

Compostos Organossulfurados: Atividade Leishmanicida e Nematicida do Óleo Essencial das folhas de *Mansoa alliacea* em *Leishmania amazonensis* e *Caenorhabditis elegans*

Organosulfur Compounds: Leishmanicidal and Nematicidal Activities of Mansoa alliacea Leaf Essential Oil on Leishmania amazonensis and Caenorhabditis elegans

Jonkácio Almeida de Melo,^{a,*} Luciana Poty Manso dos Santos,^{a, ID} Raquel Martins de Almeida,^b Ricardo Toshio Fujiwara,^b Sebastião Rodrigo Ferreira,^c Leandro da Silva Nascimento,^{d,e} Francisco das Chagas do Nascimento^a

^aUniversidade Federal de Roraima, Laboratório de Produtos Naturais, Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Campus Paricarana, 69312-000, Boa Vista, Roraima, Brasil.

^bUniversidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas ICB, CEP 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brasil.

^cUniversidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Ciências da Saúde., Praça Joana Angélica 250 São José, CEP 459888-058, Teixeira de Freitas-BA, Brasil.

^dInstituto Militar de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Química, Praça General Tibúrcio, Praia Vermelha, CEP 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^eColégio de Aplicação da Universidade Federal de Roraima, Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Campus Paricarana, 69312-000, Boa Vista, Roraima, Brasil.

*E-mail: jonkacio@gmail.com; fitoquimico1@gmail.com

Recebido: 3 de Dezembro de 2020

Aceito: 14 de Fevereiro de 2021

Publicado online: 14 de Abril de 2021

Parasitic diseases represent a serious global problem and directly affect the health and quality of life of the population. *Mansoa alliacea* is a bignoniaceae found mainly in the Brazilian forests, known as “cipó-de-alho”, that means garlic vine, because of the strong odor of garlic. It is a plant used in folk medicine, with reports of various biological activities (anti-inflammatory, antifungal, antimicrobial and antioxidant). The present study aimed to characterize the essential oil of *M. alliacea* and unpublished evaluation of nematicidal and leishmanicidal activities against *Leishmania amazonensis* and *Caenorhabditis elegans*. The essential oil was obtained by hydrodistillation and its chemical composition was analyzed by GC-MS and quantified by GC-FID. Leishmanicidal activity was performed on intracellular amastigotes of *L. amazonensis* using canine macrophages DH82, activity was measured using Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). The nematicidal activity was evaluated on larvae of the nematode *C. elegans* model by means of the evaluation of motility. The oil cytotoxicity was evaluated by colorimetric tetrazolium salt (MTT) assay in different concentrations. The drugs used as positive controls were tetravalent antimony in anti-leishmania activity and ivermectin for anti-nematode activity. GC-MS analyses revealed the organosulfur profile of the oil, with diallyl disulfide (36.6 %) and diallyl trisulfide (53.3 %) as majority fractions (90.2 %). The oil had excellent leishmanicidal activity, presenting an IC_{50} of 9.4 $\mu\text{g/mL}$, value 5 times lower than antimony (III) (IC_{50} 53 $\mu\text{g/mL}$). The cytotoxic dose (CC_{50}) of the oil was 90.7 $\mu\text{g/mL}$, whereas antimony was CC_{50} = 1.7 $\mu\text{g/mL}$. The selectivity index (reason between CC_{50}/IC_{50}) of the oil was 10 and the antimony (III) was 0.03. The oil also showed nematicidal action against *C. elegans* larvae (IC_{50} = 113 $\mu\text{g/mL}$) but ivermectin control was more efficient (IC_{50} = 6 $\mu\text{g/mL}$). The unpublished results, presented here, reveal the potential of *M. alliacea* against parasitic agents such as leishmaniasis and nematodes.

Keywords: Organosulfur Compounds; chemical composition; biological activities

1. Introdução

As doenças parasitárias causadas por nematódeos e protozoários representam um grave problema mundial que impactam diretamente na saúde e na economia dos países. Tais doenças estão relacionadas à baixa condição socioeconômica, saneamento básico inadequado, contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos e rurais. Aproximadamente 39 milhões de DALYs (*Disability Adjusted Life Years* - anos de vida perdidos ajustados por incapacidade) são contabilizados por ano devido aos efeitos deletérios causados por essas parasitoses.^{1,2}

As doenças causadas por nematódeos, vermes cilíndricos, continuam a ser uma problemática considerável para criação de animais, na agricultura e na saúde pública, aumentando os custos de produção, diminuindo o suprimento de alimentos e causando déficits na saúde do hospedeiro.³

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* e apresentam três formas clínicas, a cutânea, tegumentar ou mucocutânea e visceral ou calazar.^{1,2} *Leishmania amazonensis* é a espécie responsável por causar a forma mais grave de leishmaniose tegumentar. Apresenta potencial patogênico para o homem, sendo responsável não só pela forma mais simples da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), mas também por formas clínicas mais graves, de longa evolução, com lesões cutâneas e/ou mucosas bastante destrutivas de difícil manejo terapêutico como a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD).^{1,4,5}

Desde meados do século passado o tratamento das leishmanioses no Brasil é realizado com fármacos contendo em sua composição antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), entretanto, o uso desses medicamentos necessitam de doses elevadas no tratamento, apresentando alta toxicidade e muitos efeitos colaterais.⁵⁻⁷ Na dosagem recomendada para o tratamento (20 mg Sb^{5+} /kg/dia) o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas ou renais que indiquem modificação ou interrupção do tratamento.⁸ Já o controle das nematodioses é realizado com as principais classes de anti-helmínticos disponíveis no mercado, como por exemplo benzimidazóis, imidazóis e avermectinas, entretanto o mecanismo de resistência já é reconhecido, para todos estes fármacos citados, nos parasitos de importância veterinária. Ainda que para os parasitos de importância humana, existem poucos relatos de resistência, há que preocupar, pois o uso de maneira pouco racional pode levar ao surgimento de parasitos resistentes.⁹⁻¹² Dessa forma, a busca por novos candidatos a fármacos, que sejam eficazes e com menos toxicidade, é necessária.

