, 19(9), e202200034.
- COSTA, W. K.; DE OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, I. B. D. S.; SILVA, V. B. G.; DA SILVA, E. K. C.; ALVES, J. V. D. O.; DA SILVA, A. P. S.; LIMA, V. L. D. M.; CORREIA, M. T. D. S.; DA SILVA, M. V. Antibacterial mechanism of *Eugenia stipitata* McVaugh essential oil and synergistic effect against *Staphylococcus aureus*. **South African Journal of Botany**, v. 147, p 724–730, 2022.
- COSTA, W. K.; OLIVEIRA, J. R. S. D.; OLIVEIRA, A. M. D.; SANTOS, I. B. D. S.; CUNHA, R. X. D.; FREITAS, A. F. S. D.; SILVA, J. W. L. M. D.; SILVA, V. B. G.; AGUIAR, J. C. R. D. O. F. D.; SILVA, A. G. D. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**. v. 144, p. 112059, 2020.
- CRUZ, C. S. S.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, V. C.; CARDOSO, D. T.; GUIMARÃES, N. S.; CARNEIRO, M. Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: a systematic review. **Parasitology**, v. 148, nº 6, p. 639-647, 2021.
- CRUZ, R. C. D.; SILVA, S. L. C. E.; SOUZA, I. A.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; SANTOS, F. R.; CARVALHO, M. G. Toxicological Evaluation of Essential Oil From the Leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 985–993, jul. 2017.
- SILVA, M. L.; STEHMANN, J. R.; SERAFIM, M. S. M.; VALE, V. V.; GONTIJO, D. C.; BRANDÃO, G. C.; & DE OLIVEIRA, A. B. Himatanthus bracteatus stem extracts present anti-flavivirus activity while an isolated sesquiterpene glucoside present only anti-Zika virus activity in vitro. **Natural product research**, v. 35, nº 18, p. 3161-3165, 2021.
- DE ANDRADE, EM, AQUINO, D., CHAVES, LCG, LOPES, FB. A Água como Capital e Seus Usos na Caatinga. In: Silva, JMC, Leal, IR, Tabarelli, M. (eds.) Caatinga. **Springer**, Cham. 2017.
- VERAS, B. O.; DE OLIVEIRA, J. R. S.; DE MENEZES LIMA, V. L.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; DE OLIVEIRA FARIAS, J. C. R.; DE MEDEIROS MOURA, G. M.; & DE SOUZA LOPES, A. C. The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities

and is toxicologically safe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113248, 2021.

- DIAS, E. C. M. Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas: reflexões para prática segura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 41, nº 2, p. 2306, 2018.
- DÍAZ, K. R.; TORRES, E.; MARÍN, L.; GAYOZO, E. Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. **Steviana**, v. 12, n. 1, p. 29-39, 2020.
- MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, nº 5, p. e1167, 2011.
- DOS REIS, H. S.; DA PAZ, C. D.; COCOZZA, F. D. M.; DE OLIVEIRA, J. G. A.; SILVA, M. A. V. PLANTAS MEDICINAIS DA CAATINGA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DOS SABERES ETNOBOTÂNICOS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 874–900, 2023.
- DRAGA, M.; HEIM, K.; BATKE, R.; WEGELE, M.; PRÖLS, F.; SCAAL, M. Somite development in the avian tail. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 4, p. 716-724, 2019.
- DUESS, J. W.; GOSEMANN, J. H.; PURI, P.; THOMPSON, J. Teratogenesis in the chick embryo following post-gastrulation exposure to Y-27632-effect of Y-27632 on embryonic development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 409, p. 115277, 2020.
- DUESS, J. W.; GOSEMANN, J. H.; PURI, P.; THOMPSON, J. Teratogenesis in the chick embryo following post-gastrulation exposure to Y-27632-effect of Y-27632 on embryonic development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 409, p. 115277, 2020.
- EMON, S. T.; ORAKDOGEN, M.; USLU, S.; SOMAY, H. Effects of the popular food additive sodium benzoate on neural tube development in the chicken embryo. **Turkish Neurosurgery**, v. 25, n. 2, p. 294-297, 2015.
- ESPINOZA-MORALES, D.; RODRÍGUEZ, A. L.; SILVA-CASO, W.; SUAREZ-OGNIO, L.; PONS, M. J.; MENDOZA, J. V. An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania peruviana* in the valleys of Ancash-Peru. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1101-1103, 2017.
- FERNANDES, A. W. C., AQUINO, S., GOUVEIA, G. V., ALMEIDA, J. R. G. S., & COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17(4), 1097-1102, 2015.
- FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. DE. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 05 Dez 2022.

