



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPGCS)

Efeito leishmanicida e cicatrizante da pomada de
Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clement **em lesões causadas por**
Leishmania (Leishmania) amazonensis

ANDRESSA DE SOUZA DA SILVA GODINHO

SÃO LUÍS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPGCS)

ANDRESSA DE SOUZA DA SILVA GODINHO

Efeito leishmanicida e cicatrizante da pomada de
Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clement **em lesões causadas por**
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^a Dr^a. Lucilene Amorim Silva

SÃO LUÍS

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Godinho, Andressa de Souza da Silva.

Efeito leishmanicida e cicatrizante da pomada de
Dysphania ambrosioides L. Mosyakin & Clement em lesões
causadas por Leishmania amazonensis / Andressa
de Souza da Silva Godinho. – 2019.
95 f.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, 2019.

1. Cicatrização. 2. Dysphania ambrosioides. 3.
Leishmania amazonensis. 4. Leishmaniose cutânea. 5.
Pomada de mastruz. I. Silva, Lucilene Amorim. II. Título.

Efeito leishmanicida e cicatrizante da pomada de
Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clement **em lesões causadas por**
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão – UFMA
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Universidade Federal do Maranhão - UFMA
(Examinador 1)

Prof^ª. Dr^ª Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão - UFMA
(Examinador 2)

Prof. Dr. Bruno de Paulo Ribeiro
Faculdade Laboro
(Examinador 3)

Aos meus pais...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo ao meu Deus Pai, por que dele, por ele e para ele são todas as coisas.

Ao meu marido e melhor parte de mim, por viver os sonhos comigo e me ajudar a recomeçar. Deus é amor e eu vejo Deus em você, por isso que te amo. Nunca esqueça nossa frase.

À minha grande fonte de superação, Maria Laura. “Putchuca”, mesmo sem entender saiba que você transformou a mamãe. Viver dois sonhos ao mesmo tempo, mudou o curso da minha vida. A cada fase do mestrado e saber que você correspondia a cada realização, se mexendo dentro de mim, mostrou que podemos ser melhores e mais fortes. Papai também fez parte disso.

Aos meus pais José e Hilda que incansavelmente e agora um pouco distantes fisicamente, não desistem de me estimular a expressar a pessoa que ajudaram a construir. Obrigada por me ensinarem os valores que me transformaram no que sou hoje. Todas as broncas, todos os sorrisos, todos os “apertos” financeiros, todas as necessidades supridas, serão para sempre a nossa história de superação. Mãe você é minha melhor amiga. Pai você é o nosso herói. E nada mais sou do que o reflexo de vocês.

Ao meu irmão José Junior que sempre me protegeu desde o nascimento. Meu Marrentinho, fica calmo, agora posso andar sozinha por que levo parte de você em mim.

Aos meus cunhados-irmãos por todas as orações e incentivo para realização dos meus sonhos. Junior Gold, minha história na UFMA começou por você. Joseane Godinho “minha coorientadora particular” obrigada por dividir comigo seu amor pela pesquisa. Anderson e Leticia, que nossa amizade cresça a cada dia em Deus.

À minha orientadora e confidente professora Lucilene Amorim Silva. Admiro sua vida e história. Obrigada pelos abraços tímidos e quase que arrancados em todos os momentos que deles precisei. A pesquisadora que hoje me transformo, leva sua essência como constituinte. Obrigada por me mostrar que não somos apenas pesquisadores, somos uma família que estuda para melhores condições de saúde para nossa sociedade.

À professora Flávia Nascimento por me ensinar a ser uma pessoa mais crítica, por me incentivar pela busca da verdade, para o crescimento do meu trabalho.

À professora Ana Paula de Azevedo, por muitas vezes ter pego em minha mão e ter me estimulado a seguir.

Aos professores do LIF, professoras Rosane, Mayara, Thiare, Márcia e professor Paulo Vitor, saibam que vocês são exemplos que quero seguir.

À professora Claudia Rocha, pela parceria nesse sonho.

À Caroline, “nossa Carol” você é a extensão dos meus sonhos. Cada parte desse trabalho, leva sua essência e disponibilidade. Admiração eterna.

Aos amigos Luís Douglas e Jefferson, vocês foram a extensão dos meus braços e mente. Obrigada por todo suporte para realização desse trabalho. Vocês se transformaram em minhas referências.

Aos eternos “Migs” Luana, Liana, Lillian e Eder. Obrigada por enriquecerem esse meu momento e fazer se tornar leve essa grande responsabilidade de se transformar mestre. Obrigada por todas as palavras que me ajudaram a crer que tudo daria certo.

Às técnicas Carlene e Renata, por toda assistência e auxílio.

Ao meu amigo de enxadas e peixeiras João Gustavo, foi ali onde tudo começou. Viu? Tudo deu certo. Mesmo quando as chuvas molhavam nosso mastroz e nos impediam de colhê-lo, mesmo assim persistimos e chegamos ao fim. Sucesso para você.

Aos amigos do LIAC, obrigada por toda parceria e assistência. André, Mirtes e Sulayne vocês são essenciais.

À dona Sonia por todo carinho e provisão alimentícia (risos). Sua alegria atrai leveza por onde passa.

À Ana pelo acompanhamento e provisão de todos os certificados.

À Fátima pelo recebimento e companheirismo desde minha chegada à UFMA. Obrigada pela amizade, parceria e os *tour* pelo centro de São Luís.

À Maria Raimunda e Dinalva por todas as orações e palavras de incentivo.

Aos agricultores da Horta da Raposa por me encantar com todo seus conhecimentos e valores sobre respeito à planta e ao solo.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA pelas bolsas e auxílio.

À Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade e por ser o berço da formação de profissionais conscientes e transformadores de sua sociedade.

A família LIF que mostrou que diferentes sonhos e realidades, podem se transformar em mudança para nosso país.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Epidemiologia da doença.....	12
2.2	O gênero <i>Leishmania</i>	14
2.2.1	Classificação taxonômica.....	14
2.2.2	Parasito, Vetor e o Ciclo biológico.....	16
2.3	A doença Leishmaniose	19
2.3.1	Um breve histórico.....	20
2.3.2	Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	21
2.3.4	Resposta Imune à Leishmaniose Tegumentar Americana	22
2.3.5	A quimioterapia da Leishmaniose	25
2.4	Uma alternativa para o tratamento da leishmaniose	27
2.4.1	<i>Dysphania ambrosioides</i> e o uso popular	27
2.4.2	Desafios para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Material vegetal	32
4.2	Preparação do extrato.....	32
4.3	Caracterização química do extrato.....	32
4.4	Manutenção dos parasitos	33
4.5	Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>D. ambrosioides</i>	33
4.5.1	Contagem das formas promastigota.....	33
4.5.2	Avaliação da mortalidade do parasito após exposição ao extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i>	34
4.6	Pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i> a 25%.....	35
4.7	Estudos de Estabilidade da formulação farmacêutica contendo 25% de extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Dysphania ambrosioides</i>	35
4.8	Avaliação das características da pomada.....	36
4.8.1	Avaliação organoléptica	36
4.8.2	Avaliação físico-química	36
4.8.3	Avaliação microbiológica	36

4.9	Delineamento experimental	37
4.9.1	Animais	37
4.9.2	Infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	37
4.9.3	Protocolo de tratamento	37
4.9.4	Acompanhamento da lesão	38
4.9.5	Eutanásia dos animais	38
4.9.6	Contagem das células peritoneais, baço, linfonodo e medula óssea	38
4.9.7	Contagem das células da orelha direita	39
4.9.8	Cultura de células do lavado peritoneal	39
4.9.9	Quantificação da carga parasitária	39
4.9.10	Imunofenotipagem das células do linfonodo, baço, peritônio e lesão	39
4.9.11	Quantificação da produção de Óxido Nítrico	40
4.9.12	Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células peritoneais	40
4.9.13	Análise histopatológica	41
4.10	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Caracterização química do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i>	42
5.2	Extrato de <i>D.ambrosioides</i> apresenta atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	44
5.3	Extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> promove morte por apoptose e necrose após exposição ao extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i>	44
5.4	Avaliação da estabilidade da pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i> a 25%	46
5.4.1	Processo de centrifugação demonstra estabilidade da pomada de <i>D. ambrosioides</i>	46
5.4.2	Teste de Avaliação Preliminar e Acelerada não identifica alterações organolépticas na pomada de <i>D. ambrosioides</i>	46
5.5	Determinação do pH da pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i>	48
5.6	Avaliação microbiológica da pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i>	48
5.6.1	Coloração de Gram das colônias isoladas do extrato e da pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i>	48
5.7	Tratamento com pomada de <i>D. ambrosioides</i> apresenta redução da área da lesão ...	49
5.8	O tratamento com pomada de <i>D. ambrosioides</i> reduz a carga parasitária no linfonodo dos animais que receberam tratamento	51
5.9	Avaliação histopatológica das lesões	52
5.10	Efeito do tratamento com pomada de <i>D.ambrosioides</i> sobre o peso dos órgãos linfóides e da orelha direita	55
5.11	Efeito do tratamento da pomada de <i>D.ambrosioides</i> e antimonial pentavalente sobre a celularidade do órgãos linfóides e orelha dos animais	56
5.12	Imunofenotipagem	57