Os produtos naturais e seus derivados já são utilizados por povos tradicionais há milênios, como alternativa aos medicamentos convencionais para o tratamento das parasitoses. Os produtos naturais têm sido fonte para produção de novos medicamentos, evidenciada pela presença crescente no mercado de medicamentos com estruturas ativas baseadas em compostos naturais e também pelo aumento no número de patentes depositadas.¹³⁻¹⁶

Mansoa alliacea é uma espécie da família Bignoniaceae encontrada principalmente nas florestas do Brasil, popularmente conhecida como cipó-alho, devido ao forte odor de alho exalado das suas folhas e galhos. Estudos mostraram que extratos e óleo essencial de *M. alliacea* apresenta potencial para atividades biológicas. Estudo com extrato das folhas de *M. alliacea* mostrou atividade antiviral contra fitovírus *Papaya fingspot vírus*.¹⁷ Extrato dos caules e raízes de *M. alliacea* foram usados para testar a capacidade de inibir a biossíntese de prostaglandina *in vitro*, apresentando efeito anti-inflamatório.¹⁸ O potencial antioxidante reativo total (TRAP) e total reatividade antioxidante (TAR) dos extratos polares das folhas de *M. alliacea* foram testados, apresentando ação antioxidante.¹⁹ Folhas de *M. alliacea* exibiu atividade antifúngica inibindo completamente o crescimento de micélios dos fungos *Drechlera oryzae*.²⁰ O óleo essencial de *M. alliacea* mostrou atividade larvicida em 24h com valores letais de LC_{50} e LC_{90} contra as larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*.²¹ A atividade antimicrobiana foi testada em extratos metanólico, etanólico e clorofórmico, sendo ativos contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus marceius* e *Proteus vulgaris*.²² Populações tradicionais da Amazônia fazem o uso das folhas e caules da planta em forma de um extrato líquido para tratamento de leishmanioses tegumentar²³

e verminoses,²⁴ entretanto não há estudos científicos que comprovem a ação do óleo essencial de *M. alliacea* frente a esses patógenos.

O presente estudo mostra a indicação da composição química e o relato inédito das atividades leishmanicida e nematocida, do óleo essencial das folhas de *M. alliacea*, frente à *Leishmania amazonensis* e *Caenorhabditis elegans*.

2. Metodologia

2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas da planta *M. alliacea* foram coletadas em setembro de 2016, no período chuvoso, no município de Boa Vista, Roraima, Brasil (2°47'47.6"N 60°40'58.3"W). A excisada da planta foi depositada no Herbário do Centro de Biodiversidades da Universidade Federal de Roraima, onde a identificação taxonômica da espécie foi realizada e registrada com o código UFRR 8807. Número de cadastro do patrimônio genético AC4A3BE.

2.2. Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir de 400 g de folhas frescas de *M. alliacea*, lavadas e colocadas em balão de fundo redondo de 5 L juntamente com 2,5 L de água destilada acoplado a um sistema de hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger, conectado a uma manta aquecedora 220 v. Após 4 horas de extração, a mistura heterogênea de água e óleo essencial contida no dosador do sistema foi separada, retirando primeiramente o hidrolato, em seguida a fração de óleo essencial foi armazenado ao abrigo da luz em sistema refrigerado. Para eliminação total dos resíduos de água, o recipiente com óleo foi colocado a temperatura de -4 °C. Os resíduos de água congelados e a fase líquida do óleo essencial foi separado com uma pipeta de Pasteur e armazenado em outro frasco âmbar. Para retirar os rastros de óleo essencial do hidrolato, foi realizado uma extração líquido-líquido com clorofórmio, a parte orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e o óleo foi armazenado no refrigerador com temperatura de -4 °C. Após, as frações de óleo essencial foram reunidas.

2.3. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

O óleo essencial de *M. alliacea* (OEMA) foi quantitativamente analisado usando um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), equipado com coluna capilar de sílica fundida Rxi-IMS (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm (Restek), fase não-polar. A Temperatura coluna foi de 50 °C (5 min) aumentando 3 °C/min, até atingir 240 °C. Injetor: 250 °C Split (1:50). Para a detecção em GC-MS foi utilizado um sistema de ionização

eletrônica com impacto eletrônico de 70 eV, temperatura da interface de 250 °C. O hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo constante de 3,0 mL/min. Volume de injeção: 1,0 µL.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massas, dos componentes, com espectros de referência da biblioteca do banco de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST11), no software de aquisição de dados *GCMS Solution* (Shimadzu). Também identificou-se com base na comparação de seus índices de retenção calculados através do método do índice de Kovats,^{25,26} usando uma série homóloga de n-alcenos C9 a C22, injetada nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para as amostras. Os valores obtidos foram comparados com valores de índice Kovats na literatura²⁷.

2.4. Análise de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID)

Para análise em CG-FID foi utilizado o cromatógrafo a gás HP 7820A (Agilent) realizados em coluna HP-5 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Agilent). A temperatura da coluna foi de 50 °C a 0 min. até 240 °C, numa variação de 3 °C/min. Um detector de ionização de chama foi utilizado para análise GC-FID a 250 °C, injetor: 250 °C Split (1:50). O gás de arraste utilizado foi o H₂ com um fluxo constante de 3 mL/min. O volume de injeção foi de 1.0 µL. Software de aquisição de dados: *EZChrom Elite Compact* (Agilent). A amostra foi diluída 1 % em clorofórmio. Os dados quantitativos foram obtidos eletronicamente de picos integrados, assim os resultados foram expressos como a porcentagem relativa de área do pico.

2.5. Teste de fármacos sobre *Leishmania amazonensis*

A avaliação da ação do óleo essencial estudado foi realizada sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*. A análise seguiu *in vitro* utilizando macrófago canino (DH82). Para isso, essas células, cultivadas em meio RPMI suplementado com 10 % soro bovino fetal e 1 [% de solução de antibióticos (5.000UI penicilina + 5 mg estreptomicina/mL), foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10⁵ células/mL em 100 µL. As placas foram mantidas em atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C por 24 h, para permitir a adesão dessas células ao fundo da placa. Após esse período os macrófagos aderidos foram infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na proporção 50 parasitos para cada célula hospedeira. Após 4h de incubação em estufa, a monocamada de células foi lavada três vezes com tampão PBS gelado, para remover os parasitos extracelulares. Finalizada a etapa de lavagem, as células foram submetidas ao tratamento com OEMA, diluídos em RPMI em doses que variaram de 0,01 a 1000 µg/mL (0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/mL) e incubadas por 48 h em atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C.