FORREST, D. M.; BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; TEMPONE, A. J.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. Proteomic analysis of exosomes derived from procyclic and metacyclic-like cultured *Leishmania infantum* chagasi. **Journal of proteomics**, v. 227, p. 103902, 2020.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.

GARZON, L. R.; FRACASSO, M.; VIANA, A. R.; GIACOMETI, M.; SAMOEL, G. V. A.; SOUZA, L.; BALDISSERA, M. D.; PETRY, L. S.; KRAUSI, L. M. F.; MONTEIRO, S. G. In vitro activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, nº 8, p. 82837- 82855, 2021.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Scienc**, v. 26, nº 22, p. 12827, 2021.

GIRARDI, C.; FABRE, N.; PALOQUE, L.; RAMADANI, A. P.; BENOIT-VICAL, F.; GONZÁLEZ-ASPAJO, G.; HADDAD, M.; RENGIFO, E.; & JULLIAN, V. Evaluation of antiplasmodial and antileishmanial activities of herbal medicine *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist and isolated hirsutinolide-type sesquiterpenoids. **Journal of ethnopharmacology**, v. 170, p. 167-174, 2015.

GRAFAKOU, M. E.; BARDA, C.; KARIKAS, G. A.; HEILMANN, J.; & SKAL TSA, H. Cajamolides AN: cytotoxic and anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. **Bioorganic Chemistry**, v. 116, p. 105351, 2021.

GUERRA, A. M. N. M.; PESSOA, M. de F.; SOUZA, C. S. M.; MARACAJÁ, P. B. Utilização de plantas medicinais utilizadas na comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 442–450, 2010.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.

HARRIS, S. R. Measuring head circumference: update on infant microcephaly. **Canadian Family Physician**, v. 61, n. 8, p. 680-684, 2015.

Heitor S.N. Liporacci, Natalia Hanazaki and Mara Rejane Ritter et al. Where are the Brazilian ethnobotanical studies in the Atlantic Forest and Caatinga?. **Rodriguésia**. 2017. Vol. 68(4):1225-1240.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; & MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitology Research**, v. 118, nº 10, p. 2743-2752, 2019.