5.13	Tratamento com pomada de mastruz e antimonial pentavalente, aumenta a produção de Óxido Nítrico	63
5.14	Efeito do tratamento com pomada de mastruz e antimonial pentavalente sobre a produção de citocinas inflamatórias	63
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÃO	73
8	REFERÊNCIAS.....	74
9.	ANEXO	91
Anexo A	Identificação botânica da espécie vegetal.....	91
Anexo B	Laudo dos componentes da pomada base.....	92
Anexo C	Protocolo CEUA/UFMA	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Grupo controle positivo de Antimonial Metilglucamina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Anexina V
BHT	Butilhidroxitolueno
BOD	Demanda Bioquímica do Oxigênio
CBA	Cytometric bead array
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
DA	Grupo experimental de <i>Dysphania Ambrosioides</i>
DAAM	Grupo com associação dos compostos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
EHDa	Extrato hidroalcólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>
EV	Endovenosa
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP	Iodeto de Propídio
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	Organização PanAmericana da Saúde
PBS	phosphate buffered saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
Sb ⁺³	antimonial trivalente
Sb ⁺⁵	antimonial pentavalente
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Números de casos notificados e confirmados de LTA nos anos de 2016 e 2017.....	04
Figura 2. Classificação do gênero <i>Leishmania</i> e descrição dos complexos fenotípicos.....	06
Figura 3. Organização estrutural das formas da <i>Leishmania</i>	08
Figura 4. Ciclo de vida da <i>Leishmania amazonensis</i>	09
Figura 5. Distribuição de casos de leishmaniose cutânea e visceral no ano de 2016 nas América.....	10
Figura 6. Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Dysphania ambrosioides</i>	33
Figura 7. Análise da viabilidade celular, por contagem de promastigotas. Contagem de células após exposição ao extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> nas concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL.....	35
Figura 8. Análise da mortalidade celular de <i>L. amazonensis</i> após exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i>	36
Figura 9. Análise da mortalidade de <i>Leishmania amazonensis</i> após exposição ao extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> , sob visualização por microscopia de fluorescência	36
Figura 10. Efeito do tratamento com a Pomada de Mastruz em lesões induzidas por <i>L. amazonensis</i>	41
Figura 11. Efeito do tratamento com a Pomada de <i>D. ambrosioides</i> em lesões induzidas por <i>L. amazonensis</i> . Média da área da lesão analisado a cada semana e em todos os grupos que receberam tratamento ou não.....	42
Figura 12. Avaliação da carga parasitária do linfonodo drenante dos camundongos que receberam tratamento ou não.....	43
Figura 13. Fotomicrografias dos cortes histológicos das orelhas infectadas após 28 dias de tratamento.....	45
Figura 14: Peso dos órgãos linfoides e da orelha dos animais que receberam tratamento.....	46
Figura 15. População de macrófagos no linfonodo cervical caracterizados por imunofenotipagem	48
Figura 16. População de Linfócitos T no linfonodo cervical caracterizados por imunofenotipagem	49

Figura 17. População de Macrófagos no lavado peritoneal caracterizados por imunofenotipagem	50
Figura 18. População de Linfócitos T no baço caracterizados por imunofenotipagem	51
Figura 19. População de Macrófagos na lesão caracterizados por imunofenotipagem	53
Figura 20. Quantificação da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais	54
Figura 21. Quantificação da produção de citocinas de células obtidas do peritônio de camundongos infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e tratados com pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i>	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas em humanos.....	11
Quadro 1. Tratamento e acompanhamento das formas cutâneas e mucosa da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	17
Tabela 2. Composição química do extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> . Análise por espectrometria de massa. Principais fragmentos do espectro obtido.....	34
Tabela 3. Análise sensorial quanto à cor, aspecto e odor das amostras da pomada de <i>D. ambrosioides</i>	38
Tabela 4. Análise microbiológica do extrato e pomada de <i>D. ambrosioides</i> cultivadas em placas de meio Ágar Mueller Hinton e Ágar Sabourand.....	38
Tabela 5. Identificação do pH das triplicatas das amostras de pomada <i>Dysphania ambrosioides</i> armazenadas em geladeira (5°C), prateleira (25°C) e estufa (37°C)	39
Tabela 6. Análise pela técnica de coloração de Gram das colônias isoladas da amostra do extrato e pomada de <i>D. ambrosioides</i>	40
Tabela 7. Escore clínico da orelha de camundongos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com pomada de <i>Dysphania ambrosioides</i>	44
Tabela 8. Escore clínico das lamina coradas com Tricrômico de Masson.....	44
Tabela 9. Contagem total de células (10 ⁶ /mL) dos animais que receberam tratamento ou não com pomada de <i>D. ambrosioides</i> e Antimonial pentavalente.....	47

RESUMO

As leishmanioses são doenças com elevada incidência e ampla distribuição geográfica. Também possuem um grande espectro de manifestações clínicas, relacionadas à espécie do parasito causador da doença. Dentre essas manifestações clínicas, estão as lesões cutâneas locais provocada pela espécie *Leishmania amazonensis*. O tratamento das leishmanioses, envolvem fármacos e outras terapias, contudo os fármacos mais utilizados possuem limitantes ao seu uso, como resistência do protozoário, alta toxicidade e o inconveniente da dor local, gerando rejeição e interrupção do uso desses medicamentos por parte dos pacientes. Essa problemática tem contribuído para o aumento de investimentos governamentais e despertado o interesse na pesquisa por alternativas terapêuticas viáveis, como a investigação farmacológica de espécies vegetais. A espécie vegetal *Dysphania ambrosioides* já possui algumas propriedades descritas na literatura como repelente, bactericida, inseticida, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante e leishmanicida. Com base nisso e visando a formulação de um fármaco à base de extrato vegetal, nosso objetivo foi avaliar o tratamento tópico com pomada de *D. ambrosioides* à 25% em lesões causadas por *Leishmania amazonensis* em modelo animal, bem como investigar *in vitro* o mecanismo de ação do extrato direto no parasito. O extrato das folhas de *D. ambrosioides* foi adicionado à uma pomada base de lanolina e vaselina. Após a manipulação da pomada, foram realizados testes físico-químicos, mensuração de pH e determinação das características sensoriais para avaliação da estabilidade preliminar e acelerada. Para o controle da qualidade microbiológica, foi realizado a contagem de microrganismos viáveis e patogênicos e coloração de Gram em colônias isoladas do extrato vegetal e da pomada manipulada. Os resultados mostraram que as amostras não tiveram alterações significativas entre os parâmetros avaliados acima, estando aptas para o uso em modelos *in vivo*. Para o ensaio *in vivo*, camundongos Balb/c receberam inóculo subcutâneo de 5×10^5 promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* na orelha direita. Na 5ª semana pós infecção, os animais foram separados em quatro grupos de 10 animais, denominados: Controle negativo (CN) tratado com 0,1mL do excipiente da pomada por 28 dias, experimental (DA) tratado com 0,1mL da pomada de *D. ambrosioides* durante 28 dias, Controle positivo (AM) recebeu via intraperitoneal o antimonial pentavalente (28 mg/kg/dia) por 15 dias e o grupo que recebeu associação dos compostos (DAAM) foi tratado simultaneamente com pomada de *D. ambrosioides* durante 28 dias e antimonial pentavalente (Sb^{+5}) (28 mg/kg/dia) via intraperitoneal durante 15 dias. Foram avaliados os parâmetros como área da lesão, carga parasitária, celularidade dos órgãos linfóides, imunofenotipagem das células do linfonodo cervical, baço, peritônio e lesão, produção de citocinas, produção de óxido nítrico e ação do extrato diretamente sobre o parasito. Os animais tratados com a pomada de *D. ambrosioides*, apresentaram redução na área da lesão, além da redução na carga parasitária. Este tratamento também induziu a produção de óxido nítrico peritoneal e aumento da produção de citocinas inflamatórias e regulatória. Além disso, foi detectada uma população de linfócitos T $CD4^+$ no baço e linfonodo, além de uma população de macrófagos ativados na lesão, caracterizando a importância dessas células no curso da doença. Portanto, a pomada de *D. ambrosioides* ratificou os resultados a respeito da capacidade inflamatória do extrato bruto de *D. ambrosioides* a partir do aumento de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, e sua capacidade imunomoduladora com a produção de IL-10 caracterizando um potencial efeito cicatrizante, com remodelamento tecidual, diminuindo assim a área da lesão tratada.