Ao fim do período de tratamento as culturas foram fixadas, adicionando a cada poço metanol gelado durante 15 min e secas com ar quente. Para desenvolvimento do teste ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), a cultura foi lavada com 100 µL de solução de PBS contendo 5 % de BSA (albumina do soro bovino, Sigma). E mantida com essa mesma solução por 1 h a 37 °C, para bloquear a ligação inespecífica. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e adicionado soro de paciente infectado com *Leishmania* sp. (diluição 1:100) e novamente as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem (PBS + 0,05 % tween-20, pH 7,4). Logo em seguida, foi adicionado a cada poço 100 µL de IgG anti-humano conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP; diluição 1:2000). As placas foram incubadas durante 1 h a 37 °C e, em seguida foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem, antes de a reação ser desenvolvida.

Para desenvolvimento da reação foi adicionado a cada poço 100 µL de solução reveladora (10 mL de tampão citrato, 10 mg de OPD, orto-fenilenodiamina e 2 mL H₂O₂ 3M) a 37 °C. Após 15 min, a reação foi parada pela adição de 30 µL de solução ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 mol/L. Por fim, placas foram lidas em leitor de ELISA (*Molecular Devices*, EUA) a 492 nm.

Esse ensaio foi realizado em quadruplicata biológica, utilizando como controle negativo macrófagos infectados e não tratados, e como controle positivo sal de antimônio (III) nas mesmas concentrações utilizadas para os compostos, de 0,01 a 1000 µg/mL. A IC₅₀ foi calculada como se segue: primeiro, a influência do fundo placa e da ligação de anticorpos não específicos para amastigotas de *Leishmania* foram corrigidos, subtraindo o (densidade óptica) OD_{492nm} de macrófagos infectados e incubados com soros negativos. Os resultados *in vitro* de atividade foram expressos como índice de inibição de crescimento em relação aos controles de macrófagos infectados com amastigotas e não-tratados,^{28,29} conforme seguinte equação:

$$\text{INDEX} = (\text{OD}_{492\text{nm}} \text{ poços tratados} / \text{OD}_{492\text{nm}} \text{ controles não tratados}) \times 100.$$

A IC₅₀ foi determinada como a concentração do composto capaz de reduzir o INDEX em 50 %, para isso, utilizou-se o programa estatístico software *GraphPad Prism 5.0*.

2.6. Avaliação da citotoxicidade do OEMA

Para avaliar a citotoxicidade do OEMA foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: macrófagos de cão DH82, célula renal basal de macaco verde africano (BGM), hepatócito humano do tipo (HepG2) cultivados em RPMI suplementado com 10 % soro bovino fetal e 1 % de solução de antibióticos (5.000UI penicilina + 5 mg estreptomicina/mL). Essas células foram plaqueadas em um volume de 100 µL por

poço, contendo um total de 5×10^4 células para macrófagos e 1×10^4 para HepG2 e BGM, incubadas por 24 h a 37°C e 5 % de CO₂. Após esse período, o meio de cultivo RPMI foi retirado e as células aderidas foram tratadas com 100 µL dos compostos em meio RPMI nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios com amastigota intracelular que variou de 0,01 a 1000 µg/mL (0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/mL do OEMA) e incubadas por 48 h em atmosfera de 5 % CO₂ a 37° C.

Após esse período de incubação, foram adicionados em cada poço 10 µL de MTT (5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por um período de 4 h. Finalizado esse tempo, a solução de MTT foi aspirada e os cristais de formazan solubilizados em 100 µL de DMSO. A densidade óptica (OD) foi mensurada a 570 nm em um leitor de ELISA.^{28,29}

Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Como controle negativo foi utilizado DMSO a 0,1 %. A absorvância referente à influência do fundo da placa foi corrigida. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade conforme seguinte equação:

$$\% \text{Viabilidade} = \text{OD}_{570} \text{ poços tratadas} / \text{OD}_{570} \text{ poços controle} \times 100.$$

Os valores da viabilidade foram utilizados para calcular valores de CC₅₀ obtidos por análise de regressão não linear no programa estatístico software *GraphPad Prism 5.0*.

2.7. Avaliação nematicida - produção de *Caenorhabditis elegans*

Devido sua proximidade filogenética e fisiológica aos nematódeos parasitos, o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* se torna um excelente modelo para prospecção de novos fármacos.^{30, 31}

Para a avaliação da ação nematicida do OEMA utilizou larvas (L3) de *C. elegans*, que foram cultivadas em placas de NGM 8P, seguindo a metodologia descrita por Machado e colaboradores,⁹ Brenner³² e Stiernagle.³³ Após sete dias de cultivo das placas em BOD a 20°C, as larvas foram lavadas com meio M9 e passadas através de três tamises com aberturas de 40 µm, 30 µm e 20 µm. As larvas retidas no tamis de 20 µm foram recolhidas por retrolavagem desse. As larvas obtidas foram lavadas 3x por centrifugação a 700 g por 4 minutos com meio M9.³³

2.8. Ensaio nematicida contra *Caenorhabditis elegans*

As larvas de *C. elegans* foram ressuspensas em meio M9 contendo aproximadamente 1000 larvas para cada 100 µL. Foram adicionados 100 µL de suspensão de larvas para cada poço em uma placa de 96 poços. O óleo essencial foi testado nas seguintes concentrações 1000, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado ivermectina. Ambos realizados em quadruplicatas para cada concentração. Para o grupo de controle negativo, foi

utilizado o meio M9 com 0,05 % DMSO. As placas contendo os fármacos e larvas foram acondicionadas em uma BOD a 20°C. Após 48 e 72 horas, 10 µL de solução, contendo aproximadamente 100 larvas, foram retirados de cada poço para análise e quantificação em microscópio óptico, no aumento de 40X, do número de larvas paralisadas. As larvas eram consideradas paralisadas quando apresentavam corpo retilíneo e sem nenhum movimento.