- HOSSEINI, H. S.; TABER, L. A. How mechanical forces shape the developing eye. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 137, p. 25-36, 2018.
- HOTT, G. O. Leishmaniose Tegumentar. **Parasitologia 2: Protozoários de Interesse Médico**, 2021.
- HUANG, W.; ITAYAMA, M.; ARAI, F.; FURUKAWA, K.S.; USHIDA, T.; KAWAHARA, T. An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175595, 2017.
- JAFARINIA, M.; & JAFARINIA, M. A review of medicinal properties of some Asteraceae family plants on immune system. **Report of Health Care**, v. 5, nº 2, p. 1-7, 2019.
- JIMENEZ-MARCO, T.; FISA, R.; GIRONA-LLOBERA, E.; CANCINO-FAURE, B.; TOMÁS-PÉREZ, M.; BERENQUER, D.; GUILLEN, C.; PUJOL, A.; INIESTA, L.; SERRA, T.; MASCARO, M.; GASCO, J; RIERA, C. Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. **Transfusion**, v. 56, S45-S51, 2016.
- JUGREET BS, SUROOWAN S, RENGASAMY RRK, MAHOMOODALLY MF. Química, bioatividades, modo de ação e aplicações industriais de óleos essenciais. **Tendências Food Sci Technol** 101:89–105, 2020.
- JÚNIOR, J. E. Q. F. Revisão taxonômica e filogenia de Eugenia Sect. Pilotheicum(Kiaersk)D. legrand (Myrtaceae). [s.l.] **Universidade de Brasília**, 2014.
- KAYE, P. M.; CRUZ, I.; PICADO, A.; VAN BOCXLAER, K.; CROFT, S. L. Leishmaniasis immunopathology-impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, nº 3, p. 247-264, 2020.
- KING'ORI, A. M. Review of the factors that influence egg fertility and hatchability in poultry. **International Journal of poultry science**, v. 10, n. 6, p. 483-492, 2011.
- KMECICK, M.; COSTA, M. C. V.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.
- KUSUMANINGRUM, E.; RAHAYU, I. D.; PURYATNI, A. Efek supresi curcumin pada organogenesis dan morfogenesis embrio ayam umur 48 jam. **Majalah Kesehatan FKUB**, v. 2, n. 4, p. 186-195, 2015.
- Laborda-Illanes, A.; Lidia Sánchez-Alcoholado, Daniel Castellano-Castillo, Soukaina Boutriq, Isaac Plaza-Andrades, Lucía Aranega-Martín, Jesús Peralta-Linero, Emilio Alba, Alicia González-González, María Isabel Queipo-Ortuño, Development of in vitro and in vivo tools to evaluate the antiangiogenic potential of melatonin to neutralize the angiogenic effects of VEGF and breast cancer cells: CAM assay and 3D endothelial cell spheroids, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Volume 157, 2023.

- LEE, S.; GLEESON, J. G. Closing in on Mechanisms of Open Neural Tube Defects. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 7, p. 519-532, 2020.
- LEMAÎTRE, J. F.; GAILLARD, J. M. Reproductive senescence: new perspectives in the wild. **Biological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 2182-2199, 2017.
- LI, S.; BAI, S.; QIN, X.; ZHANG, J.; IRWIN, D. M.; ZHANG, S.; WANG, Z. Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry science**, v. 98, n. 8, p. 3278-3291, 2019.
- LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical Reports**, v. 3, nº 5, p. 617-620, 2015.
- Li, M., Pathak, R. R., Lopez-Rivera, E., Friedman, S. L., Aguirre-Ghiso, J. A., Sikora, A. G. The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. **J. Vis. Exp.** (104), e52411, doi:10.3791/52411 (2015).
- LIM, S. W.; YI, M. Illness Experiences of Adults with Spina Bifida: Protecting the Whole Self. **Asian Nursing Research**, v. 15, n. 1, p. 67-75, 2021.
- LIMA, L. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, R. M. P. L.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C. Riparin III effect on the development of neural tube embryos of *Gallus gallus*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 14, p. 178-185, 2017.
- LIMA, R. F.; LIMA, R. A. Levantamento bibliográfico do gênero Piper (piperaceae) para uso medicinal. **Revista EDUCAmazônia**, v. 8, nº 2, p. 155-170, 2021.
- LISBOA, A. R. Leishmaniose visceral: Uma revisão literária. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 6, nº 2, p. 35-43, 2016.
- LISBOA, A. R.; LEITE, F. C.; DANTAS, A. E. F.; OLIVEIRA, I. B.; EVANGELISTA, T. R.; SOUSA, J. B. G. Análise epidemiológica de leishmaniose visceral em Municípios do Sertão Paraibano. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v.6, n.3, p.5-12, 2016.
- LOZANO, Y. Y., GIRALDO, S. G., ZAPATA, A. C., ESCOBAR, J.E., SÁNCHEZ, R. M. Medicinal plants with antileishmanial activity on parasites responsible for new-world cutaneous leishmaniasis. A systematic review 2018-2022. **Journal of Pharmacy Pharmacognosy Research**, v. 11, nº 6, p. 975–1001, 2023.
- MAGALHÃES, K. do N.; BANDEIRA, M. A.; MONTEIRO, M. P. Plantas medicinais da caatinga do Nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do professor Francisco José de Abreu Matos. E-book. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, 2020.
- MAGALHÃES, W. L. E; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, Pr: **Embrapa**, 2018.

- MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, nº 6, p. 563–581, 2014.
- MAPBIOMAS. **Relatório Anual de Desmatamento no Brasil (RAD)** de 2022. Disponível em: https://storage.googleapis.com/alerta-public/dashboard/rad/2022/RAD_2022.pdf Publicado em: junho de 2023. Acessado em julho de 2023.
- MARQUES, I. E.; CHACÓN, Z. M. R.; PARRA, W. D. J. G.; ALE, V. M. M. Incubação artificial de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Paraíso Pedrês no município de Tabatinga, Estado do Amazonas. **Revista Científica de Avicultura e Suinocultura**, v. 3, n. 1, 2017.
- MELBY, P. C.; TRAVI, B. L.; YANETH OSORIO, E. Leishmania. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 769–779, 1 jan. 2019.
- MILUTINOVIĆ, V. M.; MATIĆ, I. Z.; STANOJKOVIĆ, T. P.; SOKOVIĆ, M. D.; ĆIRIĆ, A. D.; UŠJAK, L. J.; NIKETIĆ, M. S.; & PETROVIĆ, S. D. Antimicrobial and cytotoxic activities of selected Hieracium L. s. str. (Asteraceae) extracts and isolated sesquiterpene lactones. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, nº 7, p. e202200326, 2022.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Doenças Tropicais Negligenciadas**. 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância de Controle da Leishmaniose Visceral. Brasil: **Ministério da Saúde**. 2014. [Acesso em: 05 nov. 2023]. Disponível em: l1nq.com/Doy8o.
- MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, nº 10, p. 1153–1169, 2007.
- MORAIS, S. M.; COSOLOSSO, D. S.; SILVA, A. A. S.; DE MORAES FILHO, M. O.; TEIXEIRA, M. J.; CAMPELLO, C. C.; BONILLA, O. H.; DE PAULA, V. F.; VILANOVA, N. S. Essential Oils from Croton Species: Chemical Composition, in Vitro and in Silico Antileishmanial Evaluation, Antioxidant and Cytotoxicity Activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, p. 2404–2412, 2019.
- MORO, M. F.; NIC-LUGHADHA, E.; FILER, D. L.; DE ARAÚJO, F. S.; MARTINS, F. R. “A catalogue of the vascular plants of the Caatinga Phytogeographical domain: a synthesis of floristic and phytosociological surveys”. **Phytotaxa**, v. 160, 2014, p.1-118, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NAKAMURA, M.; MORIYA, K.; HONDA, S.; ARA, M.; NISHIMURA, Y.; KON, M.; CHIBA, H.; KITTA, T.; SHINOHARA, N. Congenital urogenital sinus anomaly in