Palavras-chaves: *Dysphania ambrosioides*, *Leishmania amazonensis*, pomada de mastruz, cicatrização, leishmaniose cutânea

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases with a high incidence and wide geographical distribution. They also have a wide spectrum of clinical manifestations, related to the species of parasite that causes the disease. Among these clinical manifestations are local skin lesions caused by the species *Leishmania amazonensis*. The treatment of leishmaniasis involves drugs and other therapies, however the most used drugs have limitations to their use, such as protozoan resistance, high toxicity and the inconvenience of local pain, generating rejection and interruption of the use of these drugs by patients. This problem has contributed to the increase in government investments and aroused interest in research for viable therapeutic alternatives, such as pharmacological investigation of plant species. The plant species *Dysphania ambrosioides* already has some properties described in the literature as repellent, bactericide, insecticide, antitumor, anti-inflammatory, wound healing and leishmanicidal. Based on this and aiming at the formulation of a drug based on plant extract, our objective was to evaluate the topical treatment with *D. ambrosioides* ointment at 25% in lesions caused by *Leishmania amazonensis* in an animal model, as well as to investigate *in vitro* the mechanism of action of the extract on the parasite. The extract from the leaves of *D. ambrosioides* was added to an ointment based of lanolin and petroleum jelly. After the manipulation of the ointment, physical-chemical tests, pH measurement and determination of sensory characteristics were performed to evaluate the preliminary and accelerated stability. For the control of microbiological quality, the counting of viable and pathogenic microorganisms and Gram staining were carried out in colonies isolated from the plant extract and the manipulated ointment. The results showed that the samples had no significant changes between the parameters evaluated above, being suitable for use in *in vivo* models. For the *in vivo* trial, Balb/c mice received a subcutaneous inoculum of 5×10^5 *L. amazonensis* stationary promastigotes in the right ear. At the 5th week after infection, the animals were separated into four groups of 10 animals, named: Negative control (CN) treated with 0.1mL of the ointment excipient for 28 days, experimental (DA) treated with 0.1mL of the *D. ambrosioides* ointment for 28 days, Positive control (AM) which received the pentavalent antimonial (28 mg/kg/day) for 15 days and the group that received an association of the compounds (DAAM) was treated simultaneously with *D. ambrosioides* ointment for 28 days and pentavalent antimonial (Sb^{+5}) (28 mg/ kg/day) intraperitoneally for 15 days. Parameters such as the lesion area, parasitic load, cellularity of the lymphoid organs, cell immunophenotyping of the cervical lymph node, spleen, peritoneum and lesion, production of cytokines, production of nitric oxide and action of the extract directly on the parasite were evaluated. Animals treated with *D. ambrosioides* ointment showed a reduction in the lesion area, in addition to a reduction in parasitic load. This treatment also induced the production of peritoneal nitric oxide and increased production of inflammatory and regulatory cytokines. Moreover, a population of CD4^+ T lymphocytes was detected in the spleen and lymph node, in addition to a population of macrophages activated in the lesion, characterizing the importance of these cells in the course of the disease. Therefore, the *D. ambrosioides* ointment ratified the results regarding the inflammatory and immunomodulatory capacity of the crude *D. ambrosioides* extract from the increase in inflammatory and regulatory cytokines, increased macrophages activated at the injury site, characterizing a potential healing effect, with tissue remodeling, thus reducing the treated lesion area.

Keywords: *Dysphania ambrosioides*, *Leishmania amazonensis*, mastruz ointment, wound healing, cutaneous leishmaniasis

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença com amplo espectro clínico e uma variedade de parasitos, reservatórios e vetores envolvidos na sua transmissão. É decorrente de condições socioeconômicas mas também é influenciada por fatores ambientais e climáticos. Existem três principais manifestações clínicas da leishmaniose: cutânea (pele), mucosa (mucocutânea) e visceral (uma das formas mais graves, que afeta os órgãos internos). Dentre essas manifestações, a leishmaniose cutânea vem sendo apresentada como um grave problema de saúde pública no Estado do Maranhão.

O tratamento das leishmanioses envolve fármacos e outras terapias, onde a escolha de um determinado tratamento deverá considerar critérios como a faixa etária, presença de gravidez, comorbidades e o perfil de toxicidade das drogas. Antimoniais pentavalentes e Anfotericina B são os fármacos mais utilizados, porém a alta toxicidade, resistência dos protozoários aos medicamentos e resistência ao tratamento por parte dos pacientes, tem limitado o seu uso (BASTOS et al., 2012).

Na busca por novas alternativas para o tratamento da leishmaniose, estudos tem se concentrado em prol de pesquisas sobre compostos naturais, extraídos de plantas que são eficazes contra *Leishmania* spp. e apresentam reduzida toxicidade para hospedeiros humanos (FERREIRA et al, 2010). Neste contexto, a organização Mundial de Saúde (OMS) tem priorizado a investigação farmacológica de plantas, pois defende-se que os produtos naturais são potenciais fonte de substâncias com atividade biológica (WHO, 2011), além de seu uso ser disseminado pela cultura popular como medicamentos de fácil acesso e obtenção, principalmente em países em desenvolvimento.

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clement é uma angioesperma da Ordem Caryophyllales, família Amaranthacea e tem como sinônimo *Chenopodium ambrosioides* L. É uma espécie cosmopolita, pode crescer até um metro de altura e apresenta forte odor aromático (KLIK, 1985). Também é conhecida popularmente como mastruz e é uma espécie endêmica no Brasil e possui distribuição geográfica por todo território brasileiro (SENNA, 2015).

A espécie vegetal *D.ambrosiodes* desde muito tempo é usada pela população devido às suas propriedades terapêuticas, algumas já comprovadas cientificamente como atividade inseticida (PETERSON et al., 1989), atividade repelente (SU, 1991), bactericida (BORBA 2004), antitumoral (Nascimento et al., 2005), vermífugo (CARVALHO et al., 2005), antimicrobiana (Brito et al., 2007), anti-helmintico (ALMEIDA et al., 2009), larvicida (FARIA et al., 2010), anti-inflamatorio e cicatrizante (SÉRVIO, 2011), antifúngico (CHU et al., 2011),

antidiabético (SONG et al., 2011) e no tratamento de úlceras leishmanióticas (PATRICIO et al., 2008; MONZOTE et al., 2014; SOUSA, 2015).

O Ministério da Saúde criou uma relação de plantas de interesse do sistema único de saúde (RENISUS), na qual se encontra listada *Dysphania ambrosoides*, devido a algumas propriedades imunológicas e farmacológicas anti-*Leishmania* já descritas, bem como atividade na inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis* (BEZERRA et al., 2006), indução da ativação de macrófagos e liberação de mediadores como o peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (CRUZ et al., 2007) e uma significativa redução da disseminação da infecção por *L. amazonensis* em camundongos quando utilizada por via intra-lesional (PATRÍCIO et al., 2008).

É importante lembrar que o tratamento atual em pacientes com leishmaniose é realizado de forma injetável, porém novas vias de tratamento vem sendo estudadas, como a via tópica. A terapia tópica de úlceras leishmanióticas utilizada pela população, foi descrita por França et al. (1996), sendo assim uma alternativa de tratamento, uma vez que os compostos (possíveis indutores da toxicidade) são liberados de forma controlada, diminuindo os efeitos colaterais (OLIVEIRA, 2013).

Recentemente nosso grupo de pesquisa realizou um estudo preliminar com uma pomada composta de extrato das folhas de *D.ambrosoides* e mostrou resultados importantes referentes à formulação criada e sua atividade cicatrizante. Dentre os resultados obtidos, ressaltamos o efeito do tratamento sobre o sistema imunológico, induzindo aumento de citocinas reguladoras como IL-10 levando a redução de TNF- α , fatores importantes para o início do processo de remodelamento e cicatrização de úlceras leishmanióticas. Além disso, comprovamos pela análise histopatológica, uma acentuada cicatrização nos animais que receberam tratamento com a pomada (SOUSA et al., 2015).

Levando-se em consideração que já demonstramos a melhora das úlceras leishmanióticas em animais tratados com extrato de *D. ambrosioides* (PATRICIO et al., 2008), com pomada de *D. ambrosioides* a 5% (SOUSA, 2015) e que estudos iniciais não apontam toxicidade do mesmo em modelos murinos em concentrações mais altas (PEREIRA et al, 2010), foi proposta a formulação de uma pomada de mastruz a 25% e um protocolo terapêutico com intervalos regulares de 12 horas, a fim de investigarmos sua influência na cicatrização de úlceras leishmanióticas, sua ação sobre a carga parasitária além de analisarmos a taxa de mortalidade das formas promastigotas submetidas à ação do extrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da doença

As leishmanioses são doenças com elevada incidência e ampla distribuição geográfica nas Américas. Dados da OMS (2010) mostram que a leishmaniose é uma das doenças negligenciadas mais importantes com 350 milhões de pessoas propensas à adquiri-la, cerca de 12 milhões pessoas infectadas distribuídas em 98 países e 2 milhões de casos estimados anualmente (ALVAR et al., 2012). A leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) são endêmicas em 18 países das Américas e no período de 2001 a 2016 foram notificados 892.846 novos casos de LC, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. Ao acompanhar a evolução da Leishmaniose tegumentar americana (LTA), observa-se uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003 quando todos os Estados registraram casos autóctonos (BRASIL, 2006).

Em 2016, 17 países endêmicos reportaram 48.915 novos casos de LC e LM. Os maiores números registrados foram no Brasil (12.690), seguidos da Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.217), totalizando 74,3% do total de casos nas Américas (OPA/OMS, 2018). Em relação ao perfil do público portador da doença, a LTA ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto 67,2% das pessoas infectadas corresponde ao sexo masculino e a grande maioria são pacientes acima de 10 anos (BRASIL, 2017).

Das cinco regiões brasileiras, em 2016, o Norte notificou 5.075 casos de LTA, seguido pela região Nordeste com 3.166 casos (Figura 1A e 1B), onde o Maranhão representou 26% do total de casos do Nordeste, perdendo apenas para a Bahia que é responsável por 54% do total de casos da região (Figura 1C) (BRASIL, 2016).