O percentual de redução da motilidade foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da motilidade} = \left(\frac{n^\circ \text{ larvas moveis}}{n^\circ \text{ larvas moveis} + n^\circ \text{ larvas paralisadas}} \right) \times 100$$

Os dados de IC₅₀ de ivermectina e do OEMA, para *C. elegans*, foram obtidos por meio de regressão não linear no programa estatístico software *GraphPad Prism 5.0*.

3. Resultados e Discussões

3.1. Composição química do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial de *M. alliacea*, obtido por hidrodestilação, foi de 0,20 % (m/m). A análise por *GC-MS* e *CG-FID* do OEMA levou à quantificação e identificação de 8 componentes, representando 97,7 % do total de componentes presentes na amostra de OEMA. A composição química do óleo essencial estudado é caracterizada pela presença de compostos organossulfurados. Dentre os compostos do OEMA estão os majoritários, compondo 90,2 % do óleo, dialil trissulfeto (53,3 %), dialil dissulfeto (36,6 %) e os minoritários dialil tetrasulfeto (3,4 %), metil alil dissulfeto (2,4 %), dimetil tetrasulfeto (0,6 %), dipropil dissulfeto (0,5 %), metil alil trissulfeto (0,4 %) e dimetil trissulfeto (0,2 %). Tais dados foram obtidos através da comparação com o banco de dados da biblioteca espectral NIST11 (Material Suplementar).

A composição química do óleo, incluindo o índice de retenção e a porcentagem relativa a cada constituinte é apresentado na Tabela 1.

As fórmulas estruturais revelam presença de compostos acíclicos heterogêneos, tendo o enxofre como heteroátomo, presentes em todas as estruturas, variando em quantidades de 2 a 4.

A caracterização química do OEMA coletado no município de Boa Vista, no estado de Roraima, norte do Brasil, indicou a presença de compostos da classe dos organossulfurados, destacando-se majoritariamente o dialil dissulfeto (36,9 %) e dialil trissulfeto (53,3 %). Um estudo das folhas de um espécime coletado no estado do Pará, no Norte do Brasil, mostrou que a composição de constituintes mais abundantes no óleo essencial era constituída por dialil dissulfeto (31,4 %) e dialil trissulfeto (30,5 %), os minoritários metil alil trissulfeto (2,5 %) e dialil tetrasulfeto

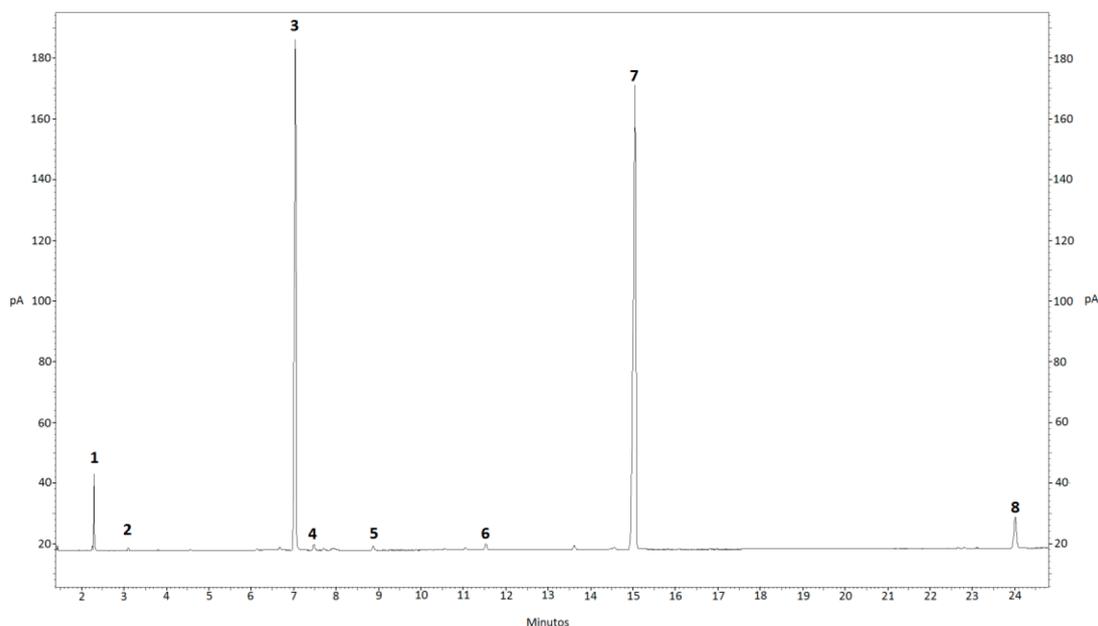


Figura 1. Cromatograma (GC-FID) do óleo essencial das folhas de *M. alliacea*, destacando-se como substâncias majoritárias: **3**: dialil dissulfeto; **7**: dialil trissulfeto

Tabela 1. Caracterização química dos compostos presentes no óleo essencial de *Mansoa alliacea*

Pico	Compostos ^a	Concentração (%) ^b	RT (min) ^c	IKcalc ^d	IKlit ^e
1	metil alil dissulfeto	2,4	2,275	950	928
2	dimetil trissulfeto	0,2	3,077	972	971
3	dialil dissulfeto	36,9	7,024	1077	1075
4	dipropil dissulfeto	0,5	7,458	1089	1090
5	metil alil trissulfeto	0,4	8,859	1127	1126
6	dimetil tetrasulfeto	0,6	11,512	1197	1194
7	dialil trissulfeto	53,3	15,036	1292	1292
8	dialil tetrasulfeto	3,4	23,993	1531	1510

^a Identificação sugerida por CG-MS; ^b Resultados obtidos através do cromatograma de CG-FID; ^c Tempo de retenção; ^d índice de Kovats calculado usando uma série de n-alcenos C9-C20 nas mesmas condições que para as amostras^{25,26}; ^e Índice de retenção ou índice de Kovats literatura²⁷.