- a patient with sacrococcygeal teratoma. **Journal of Pediatric Surgery Case Reports**, v. 61, p. 101587, 2020.
- NASCIMENTO, A. L. Avaliação das atividades antinoceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Eugenia pohliana* DC. (Dissertação de mestrado – UFPE), f. 68, 2021.
- NASCIMENTO, K. F.; MOREIRA, F. M. F.; SANTOS, J. A.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J. H. R.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and *spathulenol*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2017.
- NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropical**, v. 155, p. 113-123, 2016.
- NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 21, p. 425-532, 2018.
- NUNES, T. A. L.; SANTOS, M. M.; DE OLIVEIRA, M. S. et al. Atividade antileishmania do curzereno: Efeitos sobre *Leishmania amazonensis* e possíveis mecanismos de ação. **International Immunopharmacology**, v. 100, 2021.
- OLIVEIRA, A.C.; COSTA-LIMA, T.C.; SOUZA, A.V.V.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R.D.C.R. Essential oils activity from plants of the Brazilian Caatinga on the vegetable leafminer. **Pesqui. Agropecu. Trop.** 50, 1–8, 2020.
- OLIVEIRA-MACÊDO, L. A. R., PACHECO, A. G. M., LIMA-SARAIVA, S. R. G., SILVA, J. C., OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G., SOUZA, G. R., & ALMEIDA, J. R. G. S. Fractions of *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae) attenuate the nociceptive response in mice. **Brazilian Journal of Biology**, 80(1), 57-65, 2020.
- OPAS. Organização Pan- Americana de Saúde: Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. **Epidemiological Report of the Americas**, nº 11, Dez., 2022. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832/OPASCDEVT220021_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- OVIEDO-RONDÓN, E. O.; VELLEMAN, S. G.; WINELAND, M. J. The role of incubation conditions in the onset of avian myopathies. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 545045, 2020.
- PEDROSO, R. do S.; ANDRADE, J.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis*: **Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, nº 2, p. e310218, 2021.
- PEREIRA, M. L.; SANTOS, D. C. P.; SOARES JÚNIOR, C. A. M.; BAZAN, T. A. X. N.; BEZERRA FILHO, C. M.; SILVA, M. V. D.; CORREIA M. T. S.; CARDENAS, A. F. M.; SIQUEIRA, F. S. F.; FRONZA B. M.; SILVA L. C. N.; & GALVÃO, L. C. D. C. Development and Physicochemical Characterization of *Eugenia brejoensis* Essential Oil-Doped Dental Adhesives with Antimicrobial Action towards

Streptococcus mutans. **Journal of Functional Biomaterials**, v.13, nº3, p. 149, 2022.

POKHREL, N.; BEN-TAL COHEN, E.; GENIN, O.; RUZAL, M.; SELA-DONENFELD, D.; CINNAMON, Y. Effects of storage conditions on hatchability, embryonic survival and cytoarchitectural properties in broiler from young and old flocks. **Poultry science**, v. 97, n. 4, p. 1429-1440, 2018.

QUEIROZ, L. P. et al. Diversity and evolution of flowering plants of the Caatinga Domain. In: *Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America*, [s.l: s.n.] 2018.

QUEIROZ, L.P. The Brazilian Caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae. In: R.T. PENNINGTON, G.P. LEWIS & J.A. RATTER (eds.). **Neotropical savannas and dry forests: diversity, biogeography and conservation**. Boca Raton: CRC Press, pp. 121-157, 2006.

RODRIGUES, E. S.; BRITO, N. M.; OLIVEIRA, V. J. S. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas por alguns moradores de três comunidades rurais do município de Cabaceiras do Paraguaçu/Bahia. **Biodiversidade Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2021.

ROLNIK, A.; & OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International journal of molecular sciences**, v. 22, nº 6, p. 3009, 2021.

ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; PLAKORNKUL, V.; SRIPAORAYA, K.; BOONMARK, W.; ROONGRUANGCHAI, K. The teratogenic effects of monosodium glutamate (MSG) on the development of chick embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 6, p. 514-522, 2018a.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SÁ- FILHO, G. F. de; SILVA, A. I. B.; COSTA, E. M.; NUNES, L. E.; RIBEIRO, L. H. de F.; CAVALCANTI, J. R. L. P.; GUZEN, F. P.; OLIVEIRA, L. C.; CAVALCANTE, J. S. Medicinal plants used in the Brazilian caatinga and the therapeutic potential of secondary metabolites: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e140101321096, 2021.

SÁEZ, A.; MIRANDA, M. D.; SILVA, F. O.; ZIELONKA, N. B.; CROWTHER, L. P.; SILVA-FERREIRA, V.; OLIVEIRA-REBOUCAS, P. Restoration and Conservation of Priority Areas of Caatinga's Semi-Arid Forest Remnants Can Support Connectivity within an Agricultural Landscape. **Land**. v.10, n. 6:550, 2021.