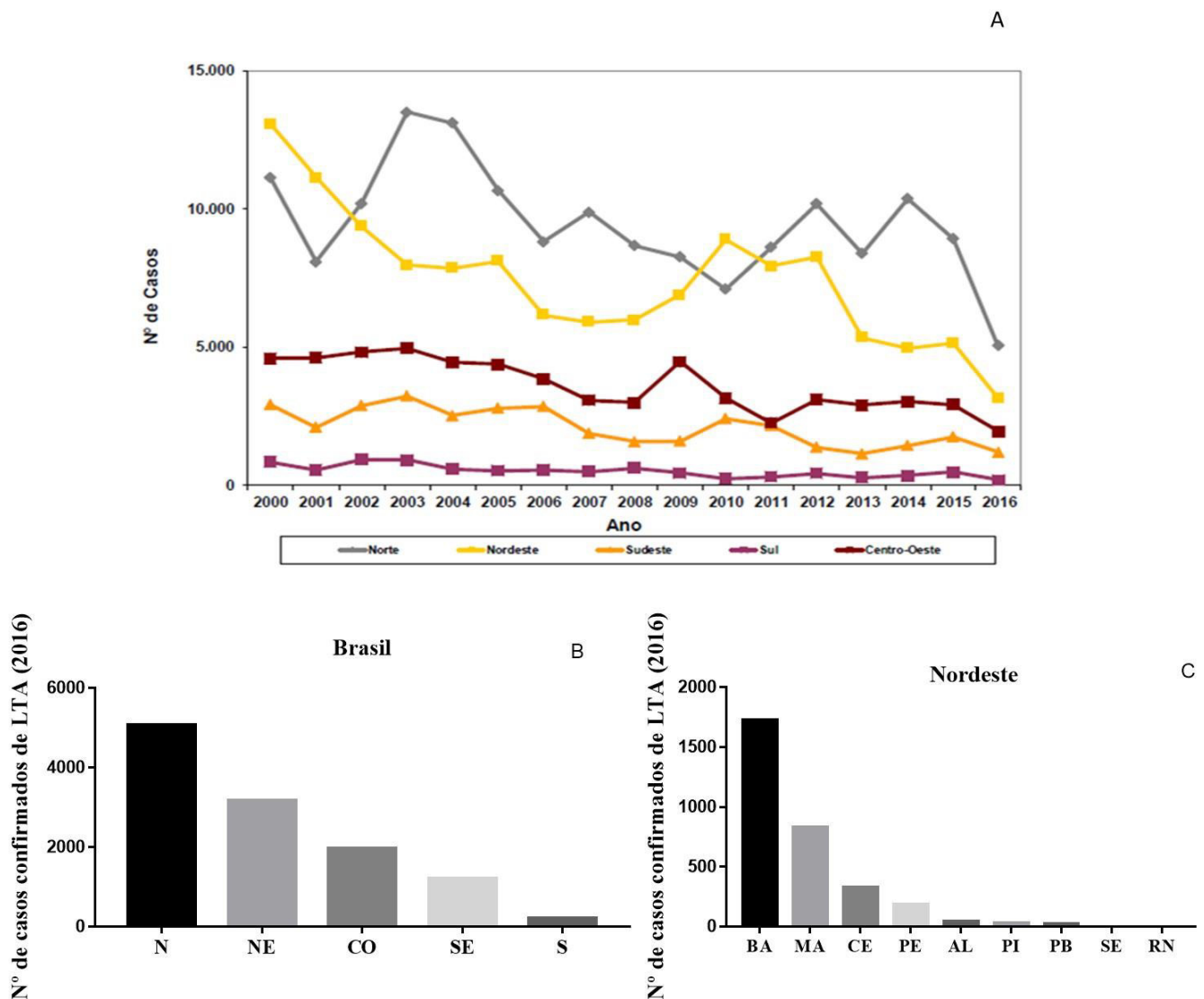


Figura 1. Números de casos notificados e confirmados de LTA nos anos de 2016 e 2017. A) Casos de LTA por regiões brasileiras, 2000 à 2016. B) Números de casos confirmados de LTA no Brasil, ano de 2016. C) Números de casos confirmados no Nordeste brasileiro, sendo o Estado do Maranhão o detentor do segundo maior número de casos de LTA. Fonte: (SVS/MS, 2016; BRASIL, 2016)

Em 2017, segundo o banco de dados do Sistema Único de Saúde do Brasil (BRASIL, 2018), o Brasil apresentou 17.983 casos notificados de leishmaniose sendo 17.044 de LC. O Nordeste continua sendo a segunda região com o maior número de casos (4.377) sendo o Maranhão detentor de 22% do total desses casos.

2.2 O gênero *Leishmania*

2.2.1 Classificação taxonômica

O protozoário causador da leishmaniose é um organismo intracelular, eucarioto, pertencente ao Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, Ordem Trypanossomatida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Figura 2) (WHO, 2010).

Inicialmente, a caracterização deste gênero foi baseada em vários critérios como características clínicas, geográficas e biológicas (FURTADO, 1994; PESSOA, 1961; LAINSON, 1972). Atualmente, as classificações seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987) que dividem o gênero *Leishmania* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Esta divisão baseia-se no tipo de desenvolvimento e proliferação da *Leishmania* no inseto vetor, na tentativa de agrupar diferentes espécies de um único gênero e morfologicamente semelhantes que no entanto, causam doenças com características diferentes. Das 30 espécies de *Leishmania* já identificadas, aproximadamente 20 espécies são responsáveis pelo desenvolvimento da doença em humanos, sendo estas espécies zoonóticas atingindo mamíferos domésticos ou selvagens (Tabela 1) (FERNANDES, 2015).

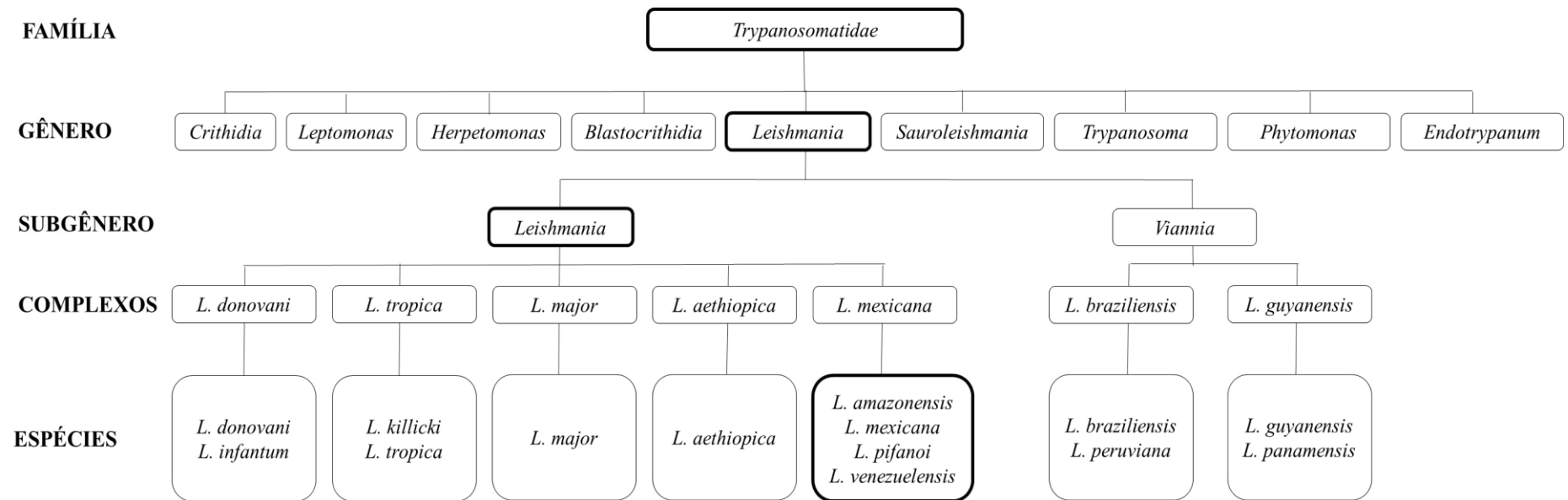


Figura 2. Classificação do gênero *Leishmania* e descrição dos complexos fenotípicos com suas respectivas espécies (Adaptado de WHO Technical Report Series 949).(WHO, 2010).

2.2.2 Parasito, Vetor e o Ciclo biológico

O protozoário do gênero *Leishmania*, se apresenta em diferentes estágios de desenvolvimento durante seu ciclo: amastigotas, promastigotas procíclicas não infectante e promastigotas metacíclicas (infectante), que se replicam por divisão binária simples em seus respectivos hospedeiros (invertebrados e vertebrados). As formas amastigotas são parasitos intracelulares obrigatórios de macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Figura 3A) e as formas promastigotas (Figura 3B), são formas infectantes ou não, extracelular e flagelada, encontradas na faringe ou no trato digestório do inseto vetor (ALEMAYEHU et al., 2017).

O parasito apresenta um ciclo de vida heteroxênico, isto é, vive alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados. O inseto vetor é o responsável pela transmissão da doença (FERNANDES, 2015). Em tempo, sobre os estágios evolutivos, as formas amastigotas são arredondadas, pouco móveis e com flagelo curto, emergindo discretamente de sua bolsa flagelar, diferentemente da forma promastigotas que apresenta um corpo alongado e um flagelo móvel emergindo da região anterior do parasito (TEIXEIRA et al., 2013).

Os vetores da leishmaniose são dípteros conhecidos como flebotomíneo, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae e ao gênero *Phlebotomus* característico da região da Europa, África e Ásia (Velho Mundo) ou do gênero *Lutzomyia*, presente na região das Américas (Novo Mundo) (STOCKDALE et al., 2013).