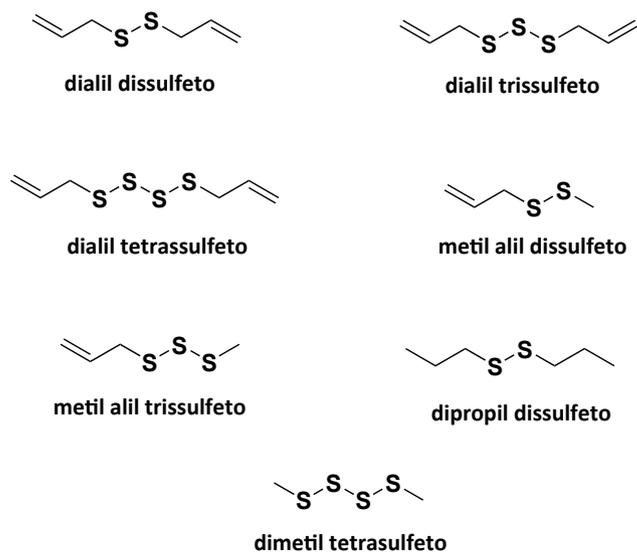


Figura 2. Estruturas químicas dos compostos organossulfurados encontrados no OEMA

(1,2 %) também foram encontrados.^{20,34} Em outro estudo, ainda no estado do Pará, o óleo das folhas de *M. alliacea* foi caracterizado pela presença dos mesmos compostos majoritários dialil dissulfeto (34,0 %), dialil trissulfeto (58,2 %) e o minoritário dialil tetrassulfeto (3,3 %),³⁵ mostrando valores próximos aos identificados neste presente estudo. Na Índia, um estudo analisou o óleo de folhas de *M. alliacea* e também levou à identificação de dialil dissulfeto (37,0 %) e dialil trissulfeto (44,0 %), juntamente com 1-octen-3-ol (5,0 %) e dialil tetrassulfeto (4,0 %).^{20,36}

A similaridade na composição e quantidade dos constituintes majoritários das amostras citadas, de óleo essencial de *M. alliacea*, é uma mistura comumente encontrada no gênero *Allium*.^{20,34-36} Estudos anteriores mostraram que folhas de *M. alliacea* contêm aliina (sulfóxido de *S*-alilcisteína), que sofre degradação em contato com a água ou ar, produzindo estruturas finais mais estáveis como dialil dissulfeto, dialil trissulfeto e dialil tetrassulfeto,³⁸ apresentando odores característicos ao do alho. Esses compostos organosulfurados presentes no óleo essencial do *Allium sativum* e *Mansoa alliacea* estão associados à atividades bioativas como a anti-inflamatória,¹⁸ antifugos,³⁹ anticâncer,⁴⁰ antioxidante⁴¹⁻⁴³ e antimicrobiana.^{41,44}

3.2. Atividade leishmanicida

A atividade biológica leishmanicida *in vitro* dos compostos do OEMA foi avaliada sobre *L. amazonensis*, determinando o efeito sobre a viabilidade das formas amastigotas intracelulares, a fim de obter a concentração capaz de inibir o crescimento das culturas em 50 % (IC₅₀). Nos testes foi possível estabelecer uma relação dose-dependente, em que a redução da proliferação do parasito foi proporcional ao aumento da concentração da mistura de compostos. Uma representação da curva sigmoidal de dose-resposta (log [substância] versus porcentagem a inibição da proliferação das formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*) foi ilustrada para o OEMA e antimônio (III) (Figura 3). A avaliação das curvas permitiu a determinação dos valores de IC₅₀.

O valor de IC₅₀ do óleo essencial testado foi de 9,4 µg/mL, valor 5 vezes abaixo aos 53 µg/mL do controle positivo sal de antimônio (III). Portanto, pode-se afirmar que o OEMA apresentou eficácia na inibição da proliferação de amastigota intracelular de *L. amazonensis*.

Diversas atividades biológicas são citadas na etnofarmacologia e são bastante conhecidas nas cidades da Guyana, Suriname, Amazônia do Brasil e Peru. Os povos locais citam o uso medicinal das plantas, inclusive encontra-se alguns exemplos de relatos do uso medicinal da *M. alliacea* como anti-inflamatório,¹⁸ para o tratamento de dores corporais, musculares e lesões, como remédio natural para resfriado e pneumonia¹⁹, para o tratamento da gripe, tosse, como analgésico,²⁰ controle da febre e antirreumático.²⁴

Acerca da *M. alliacea*, apesar de ser citada por indígenas na medicina tradicional para o tratamento de úlceras e leishmanioses,²³ até o presente estudo, não existiam dados científicos comprovando de que as folhas, assim como o seu óleo essencial, tivessem tal efeito leishmanicida, apresentando aqui o primeiro relato. Em relação a substância majoritária, dialil trissulfeto, encontrada no OEMA, em estudos anteriores, quando testado de forma pura proveniente de outras fontes, apresentou efeito de inibição do crescimento de células infectadas com *Leishmania mexicana* (IC₅₀ = 7 µg/mL) e *Leishmania chagasi* (IC₅₀ = 6 µg/mL).⁴⁵ Uma importante característica do teste com OEMA empregado no presente estudo, inédito para Leishmanioses, mais especificamente *L. amazonensis*, é a realização sobre as formas amastigotas intracelulares cujas formas evolutivas são responsáveis por causar a doença nos mamíferos.⁵ Mesmo sendo uma mistura de compostos de diferentes concentrações, o OEMA apresentou menor valor de concentração inibitória de multiplicação para formas amastigotas, tendo maior atividade sobre *L. amazonensis* com IC₅₀ = 9,4 µg/mL contra IC₅₀ = 53 µg/mL do controle positivo antimônio (III), assim, o óleo mostrou ser um potente inibidor, capaz de impedir a multiplicação da mesma quantidade de formas amastigotas da *L. amazonensis* em uma concentração quase seis vezes menor que a do fármaco de referência.