SANTANA, E. R. B. D. Composição química, atividade antimicrobiana, potencial antioxidante e avaliação da citotoxicidade de compostos de *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae). Tese (Ciencias biológicas – UFPE), f. 102, 2020.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma

revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, nº 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, C. R. B.; SAMPAIO, M. G. V.; VANDESMET, L. C. S.; DOS SANTOS, B. S.; DE MENEZES, S. A.; PORTELA, B. Y. M.; GOMES, D. W. R.; CORREIA, M. T. S.; GOMEZ, M. C. V.; DE ALENCAR MENEZES, I. R.; & DA SILVA, M. V. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves. **Natural Product Research**, v. 37, nº 22, p. 3844-3850, 2023.

Santos, M.O.; Ribeiro, D.A.; de Macêdo, D.G.; Macêdo, M.J.F.; Macedo, J.G.F.; de Lacerda, M.N.S.; Macêdo, M.S.; Souza, M.M.A. Medicinal Plants: Versatility and Concordance of Use in the Caatinga Area, Northeastern Brazil. **Acad. Bras Cienc**, 90,2767–2779, 2018.

SANTOS, R. F. et al. Propriedades antimicrobianas de extratos da casca de jurema-preta (*mimosa tenuiflora* (wild.) poir.). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 16915-16930, 2022.

SASIDHARAN, S.; & SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Reseash**, v. 120, p. 1541–1554, 2021.

SCHIMP, J.; DORNIA, C.; FANGHÄNEL, J.; PROFF, P.; BLANCK-LUBARSCH, M.; WEINGÄRTNER, J.; KIRSCHNECK, C. Morphometric characteristics of anencephalic skulls – A comparative study. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 233, p. 151607, 2021.

SCHIMP, J.; DORNIA, C.; FANGHÄNEL, J.; PROFF, P.; BLANCK-LUBARSCH, M.; WEINGÄRTNER, J.; KIRSCHNECK, C. Morphometric characteristics of anencephalic skulls – A comparative study. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 233, p. 151607, 2021.

SCHMIDT, T. J. KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V.G.; LAGO, J. H.G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. DE N.C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 2128–2175, 2012.

SCHRAGE, Arnhild et al. Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 38, n. 1, p. 39-52, 2010.

SEELARAK, K.; PLAKORNKUL, V.; ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; RUNGRUANG, T. The Teratogenic Effects of Tartrazine, Food Dye, on the Development of Chick Embryos. In: Rangsit Graduate Research Conference: **RGRC**, v. 15, n. 2563, p. 2713-2718, 2020.

- SGANZERLA, C. M. et al. Revisão integrativa aplicada a levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais no Brasil. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2022.
- SHAMS, A.; AHMED, A.; KHAN, A.; KHAWAJA, S.; REHMAN, N. U.; QAZI, A. S.; KHAN, A.; BAWAZEER, S.; ALI, S. A.; & AL-HARRASI, A. Naturally Isolated Sesquiterpene Lactone and Hydroxyanthraquinone Induce Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line. **Cancers**, v.15, nº 2, p. 557, 2023.
- SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Protozoan Diseases: Leishmaniasis. **International Encyclopedia of Public Health**, v 4, p. 367–371, 2017.
- SIGMIREAN, V. Retrospective study on anencephaly and its correlation with other neural tube defects. **Acta Medica Transilvanica**, v. 27, n. 1, p. 31-33, 2022.
- SILVA, A. G.; ALVES, R. C. C.; BEZERRA FILHO, C. M.; BEZERRA-SILVA, P. C.; SANTOS, L. M. M.; FOGLIO, M. A.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, p. 1141- 1147, 2015.
- SILVA, B. R. B.; ALMEIDA, C. F. C. B. R. Estudo etnobotânico de plantas medicinais da mata ciliar do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 1, p. 011-026, 2020
- SILVA, C. S.; DE OLIVEIRA, A. P. R.; BARBOSA, G. K. F.; OLIVEIRA, R. O.; FRIAS, D. F. R. Boletim Epidemiológico Leishmania visceral humana 2022. Ministério da Saúde, **vigilância em saúde- SES, MS, 2023**. Disponível em: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_leish_visceral_023-Final.pdf
- SILVA, I. D. L., OLIVEIRA, F. S. M., ANDRADE, M. F., BRITO, A. M. S. S., & HALLASS, F. Avaliação das potencialidades dos extratos vegetais de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) para uso em embalagens ativas antimicrobianas e antioxidantes. **Matéria** (Rio de Janeiro), 26(1), 1-17, 2021.
- SILVA, T. F.; CASTRO, M. I. A. L.; LUCENA, M. G. S.; SILVA, C. V. N. S.; PEIXOTO, L. R.; CARVALHO, E. A. B.; PAZ, S. T.; GUIMARÃES, B. L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C. Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos. **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 3, p. 135-139, 2021.
- SILVA, T. F.; CASTRO, M. I. A. L.; LUCENA, M. G. S.; SILVA, C. V. N. S.; PEIXOTO, L. R.; CARVALHO, E. A. B.; PAZ, S. T.; GUIMARÃES, B. L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C. Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos. **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 3, p. 135-139, 2021.
- SILVA, T. G.; CANTO, V. B.; FERREIRA, A. G.; BARBOSA, L. M. S.; SILVA, M. G. M. S.; MAIA, C. S. Medicamentos fitoterápicos: uma nova alternativa no tratamento