A transmissão da doença inicia-se durante o repasto sanguíneo quando a fêmea do flebotomíneo ingere células fagocíticas parasitadas com amastigotas, presentes no tecido do hospedeiro vertebrado. Já no intestino do vetor, as células fagocíticas se rompem liberando as amastigotas que evoluem para formas promastigotas. Ainda no intestino do vetor, ao sofrerem metaciclogênese, as formas promastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, tornando-se infectantes. A partir disso, as formas promastigotas metacíclicas migram para a faringe e cavidade bucal do inseto vetor, onde será transmitida ao hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea inocula as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva e ao serem fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, diferenciam-se em formas amastigotas. Dentro da célula, as formas amastigotas se replicam por divisão binária e ao passo que isso acontece as células infectadas se rompem liberando as formas amastigotas que parasitam novas células e podem ser novamente ingeridas pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo (Figura 4). (TEIXEIRA et al., 2013 ; BASANO et al., 2004 ; BRASIL 2017).

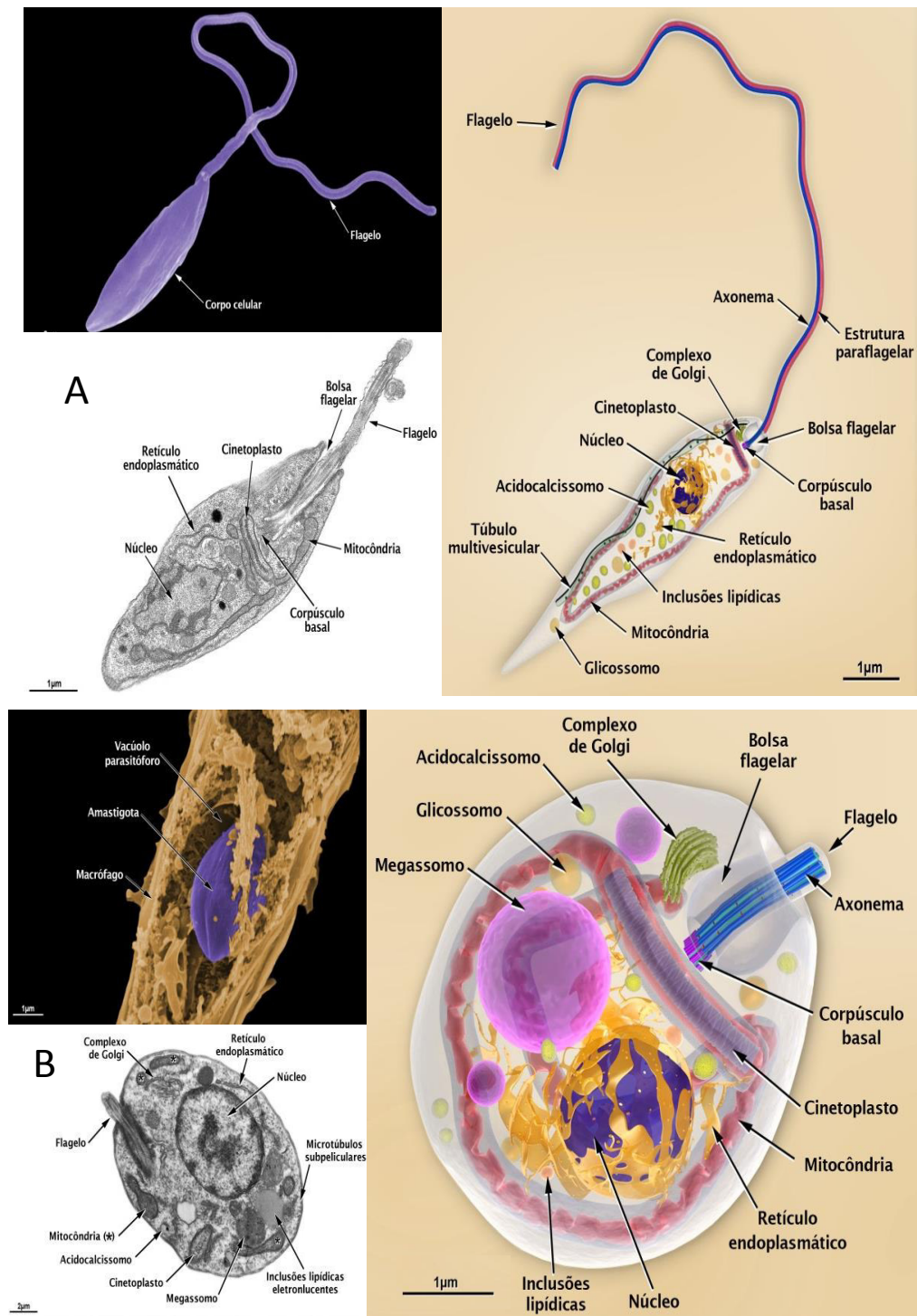


Figura 3. (A) Organização estrutural das formas promastigotas de *Leishmania* mostrando a morfologia e disposição das organelas no citoplasma. (B) Organização estrutural das formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*, mostrando sua morfologia e a disposição das organelas no citoplasma (adaptado de TEIXEIRA et al., 2013).

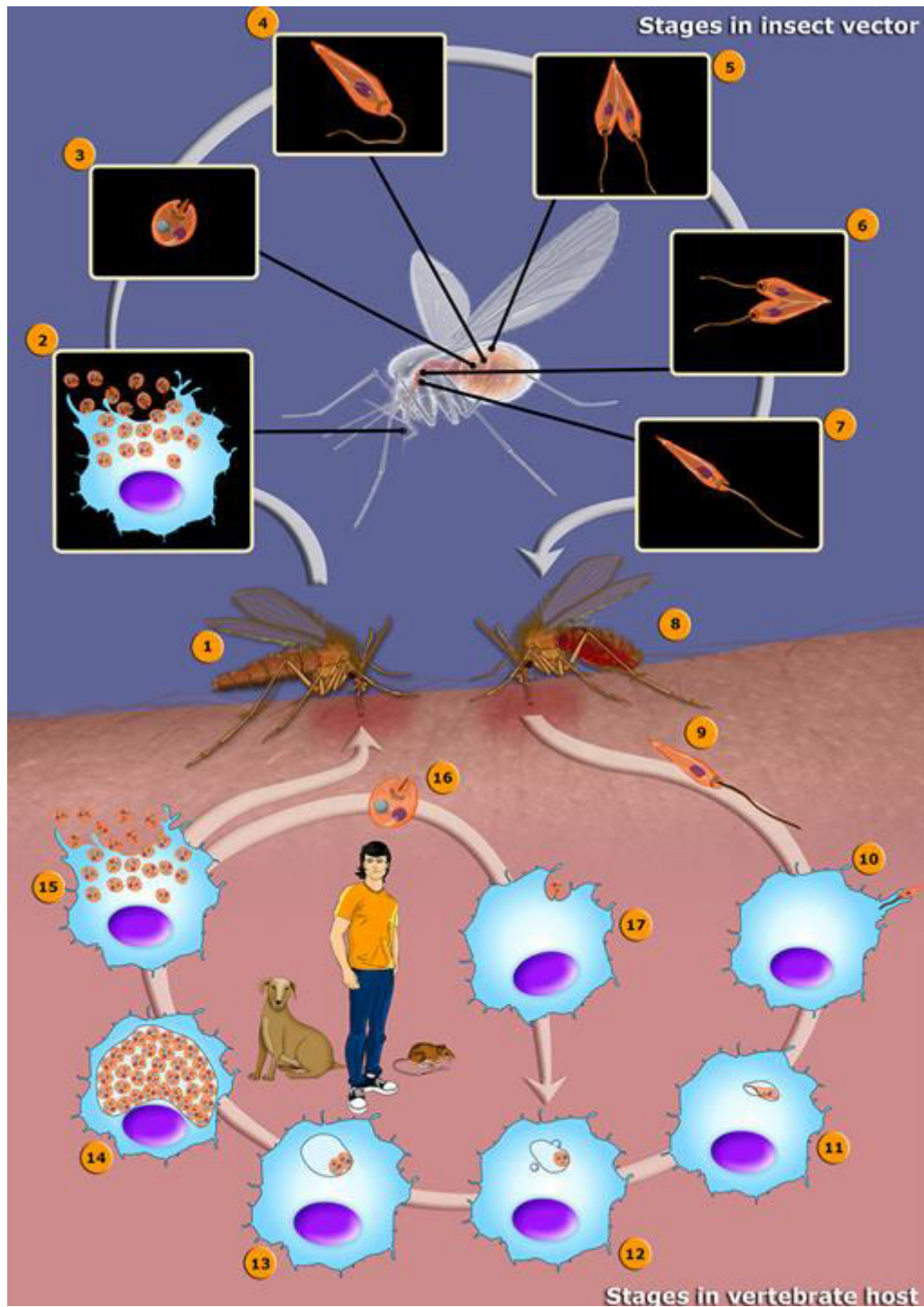


Figura 4. Ciclo de vida da *Leishmania amazonensis*. (1-2) O inseto vetor no momento do seu repasto sanguíneo ingere formas amastigotas do hospedeiro vertebrado infectado. (3-4) Estas formas diferenciam-se para formas promastigotas procíclicas que se proliferam no intestino médio. (5-6) Ao longo do intestino elas se diferenciam para formas promastigotas metacíclicas, (7) a forma que será transmitida pelo inseto durante o repasto sanguíneo. (8-9) No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos e (10-11) diferenciam-se para formas amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo. (12-14) As formas amastigotas irão se proliferar, lisar o macrófago e liberar estas formas para infectar novas células ou serem ingeridas por insetos vetores (TEIXEIRA et al., 2013).