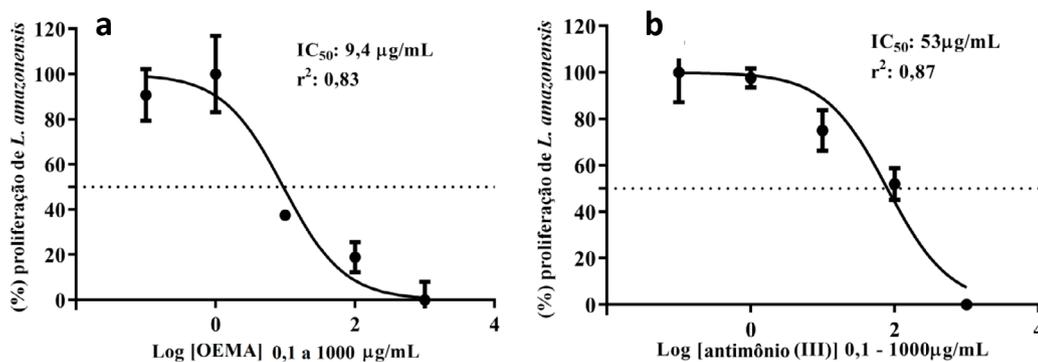


Figura 3. Curva de dose-resposta para o teste de atividade da inibição *in vitro* de OEMA^a e antimônio (III)^b sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* e seus respectivos valores de IC₅₀. Realizados em quadruplicata

Os valores de CC_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do metabolismo celular) foram maiores para o OEMA em relação ao antimônio (III) (Tabela 2), dando indícios que a citotoxicidade frente às células DH82, BGM e HepG2 é maior para antimônio (III), inibindo 50 % do metabolismo celular com uma concentração menor ao do OEMA.

Na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico, o índice de seletividade (IS) é um importante critério para determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro^{28,29}, sendo eficiente na seletividade do parasita intracelular. Um fármaco, para ser considerado seguro para sua aplicabilidade, deve possuir um índice de seletividade, pelo menos, igual a 10.^{46,47}

Os resultados do índice de seletividade (IS) apresentados na Tabela 2 mostram que o OEMA é 10 vezes menos tóxicos para as células DH82, 4,1 vezes menos tóxico para células BGM e 18,3 vezes menos tóxico para hepatócitos humanos HepG2 do que para as formas amastigotas do protozoário *L. amazonensis*. Isso mostra que o OEMA é mais seletivo para o protozoário do que para a célula hospedeira. Em contrapartida, o fármaco de referência, antimônio (III), apresentou baixos índices de seletividade, mostrando ser muito tóxico frente às linhagens celulares testadas.

3.3. Avaliação do efeito do OEMA sobre a motilidade de *Caenorhabditis elegans*

O OEMA, com composição identificada de substâncias organossulfuradas, foi avaliado através do teste de motilidade

com *C. elegans*.⁹ Os resultados indicaram que a porcentagem de mobilidade das larvas foi diretamente proporcional à concentração do óleo testado (Figura 4). O resultado da concentração capaz de inibir 50 % (IC_{50}) da motilidade do *C. elegans*, após 72 horas, para OEMA, foi de 113 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto a ivermectina, fármaco de referência no tratamento das nematodíases, apresentou $IC_{50} = 6 \mu\text{g}/\text{mL}$. Apesar dos valores de OEMA interferir na motilidade das larvas de *C. elegans*, a ivermectina apresentou valor de atividade mais expressiva contra nematódeos em relação ao OEMA.

A análise de regressão não linear foi usada para calcular o valor do IC_{50} . O modelo foi considerado ter bom ajuste ao conjunto de dados com r^2 acima de 0,8 para regressão não linear.⁴⁷

Apesar do controle positivo, ivermectina ($IC_{50} = 6 \mu\text{g}/\text{mL}$), apresentar atividade nematicida mais expressiva em relação ao OEMA ($IC_{50} = 113 \mu\text{g}/\text{mL}$), este estudo relata dados inéditos acerca da atividade nematicida de *M. alliacea*, pois apesar de ser citada por povos indígenas do Suriname, com ação vermífuga,^{24,48} até o presente estudo não constava na literatura evidências científicas que comprovavam a ação nematicida do óleo essencial da planta *M. alliacea*.

Tal efeito comprovado remete aos compostos organossulfurados presentes no OEMA. Por exemplo, a ação nematicida sobre as larvas de *C. elegans* pode ser correlacionada com a literatura em testes contra os nematódeo *Bursaphelenchus xylophilus*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Aphelenchoides sacchari*, ao qual foi utilizado compostos dialil dissulfeto e dialil trissulfeto provenientes de *Allium sativum*⁴⁹ e majoritários na composição do OEMA,

Tabela 2. Avaliação do OEMA e antimônio (III) sobre multiplicação de amastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade sobre as linhagens celulares

Composto	Amastigota IC_{50}^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Macrófagos caninos DH82 CC_{50}^b ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IS ¹	Célula renal basal de macaco verde africano BGM CC_{50}^c ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IS ²	Hepatócitos humanos (HepG2) CC_{50}^d ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IS ³
OEMA	9,4	90,7 \pm 0,1392	10	38,5 \pm 0,1741	4,1	172 \pm 0,1164	18,3
Antimônio III	53	1,70 \pm 0,0785	0,03	16,7 \pm 0,1725	0,32	1,00 \pm 0,06163	0,02

^a IC_{50} = Concentração capaz de inibir 50 % da multiplicação das amastigotas de *L. amazonensis*.

^{b,c,d} CC_{50} = Concentração capaz de inibir 50 % do metabolismo celular.