das doenças negligenciadas. **Open Journal of Aging Research**, v. 1, n. 5, p. 1, 2018.

SILVA, T., LIMA, R., SOUZA, R., MOONLIGHT, P., CARDOSO, D., SANTOS, H., OLIVEIRA, C., VEENENDAAL, E., QUEIROZ, L., RODRIGUES, P., SANTOS, R., SARKINEN, T., PAULA, A., BARRETO-GARCIA, P., PENNINGTON, T., & PHILLIPS, O. Mapping wood volume in seasonally dry vegetation of Caatinga in Bahia State, Brazil. **Scientia Agricola**, 80, 2022 0161. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2022-0161>

SIRIPATTANAPHOL, K.; RUNGRUANG, T.; PLAKORNKUL, V.; VIRAVUD, Y.; ROONGRUANGCHAI, J. Teratogenic Effects of Metformin Hydrochloride on Developing Chick Embryo. In: Rangsit Graduate Research Conference: **RGRC**, v. 15, n. 2563, p. 2706-2712, 2020.

SOUZA, L. I. O.; BEZERRA-SILVA, P. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, A. G.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bull World Health Organ**, v. 83, n° 5, p. 394-395, 2005.

TEIXEIRA M.G, Venticinque EM, Lion MB, Pinto MP. The Brazilian Caatinga protected areas: an extremely unbalanced conservation system. **Environ Conserv** 48: 287–294, 2021.

TIRONI, F. C.; MACHADO, G. U.; ARRUDA, S. M.; MACHADO, P. R. L. Úlcera plantar como manifestação atípica de leishmaniose cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n° 3, p. 352-354, 2021.

TSUJIMURA, R.; MOMINOKI, K.; KINUTANI, M.; SHIMOKAWA, T.; DOIHARA, T.; NABEKA, H.; WAKISAKA, H.; KOBAYASHI, N.; MATSUDA, S. Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida. **Neuroscience research**, v. 71, n. 1, p. 85-91, 2011.

Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**. 2007 Sep 30;59(11):1162-76. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.019.

VERAS, B. O.; OLIVEIRA, M. B. M.; OLIVEIRA, F. G. S.; SANTOS, Y. Q.; OLIVEIRA, J. R. S.; LIMA, V. L. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; AGUIAR, J. C. R. O. F.; AGUIAR, J. S.; GORLACH-LIRA, K.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, M. V.; LOPES, A. C. S. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, p. 112265, 2019.

VILA-NOVA, N.; MORAIS, S.; FALCÃO, M.; BEVILAQUA, C.; RONDON, F.; WILSON, M.; VIEIRA, Í.; ANDRADE, H. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting

activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 1164-1168, nov. 2012.