2.3 A doença Leishmaniose

A leishmaniose, causada por protozoário do gênero *Leishmania* spp., possui um espectro de doenças infecciosas, com distribuição mundial e que apresenta diferentes manifestações clínicas que dependem da espécie do parasito e resposta imunológica do hospedeiro (VERAS et al., 2018).

É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças tropicais negligenciadas da atualidade. Dentre duas amplas categorias podemos classificar a leishmaniose com característica tegumentar e visceral. Suas manifestações clínicas classificadas como cutânea e mucocutânea, são causadas pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, e a visceral, são causadas pelas espécies *L. donovani* (Ásia e África), *L. infantum* (Ásia, Europa e África) e *L. chagasi* (Américas) (Tabela 1) (WHO, 2017).

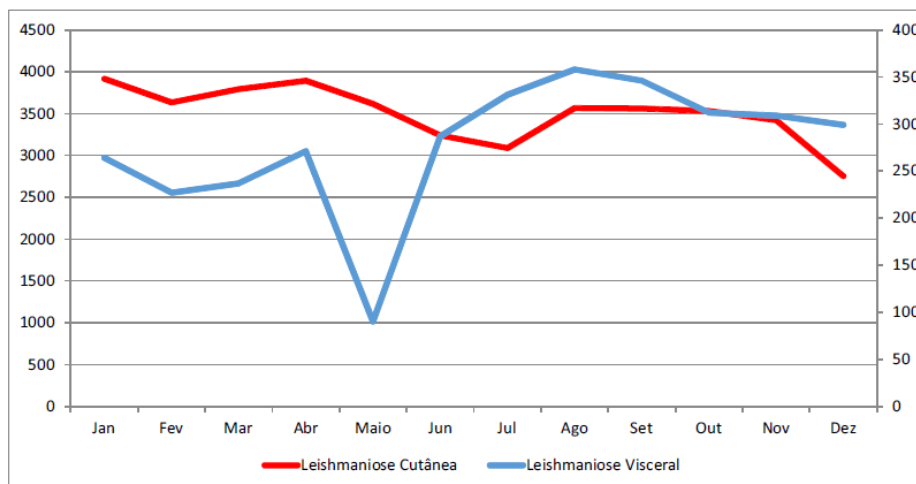


Figura 5. Gráfico de distribuição de casos de leishmaniose cutânea e visceral no ano de 2016 nas Américas. Eixo da direita refere-se ao números de casos da leishmaniose visceral. Eixo da esquerda refere-se aos números de casos de leishmaniose cutânea. (SisLeish – OPA/OMS, 2017).

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* encontradas em humanos (Adaptado de WHO Technical Report Series 949, 2010).

Subgêneros	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donavani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. killick</i> <i>L. infantum</i>		
Novo Mundo		<i>L. infantum chagasi</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo	Visceral	Cutânea	Cutânea	Mucocutânea

2.3.1 Um breve histórico

As leishmanioses já eram conhecidas desde antes do início do século XX, como um grupo de doenças dermatológicas muito semelhantes entre si e com apresentação clínica associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas e por vezes comprometendo, também a mucosa oronasal e as vísceras (RABELLO, 1925; PESSOA, 1958). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas por índios do Peru que apresentavam mutilações de lábios e narizes (LAINSON et al., 1988). Posteriormente, no mesmo território, foram descobertas corpos mumificados com lesões de pele e mucosa, características da leishmaniose (URTEAGA, 1991).

O primeiro a observar o gênero *Leishmania* foi Cunningham em 1885 na Índia ao observar formas amastigotas em casos de Calazar. Em 1855, no Brasil, Cerqueira já observara uma moléstia da pele identificando-a como botão de Biskra e quarenta anos depois, em 1895 na Itália, Breda, descreve a moléstia em italianos, provavelmente oriunda de São Paulo (BASANO et al., 2004). No Brasil, a característica leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas foi confirmada pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg durante uma epidemia em Bauru, região de São Paulo, quando este correlacionou a “úlceras de Bauru” com o “Botão do Oriente”

esta causada pela *Leishmania tropica* do Velho Mundo e descrito em 1903 por James Homer Wright (BRASIL, 2006; PESSÔA, 1982; CARINI et al., 1909). Todavia, Gaspar Vianna (1911) ao considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, denominando assim o agente etiológico da úlcera de Bauru (SILVEIRA et al., 1997).

Na década de 70, no Brasil, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento seis espécies causadoras da LTA (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MARZOCHI, 1992). A partir deste período, Lainson & Shaw (1972) propuseram uma classificação de *Leishmania* do Novo Mundo, dividindo-as no grupo *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis*. Já em 1974, os mesmos autores ainda propuseram uma nova classificação de *Leishmania*, com a adoção dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Figura 2).

2.3.2 Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) que também possui como sinônimia os nomes úlcera de Bauru, nariz de Tapir e botão do Oriente, é causada por 3 principais espécies de *Leishmania*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Seu período de incubação normalmente é de dois meses, mas pode apresentar um período de dois meses a dois anos para sua manifestação. É um tipo de doença que sua suscetibilidade é universal e a infecção não confere imunidade ao paciente (BRASIL, 2017).

A LTA pode se apresentar nas seguintes formas clínicas: cutânea (LC), disseminada (LD), mucosa (LM) e difusa (LD). A forma clínica cutânea é a mais comum da leishmaniose tegumentar representando 95% (17.983 casos confirmados e notificados) dos casos no Brasil (BRASIL, 2018). Esta, apresenta lesões indolores, com formato arredondado ou ovalado, apresentando base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, bordas delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações. A leishmaniose mucocutânea (mucosa) é uma forma progressiva da leishmaniose cutânea apresentando-se como lesão crônica. Caracteriza-se pela presença de lesões destrutivas na mucosa, em geral nas vias aéreas superiores e é causada principalmente pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (WHO, 2010; GODINHO, 2014; BRASIL, 2017).

2.3.4 Resposta Imune à Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose causa infecções que geram respostas imunes que podem ser influenciadas tanto pela genética do hospedeiro quanto pela espécie da *Leishmania* (SCOTT, 2016).

A abordagem da fisiopatologia desta doença busca compreender o mecanismo da relação parasito-hospedeiro que no momento da infecção deflagra a resposta imune específica. A compreensão desta relação é importante para garantir vacinas, fármacos e intervenções imunoterapêuticas amplamente aplicáveis (BRASIL, 2017).

Após a inoculação, as formas promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. Assim que as promastigotas são introduzidas na pele, deparam-se com algumas células do sistema imune (Linfócito T e B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) que formam basicamente o sistema imune da pele. Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores do Sistema Complemento e receptores do tipo Toll tanto na superfície do parasito como na das células do sistema imune, o parasito adere à superfície de macrófagos e células de Langerhans passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores, onde evolui para a forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (KAYE & SCOTT, 2011; GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014, BRASIL, 2017).

As formas amastigotas que se localizam dentro das células dendríticas são levadas aos linfonodos drenante. No interior dos linfonodos, as partículas antigênicas do parasitos são apresentadas às células do sistema imune. Estas, uma vez estimuladas, se dirigem ao sítio da infecção, auxiliando na formação do processo inflamatório (KAYE & SCOTT, 2011; BRASIL, 2017).

Nos macrófagos, os parasitos fagocitados se alojam no fagolisossoma, que os separa do citoplasma. Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no controle de agentes infecciosos, parasitos do gênero *Leishmania*, desenvolvem mecanismos de defesa capazes de desestruturar sua capacidade microbicida (MILLS, 2015), conseguindo assim sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura celular quando as formas amastigotas são liberadas e podem assim infectar outros macrófagos e propagar a infecção. Este processo também leva à liberação de partículas antigênicas que serão apresentadas ao sistema imune, impelindo uma resposta específica. As formas promastigotas que não forem internalizadas serão destruídas no meio extracelular pelos componentes da resposta Inata e as partículas antigênicas geradas neste processo, também poderão ser utilizadas

pelas células apresentadoras para reconhecimento antigênico. Provavelmente neste momento que a intensidade e qualidade da resposta imune são definidas, influenciando assim a evolução da doença para cura espontânea ou formas progressivas (KAYE & SCOTT, 2011; BRASIL, 2017).

A localização das amastigotas no interior dos macrófagos faz com que o controle da infecção por *Leishmania* seja mediada pela resposta imune celular, sendo esta a principal célula efetora para eliminação das amastigotas após a sua ativação por linfócitos T auxiliares (T *Helper*). Os linfócitos T ativam macrófagos por meio da secreção de Interferon-gama (IFN- γ). Esse mecanismo de eliminação das amastigotas envolve síntese de reativos intermediários de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Com isso, os macrófagos são ao mesmo tempo, células hospedeiras, apresentadoras de antígenos como também efetoras para a destruição do parasito (KAYE & SCOTT, 2011; BRASIL, 2017).