IS^{1,2,3} = Índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50}), sobre as linhagens celulares de macrófago DH82¹, BGM² e HepG2³

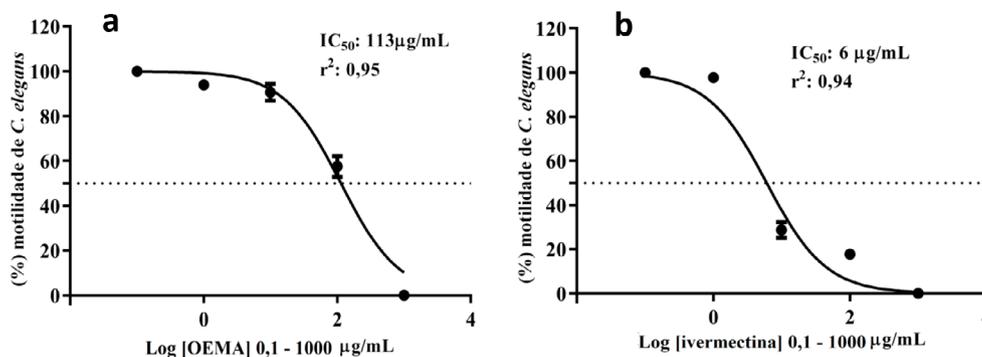


Figura 4. Curva de dose-resposta para o teste de atividade in vitro de OEMA^a e ivermectina^b sobre as larvas de *C. elegans* e seus respectivos valores de IC_{50} . Realizados em quadruplicata

corroborando com os resultados de ação nematicida aqui apresentados. Nath e colaboradores⁵⁰ relataram que o óleo de *Allium sativum* era mais tóxico do que o dissulfeto de dialila sintético para testes nematicidas frente à *Tylenchulus semipenetrans* e *Aphelenchoides sacchari*, sugerindo uma investigação acerca de outros compostos sulfurados presentes no óleo essencial de sua análise.

4. Considerações Finais

As plantas são importantes fontes na busca por novos compostos bioativos e agentes seletivos para o tratamento de doenças parasitárias. O óleo essencial analisado apresentou perfil químico organossulfurado com série homóloga de enxofre para os três compostos de maior concentração % (m/m). A mistura desses compostos, no OEMA, apresentou boa capacidade de inibir o crescimento das formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, tendo baixa citotoxicidade boa seletividade celular, assim, o óleo essencial é mais tóxico para o protozoário do que para célula hospedeira. Na avaliação nematicida, mesmo com IC₅₀ menos expressivo em relação ao controle positivo testado, o OEMA foi capaz de interferir na motilidade das larvas do nematódeo *C. elegans*.

O presente estudo, inédito, traz o primeiro relato científico da atividade leishmanicida e nematicida do óleo essencial de *M. alliacea*. Os resultados revelaram que a espécie estudada é uma fonte promissora para a descoberta de novos compostos bioativos contra agentes parasitários.

Agradecimentos

Agradecemos às instituições Universidade Federal de Roraima (UFRR) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro cedido para desenvolvimento desta pesquisa. À Dra. Vany Ferraz, do Laboratório de Cromatografia da UFMG, pelas análises químicas realizadas.

Referências Bibliográficas

1. Stebut, E. V.; Leishmaniasis. *Deutsche Dermatologische Gesellschaft* **2015**, *13*, 191. [CrossRef]
2. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Fourth WHO report on neglected diseases, 2017. [Link]
3. Ze-Ying H, Ji-Min, W.; Research progress on economic impacts of animal disease. *Journal of Agricultural Science and Technology* **2015**, *17*, 167. [Link]
4. Carvalho, A. K.; Silveira, F. T.; Passero, L. F.; Gomes, C. M.; Corbett, C. E.; Laurenti, M. D.; *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology* **2012**, *34*, 395. [CrossRef]
5. Silva, B. J. M.; Silva, R. R. P.; Rodrigues, A. P. D.; Farias, L. H. S.; Nascimento, J. L. M.; Silva, E. O.; *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. *Micron* **2016**, *82*, 25. [CrossRef]
6. Franco, A. M. R.; Grafova, I.; Soares, F. V.; Gentile, G.; Wyrepkowski, C. D. C.; Bolson, M. A.; Sargentini Jr, E.; Carfagna, C.; Leskelä, M.; Grafov, A.; Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. *International Journal of Nanomedicine* **2016**, *11*, 6771. [CrossRef]
7. Pavli, A.; Maltezou, H. C.; Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases* **2010**, *14*, 1032. [CrossRef]
8. Brasil. Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2ª ed., Ministério da Saúde, Brasília, 2017. [Link]
9. Machado, A. R.; Ferreira, S. R.; Medeiros, F. S.; Fujiwara, R. T.; Souza Filho, J. D.; Pimenta, L. P. S.; Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. *Parasites & Vectors* **2015**, *8*, 113. [CrossRef]
10. Qi, H.; Wang, W. X.; Dai, J. L.; Zhu, L.; In vitro anthelmintic activity of *Zanthoxylum simulans* essential oil against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* **2015**, *211*, 223. [CrossRef]
11. Kaur, T.; Jasrotia, S.; Ohri, P.; Manhas, R. K.; Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of amultifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiological Research* **2016**, *192*, 247. [CrossRef]
12. Grzybek, M.; Kukula-Koch, W.; Strachecka, A.; Jaworska, A.; Phiri, A. M.; Paleolog, J.; Tomczuk, K.; Evaluation of Anthelmintic Activity and Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Extracts—In Vitro and in Vivo Studies. *International Journal of Molecular Science* **2016**, *17*, 1456. [CrossRef]
13. Kibble, M.; Saarinen, N.; Tang, J.; Wennerberg, K.; Makela, S.; Aittokallio, T.; Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products. *Natural Product Reports* **2015**, *32*, 1249. [CrossRef]
14. Shen, B. A.; New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell* **2015**, *163*, 1297. [CrossRef]
15. Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J.; The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14*, 111. [CrossRef]
16. De Fátima, Â.; Terra, B. S.; da Silva, C. M.; da Silva, D. L.; Araujo D. P.; Neto, L. S.; de Aquino, A. N.; From nature to market: Examples of natural products that became drugs. *Recent Patents on Biotechnology* **2014**, *8*, 76. [CrossRef]
17. Khurana, S. M.P.; Bhargava, K. S.; Effect of plant extracts on the activity of three papaya viruses. *The Journal of General and Applied Microbiology* **1970**, *16*, 225. [CrossRef]
18. Dunstan, C. A.; Noreen, Y.; Serrano, G.; Cox, P.A.; Perera, P.; Bohlin, L.; Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, *57*, 35. [CrossRef]
19. Desmachelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Llesuy, S.; Ciccio, G.; Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal of Pharmacognosy* **1997**, *35*, 1. [CrossRef]