WADHONE, P.; MAITI, M.; AGARWAL, R.; KAMAT, V.; MARTIN, S.; SAHA, B. Miltefosine promotes IFN- γ -dominated anti-leishmanial immune response. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 7146–7154, 2009.

WAGH, P.; SHINDE, H. Teratogenic and biochemical effects of Modafinil on embryogenesis of *Gallus gallus domesticus*. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 7, p. 1184-1193, 2022.

WARD, L.; PANG, A. S. W.; EVANS, S. E.; STERN, C. D. The role of the notochord in amniote vertebral column segmentation. **Developmental biology**, v. 439, n. 1, p. 3-18, 2018.

WEGENER, T. Patterns and Trends in the Use of Herbal Products, Herbal Medicine and Herbal Medicinal Products. **International Journal of Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, nº 6, p. 00317, 2017.

WHO. Leishmaniasis: the disease and its epidemiology. **Leishmaniasis Home**, 2022.

7. APÊNDICE

SÚMULA CURRICULAR

Artigos completos publicados em periódicos

SILVA, THIAGO FELIX DA ; ASSIS LIMA CASTRO, MARIA ISABEL DE ; SOARES DE LUCENA, MARTA GERUSA ; SOARES SILVA, CAMILLA VILA NOVA ; PEIXOTO, LAISLA RANGEL ; BANDEIRA DE CARVALHO, ELIANE ALVES ; PAZ, SILVANIA TAVARES ; ALMEIDA GUIMARAES, BEATHRYZ LETHYCYA ; BARBOSA FILHO, JOSE MARIA ; SILVA, ELIETE CAVALCANTI DA . Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos. **PHARMACOGNOSY RESEARCH** , v. 13, p. 135-139, 2021.

Capítulos de livros publicados

SA, J. G. A.; BRANDAO, W. F. M; SANTANA, M. A. N.; SILVA, L. A.; SANTANA, E. S.; SILVA, E. C.; CARVALHO, E. A. B.; VIEIRA, J. R. C. Avaliação da citotoxicidade e caracterização do perfil fitoquímico de *Rhizophora mangle* L. Do mangue brasileiro. *Ciências da Saúde e suas Descobertas Científicas*. 1ed. Paraná: Seven, 2023, v. 1, p. 528-539.

Resumos publicados em anais de congressos

CARVALHO, E. A. B. ; SILVA, T. F. ; CASTRO, M. I. A. L. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; OLIVEIRA, E. F. ; SILVA, M. G. S. ; SILVA, M. V. . ATIVIDADE ANTILEISHMANIA IN VITRO DA CUMARINA GREVILLONE FRENTE À *Leishmania amazonenses* E *Leishmania infantum*. In: 17° Simpósio de Controle Biológico (Siconbiol) e 2° Simpósio Latino-Americano de Controle Biológico (Slacb), 2023, Juazeiro (BA). **Anais do 17° Simpósio de Controle Biológico (Siconbiol) e 2° Simpósio Latino-Americano de Controle Biológico (Slacb)**, 2023. p. 571.

CASTRO, M. I. A. L. ; VERAS, B. O. ; CARVALHO, E. A. B. ; SILVA, T. F. ; SILVA, M. G. S. ; CORREIA, M. T. S. . AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA IN VITRO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS DE *Hymeneae* rinoflora E *Hymeneae* cangaceira (FABACEAE). In: 17° Simpósio de Controle Biológico (Siconbiol) e 2° Simpósio Latino-Americano de Controle Biológico (Slacb), 2023, Juazeiro (BA). **Anais do 17° Simpósio de Controle Biológico (Siconbiol) e 2° Simpósio Latino-Americano de Controle Biológico (Slacb)**, 2023. p. 591.

CORIOLANO, D. L. ; BUENO, E. V. ; SILVA, T. F. ; BEZERRA, I. C. ; SOUZA, J. B. ; CARVALHO, E. A. B. . ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE LECTINAS. In: I Colóquio Regional em Morfotecnologia - UFPE, 2019, Recife (PE). **Anais do I Colóquio Regional em Morfotecnologia - UFPE**, 2019. p. 142-143.