As células T *Helper* CD4⁺ tem a função de promover resposta imune adaptativa ao antígeno específico. De acordo com as citocinas que produzem após a sua estimulação antigênica, essas células podem se diferenciar em duas subpopulações: T *Helper* 1 (Th1) T *Helper* 2 (Th2). A população de células Th1 produzem IL-12, IFN- γ e TNF- α estão associadas à proteção contra antígenos intracelulares, enquanto que a população do tipo Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, e estão envolvidas nos processos alérgicos e na proteção contra agentes extracelulares. No caso das infecções por microrganismos intracelulares, a ativação das células do tipo Th2 leva ao agravamento da doença (BRASIL, 2017; FIUZA & GAZE, 2018).

Os inúmeros estudos realizados na leishmaniose murina causada pela *L. major*, foram fundamentais para o estabelecimento do chamado “paradigma Th1/Th2” quem tem servido como base para a compreensão da relação parasito-hospedeiro em diversas doenças infecciosas e parasitárias, onde também foi definido papéis protetores e nocivos para diversas citocinas (ALEXANDER, 2005).

No perfil de resposta à infecção por *Leishmania* spp., destacam-se os macrófagos que dependendo do estímulo no microambiente, podem ser ativados pela via clássica ou via alternativa, culminando na polarização de macrófagos M1 e M2, respectivamente. Os macrófagos M1 são microbicidas e principalmente envolvidos em processos inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 estão relacionados aos processos de remodelamento tecidual e cicatrização (MURRAY et al., 2014).

É importante que haja o equilíbrio entre as duas populações de macrófagos uma vez que, a ocorrência da atividade exacerbada por um destes fenótipos pode ocasionar o

desenvolvimento de doenças inflamatórias ou aumento da atividade imunossupressora por macrófagos M1 e M2 (MILLS, 2015).

Os macrófagos também são estimulados por citocinas inflamatórias que atuam de modo sinérgico na sua ativação e polarização para o perfil M1, o que potencializa sua atividade leishmanicida através da produção de óxido nítrico, que se difunde através das membranas celulares, levando à morte do parasito intracelular (SCOTT & NOVAIS, 2016). Já os macrófagos ativados pela via alternativa (perfil M2) ao serem infectados pelo parasito, promovem a progressão da infecção devido à produção de ornitinas e poliaminas, que são produtos característicos desse fenótipo pela metabolização da arginina via arginase, promovendo a proliferação pelo parasito intracelular (LIU & UZONNA, 2012).

Estudo sugere que o controle ou desenvolvimento da doença depende da relação tipo de hospedeiro-patógeno e compreender esta relação é um ponto crucial para o desenvolvimento de vacinas, drogas intervenções imunoterapêuticas eficazes (KAYE & SCOTT, 2011).

No modelo murino, o controle da infecção é determinado pela predominância da resposta imune celular com perfil Th1, envolvendo linfócitos T CD4 e as citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α e algumas quimiocinas produzidas pelos macrófagos. Com esse perfil de resposta, os macrófagos são ativados e tornam-se capazes de eliminar o parasito. Dentro desta concepção, a diminuição do número de parasitos gera uma redução do estímulo da resposta imune pelo menor aporte de antígenos. A partir do controle do processo inflamatório, aumento do número de fibroblastos e produção de fibrose, inicia-se a cicatrização (KAYE & SCOTT, 2011; BRASIL, 2017).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* spp ainda não é bem caracterizada como nos modelos murinos, devido à sua alta complexidade. Entende-se que a resistência e susceptibilidade à infecção está relacionada ao nível de expansão de células Th1 e Th2 (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002). Pacientes com a forma cutânea local, desenvolvem ativação de linfócitos Th1 na região da lesão, ao passo que a forma mucocutânea caracteriza-se pela junção de respostas do tipo Th1 e Th2, e ainda a forma difusa expressa uma resposta quase em sua totalidade Th2 (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993, PIRES et al., 2012, GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

Contudo, o fator crucial para uma resposta curativa à leishmaniose é a ativação de células capazes de produzir citocinas que levem à ativação de macrófagos pela via de IFN- γ , o que gerará a síntese de intermediários de nitrogênio e consequente morte de parasitos intracelulares (SALAIZA-SUAZO et al., 1999; KAYE & SCOTT, 2011).

2.3.5 A quimioterapia da Leishmaniose

A leishmaniose cutânea e mucosa representam formas importantes da LTA, seja pela frequência elevada (LC acima de 90% dos casos em área endêmica) ou pela agressividade clínica (LM). O objetivo do tratamento da LTA é acelerar a cura, reduzir as cicatrizes e prevenir recaídas. Sua abordagem consiste em eliminar a maioria dos parasitos por meio da quimioterapia para que, posteriormente, os mecanismos imunológicos do hospedeiro controlem os demais parasitos (DNDi, 2018).

Para o tratamento desta doença, é preconizado pelo Ministério da Saúde, o antimonial pentavalente, como a droga de primeira escolha, com exceção para os pacientes soro positivo e gestantes. Não havendo controle da doença sob esta medicação, o Ministério da Saúde indica a anfotericina B e o isotionato de pentamidina como drogas de segunda escolha (Quadro 1) (BRASIL, 2017).

Existem duas formulações de antimonias pentavalentes: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo apenas o antimoniato comercializado no Brasil. O padrão do esquema terapêutico, padronizado pela OMS, é que a dose do antimoniato de meglumina seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) por quilograma de peso corporal por dia ($mg\ Sb^{+5}/kg/dia$) (BRASIL, 2017).

Quadro 1. Tratamento e acompanhamento das formas cutâneas e mucosa da leishmaniose tegumentar americana (Adaptado, Brasil 2017).

Droga	Dose	Via	Duração	Monitoramento durante tratamento	Acompanhamento após tratamento
1ª escolha					
Antimoniato N-metilglucamina	Cutânea: 15 mg/Kg/dia (10-20mg/Sb ⁺⁵ /Kg/dia)	Endovenosa ou intramuscular	Cutânea: 20 dias	<50 anos: semanal	Mensal, por 3 meses. Não havendo resposta satisfatória, deve-se utilizar as drogas alternativas
	Mucosa: 20 mg/Sb ⁺⁵ /Kg/dia		Mucosa: 30 dias	≥50 anos: acompanhamento eletrocardiografico duas vezes por semana. Demais exames semanalmente	
Alternativas					
Anfotericina B	1 a 4mg/kg/dia	Endovenosa	Diariamente, até completar 1 a 1,5g de dose total	Diário	Mensal, por 3 meses
Isotionato de pentamidina	4mg/kg/dia, em dias alternados	Endovenoso ou Intramuscular	3 a 10 aplicações	Duas vezes por semana	

Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (Brasil, 2017) a administração do fármaco para o tratamento da LTA deve ser por via Intramuscular (IM) ou Endovenosa (EV), com repouso após a aplicação. Devido a via IM apresentar o inconveniente da dor local (um dos motivos para abandono de tratamento), recomenda-se a alternância dos locais, preferindo-se a região glútea.

Os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos, que requerem a redução do antimonial pentavalente (Sb^{+5}) a antimonial trivalente (Sb^{+3}) por ação de enzimas do parasito. Esta ativação ocorre seletivamente nas formas amastigotas mostrando que somente a enzima expressa na forma amastigota é capaz de ativar a pró-droga. Altas concentrações dos antimoniais trivalentes têm inibido o catabolismo da glicose (BERMAN et al., 1987) e a oxidação dos ácidos graxos nas formas amastigotas (BERMAN et al., 1989; GOTO&LINDOSO, 2010). Estudos ainda demonstraram que as formas amastigotas tratados com antimonial trivalente sofrem fragmentação de DNA e externalização da fosfatidilserina, indicando um possível mecanismo indutor de apoptose para destruição do parasito (SERENO et al., 2000; BRASIL, 2017).

O tratamento sistêmico com o antimonial pentavalente pode gerar um ou mais dos efeitos adversos: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Esses eventos geralmente são leves ou moderados, dificilmente exigindo a suspensão do tratamento. Porém na dose de 20 mg Sb^{+5} /Kg/dia o antimonial atinge seu limite de toxicidade gerando alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas ou renais podem indicar modificação ou interrupção do tratamento (BRASIL, 2017).

2.4 Uma alternativa para o tratamento da leishmaniose

2.4.1 *Dysphania ambrosioides* e o uso popular

Em nossa biodiversidade, as plantas medicinais são identificadas como “recursos biológicos” que tem uma potencial utilização para a humanidade (LEVEQUE, 1999). O uso de plantas medicinais como medicamento ou associado a algum tratamento prescrito, apresenta grande importância na medicina popular e se faz parte constituinte da cultura do homem. Em virtude disso, ora por seu fácil acesso, ora pelos limitantes do tratamento preconizado, cresce a busca por remédios naturais à base de plantas medicinais (MENDONÇA FILHO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2007; SOUSA et al., 2015).

O RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde) é uma listagem de plantas medicinais com potencial terapêutico a ser estudado para o desenvolvimento de medicamentos capazes de serem utilizados nos projetos de fitoterapia do SUS. Nesta lista, dentre setenta e uma espécies vegetais, temos inserido a espécie vegetal *Dysphania ambrosioides* (BRASIL, 2009).