20. Zoghbi, M. G. B.; Oliveira, J.; Skelding, G. M.; Guilhon, P.; The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2009**, *19*, 795. [[CrossRef](#)]
21. Granados-Echegoyen, C.; Pérez-Pacheco, R.; Soto-Hernández, M.; Ruiz-Vega, J.; Lagunez-Rivera, L.; Alonso-Hernandez, N.; Gato-Armas, R.; Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2014**, *7*, 594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rachel, K. V.; Kiranmayi, P.; Srinivas, D.; Susan, G. R.; Interactions of secondary metabolites from *Adenocalymma alliaceum* in inhibiting microbial growth. *Papirex - Indian Journal of Research* **2013**, *2*, 7. [[CrossRef](#)]
23. Hasrat, J. A.; de Backer, J. P.; Vanquelin, G.; Vlietinck, A. J.; Medicinal plants in Suriname: screening of plant extracts for receptor binding activity. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 59. [[CrossRef](#)]
24. Giovannini, P.; Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *Journal of Ethnopharmacology* **2015**; *164*, 78. [[CrossRef](#)]
25. Kovats, E.; Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* **1958**, *41*, 1915. [[CrossRef](#)]
26. Mühlen, C.; Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional Abrangente. *Scientia Chromatographica* **2009**, *1*, 21. [[Link](#)]
27. Adams, R. P.; *Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*, 4a. ed., *Allured Publishing Co*: Carol Stream, 2007.
28. Dias, L. C.; Lima, G. M.; Pinheiro, C. B.; Rodrigues, B. L.; Donnici, C. L.; Fujiwara, R. T.; Bartholomeu, D. C.; Ferreira, R. A.; Ferreira, S. R.; Mendes, T. A. O.; Silva, J. G.; Alves, M. R. Design, structural and spectroscopic elucidation of new nitroaromatic carboxylic acids and semicarbazones for the in vitro screening of anti-leishmanial activity. *Journal of Molecular Structure* **2015**, *1079*, 298. [[CrossRef](#)]
29. Rodríguez-Hernandez, D.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Almeida, R. M.; Fujiwara, R. T.; Ferreira, S. R.; Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from *Sapindus saponaria* L. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 153. [[CrossRef](#)]
30. Katiki, L. M.; Ferreira, J. F.; Zajac, A. M.; Masler, C.; Lindsay, D. S.; Chagas, A. C.; Amarante, A. F.; *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Veterinary Parasitology*. **2011**, *182*, 264. [[CrossRef](#)]
31. Larsch, J.; Ventimiglia, D.; Bargmann, C. I.; Albrecht, D. R.; High-throughput imaging of neuronal activity in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **2013**, *110*, E4266. [[CrossRef](#)]
32. Brenner, S.; The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71. [[Link](#)]
33. Stiernagle, T.; Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans Biology* **2006**. [[CrossRef](#)]
34. Zoghbi M. G. B.; Ramos, L. S.; Maia, J. G. S.; Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Volatile sulfides of the Amazonian garlic bush. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1984**, *32*, 1009. [[CrossRef](#)]
35. Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S.; Volatile constituents from *Adenocalymma alliaceum* Miers and *Petiveria alliacea* L., two medicinal herbs of the Amazon. *Flavour and Fragrance Journal* **2002**, *17*, 133. [[CrossRef](#)]
36. Rao, L. J. M.; Srinivas, P.; Gurudutt, K. N.; Chemical composition of the volatile oil from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum*). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* **1999**, *21*, 987. [[Link](#)]
37. Apparao, M. A.; Kjaer, A.; Olsen, O.; Rao, E. V.; Rasmussen, K. W.; Sorensen, H.; Alliin in the garlicky taxon *Adenocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Phytochemistry* **1981**, *20*, 822. [[CrossRef](#)]
38. Apparao, M. A.; Kjaer, A.; Madsen, J. O.; Rao, E. V.; Dialllyl di-, tri- and tetrasulphide from *Adenocalymma alliacea*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1660. [[CrossRef](#)]
39. Pârvu, M.; Pârvu, A. E.; Vlase, L.; Rosca-Casian, O.; Pârvu, O.; Puscas, M.; Allicin and alliin content and antifungal activity of *Allium senescens* L. ssp. *montanum* (F. W. Schmidt) Holub ethanol extract. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5*, 6544. [[Link](#)]
40. Khanum, F.; Anilakumar, K. R.; Viswanathan, K. R.; Anticarcinogenic properties of garlic: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2004**, *44*, 479. [[CrossRef](#)]
41. Kopeč, A.; Piątkowska, E.; Leszczyńska, T.; Sikora, E.; Healthy properties of garlic. *Current Nutrition and Food Science* **2013**, *9*, 59. [[CrossRef](#)]
42. Capasso, A.; Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules* **2013**, *18*, 690. [[CrossRef](#)]
43. Martins, N.; Petropoulos, S.; Ferreira, I. C. F. R.; Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry* **2016**, *211*, 41. [[CrossRef](#)]
44. Lanzotti, V.; Scala, F.; Bonanomi, G.; Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews* **2014**, *13*, 769. [[CrossRef](#)]
45. McClure, C. D.; Nolan, L. L.; Zatyra, S. A.; Antileishmanial properties of *Allium sativum* extracts and derivatives. *Acta Horticulturae* **1996**, *426*, 183. [[CrossRef](#)]
46. Bézivin, C.; Tomasi, S.; Lohézic-Le, F. D.; Boustie, J.; Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 499. [[CrossRef](#)]
47. Ferreira, R. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015. [[Link](#)]
48. DeFilippis, R. A.; Maina, S. L.; Crepin, J.; *Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)*, Smithsonian Institution: Washington, 2004. [[Link](#)]
49. Park, I. K.; Park, J. Y.; Kim, K. H.; Choi, K. S.; Choi, I. H.; Kim, C. S.; Shin, S. C.; Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology* **2005**, *7*, 767. [[CrossRef](#)]
50. Nath, A.; Sharma, N. K.; Bhardwaj, S.; Τήραρα, C. D.; Nematicidal properties of garlic. *Nematologica* **1982**, *28*, 253. [[CrossRef](#)]