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clement é uma angiosperma da Ordem Caryophyllales, família Amaranthaceae e tem como sinônimo *Chenopodium ambrosioides* L. É uma espécie cosmopolita, pode crescer até um metro de altura e apresenta forte odor aromático (KLIKS, 1985; LORENZI & MATOS, 2002; ALVAREZ et al., 2011). Esta espécie apresenta folhas com cinco lobos, coloração verde pálido com borda serrilhada e suas sementes são marrom com ponta chanfrada (GROZEVA & CVETANOVA, 2013). Possui preferência por solos de textura média, com boa fertilidade e suprimento moderado de água. Seu desenvolvimento é favorecido por uma boa iluminação e as plantas se tornam mais competitivas em regiões e em épocas de dias mais longos, sendo o florescimento estimulado por dias curtos (ZHANG et al., 2012). Também é conhecida popularmente como mastruz, erva de santa Maria, lombrigueira, quenopódio ou ambrosina. É uma espécie endêmica no Brasil e possui distribuição geográfica por todo território brasileiro (SENNA, 2015).

Anteriormente, o mastruz pertencia ao gênero *Chenopodium*, um grande táxon com grande variedade morfológica (BAZAN et al., 2012), mas devido a semelhanças moleculares, estudos sugeriram que a família *Amaranthaceae* incluísse a família *Chenopodiaceae* (PALMERSTON, 2011). Em se tratando de semelhanças morfológicas, o gênero *Dysphania* expandiu-se passando a compreender todos os táxons de *Chenopodium*. Esta mudança relacionada ao gênero, foi confirmada por dados moleculares e passou a ser amplamente aceita (VERLOOVE, 2013).

A espécie vegetal *D.ambrosioides* desde muito tempo é usada pela população devido às suas propriedades terapêuticas, algumas já comprovadas cientificamente como atividade inseticida (PETERSON et al., 1989), atividade repelente (SU, 1991), bactericida (BORBA 2004), antitumoral (NASCIMENTO et al., 2005), vermífugo (CARVALHO et al., 2005), antimicrobiana (BRITO et al., 2007), anti-helmintico (ALMEIDA et al., 2009), larvicida (FARIA et al., 2010), anti-inflamatório e cicatrizante (SÉRVIO, 2011), antifúngico (CHU et al., 2011), antidiabético (SONG et al., 2011), tratamento de úlceras leishmanióticas (SOUSA, 2015; MONZOTE et al., 2014; PATRICIO et al., 2008) e na supressão reversível da fertilidade masculina (AIN et al., 2018).

2.4.2 Desafios para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose

Segundo o relatório *The world medicines situation* (WHO, 2011), os produtos naturais são promissoras fontes de substâncias com atividade biológica, onde estima-se que 25% de todos os medicamentos utilizados atualmente, são derivados direta ou indiretamente de plantas. A partir disso, a investigação farmacológica de extratos vegetais utilizados em tratamento de doenças, tem sido prioridade para OMS. Países como o Brasil, Dinamarca, Gana, Japão, Noruega, Coréia e Arábia Saudita, vêm tomando medidas para regular a produção de tais produtos.

Um dos limitantes ao tratamento da leishmaniose, além da sua toxicidade devido ao tempo, é a via de aplicação. A aplicação intramuscular dos fármacos de primeira e segunda escolha, pode apresentar o inconveniente da dor local, gerando o abandono do tratamento por parte dos pacientes. Em virtude disso, novas vias de tratamento vem sendo estudadas, como a via tópica. Esta via foi descrita por França et al. (1996) onde a maioria das pessoas entrevistadas na região da Bahia, relataram o uso tópico de plantas como *Anacardium occidentale*, *Clidemia hirta*, *Plectranthus amboinicus*, *Dysphania ambrosioides*, *Solanum americanum* e *Plantago major*, em lesões leishmanióticas. Sendo assim, esta é uma alternativa de tratamento, uma vez que quando o fármaco é aplicado diretamente na pele, os compostos (possíveis indutores de toxicidade) são liberados de forma controlada, diminuindo os efeitos colaterais (OLIVEIRA, 2013). Um sistema de liberação controlada de fármacos permite uma distribuição constante da concentração da droga permitindo o aumento do índice terapêutico e da resposta imunológica, evitando efeitos colaterais adversos (BIZERRA et al., 2016).

O desenvolvimento de formulações tópicas seria um método alternativo para o tratamento de úlceras leishmanióticas ou em associação com o fármaco de primeira escolha. Os tratamentos tópicos apresentam vantagens tais como uma melhor aceitação pelo paciente, menores níveis de fármacos no plasma e menor toxicidade sistêmica (DAVID & CRAFT, 2009; MORENO et al., 2015).

Dentre os excipientes disponíveis para o tratamento tópico, temos a pomada, que é uma forma farmacêutica semissólida para aplicação na pele e mucosa. Sua formulação consiste na dispersão de um insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) que pode ser a planta seca, droga vegetal ou derivado vegetal, em uma base adequada usualmente não aquosa (ANVISA, 2018).

O tratamento da leishmaniose cutânea busca acelerar a cura e reduzir a formação de cicatrizes principalmente em locais como o rosto, prevenir a disseminação do parasita e as recidivas (AMEEN, 2010; GOTO & LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007). As

deformidades dermatológicas que essa doença provoca, gera um grave problema de sociabilização como descrito pelo Ministério da Saúde:

Uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. (BRASIL. 2017. p.12)

Alguns estudos como Sharquie et al. (2015) demonstraram a eficácia do uso de solução tópica de Podophyllin a 25% (extrato obtido de espécies da Família Berberidaceae) em pacientes com lesões causadas pela infecção com parasitos do gênero *Leishmania*, destacando assim o potencial de produtos oriundos de espécies vegetais com atividade *in vitro* em tornarem-se alternativas terapêuticas importantes.

Adicionalmente trabalhos como de Dávila-Lezama et al. (2014) também demonstraram redução da lesão e carga parasitária em camundongos infectados com *L. mexicana* e tratados com extrato obtido de planta da família Apocynaceae.

A partir disso e baseado em estudos do nosso grupo que demonstram a melhora de úlceras leishmanióticas em animais tratados com pomada de *D. ambrosioides* contendo 5mg do extrato vegetal (pomada a 5% de *D. ambrosioides*) (SOUSA, 2015) e estudos iniciais que não apontam toxicidade do mesmo extrato em modelos murinos em concentração mais altas (PEREIRA et al., 2010) foi proposto a formulação de uma pomada de *D. ambrosioides* a 25% em um protocolo terapêutico com intervalos regulares de 12 horas garantindo a biodisponibilidade do produto na área lesada simulando outros tratamentos tópicos disponíveis no mercado, esperando ao fim do tratamento, obter um produto final com atividade imunomoduladora, cicatrizante, leishmanicida de baixa toxicidade e com matéria-prima oriunda de nossa região.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o tratamento tópico com pomada de *D. ambrosioides* sobre lesões causadas por *Leishmania amazonensis* em modelo animal.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a morte celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas na presença do extrato de *D. ambrosioides*
- Formular e testar uma pomada à base do extrato vegetal de *D. ambrosioides*
- Analisar o potencial terapêutico da pomada de *D. ambrosioides* sobre lesões *in vivo*
- Avaliar a carga parasitária após tratamento com pomada de *D. ambrosioides*
- Avaliar a resposta imune considerando a produção de mediadores e citocinas dos animais tratados ou não com pomada de *D. ambrosioides*
- Caracterizar as populações de células do linfonodo, baço, peritônio e lesão, dos animais tratados ou não com *D. ambrosioides*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado em um horto particular, no Município da Raposa, Bairro Alto do Farol (S 2°27'34,6'' e W 44°08'47,5'') em Abril de 2017, por volta das 08:00h da manhã em período de estiagem de dois dias antes da coleta. O exemplar da planta recebeu identificação botânica no Herbário da Universidade Federal do Maranhão, com exsicata padrão de número 9.349.

4.2 Preparação do extrato

As partes aéreas da planta *D. ambrosioides* (L.) foram retiradas e secas em estufa a 37°C. Em seguida as mesmas foram trituradas em moinho de facas onde obteve-se 400g de pó. Este pó foi intumescido em etanol a 70%, por duas horas. O pó intumescido foi submetido ao processo de percolação em etanol a 70% durante 17 dias, período esse que varia de acordo com a quantidade de extrato e em que o líquido percolado não apresentava mais coloração (COELHO et al., 2017).

Após a percolação, o material foi levado ao rotoevaporador para remoção do solvente volátil da amostra sob os métodos de evaporação e condensação (SILVA R.C.S et al., 2013). Seguindo para a retirada da água, o material rotoevaporado foi submetido ao processo de liofilização, sendo transformado em resíduos secos para posterior incorporação à pomada base.

O rendimento total do extrato foi determinado pela fórmula: $Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100$, onde **Re**, foi o rendimento total do extrato (%), **P_{ext}**, o Peso do extrato seco (g) e **P_{folhas}** representava o peso das folhas frescas ou secas (g). A partir disso, obteve-se um rendimento total do extrato de *D. ambrosioides*, de 69% (RODRIGUES et al., 2011).

Após as etapas de preparação do extrato, o mesmo foi utilizado para os ensaios biológicos e preparação da pomada.

4.3 Caracterização química do extrato

Uma amostra do extrato de *D. ambrosioides* foi submetido à técnica FIA-ESI-IT-MSⁿ (Espectrometria de Massas por infusão direta com fonte eletronspray e analisador ion trap), que é uma ferramenta que fornece o perfil clínico de amostras complexas, além de permitir o estudo de fragmentos dessas substancias propiciando informações estruturais. Inicialmente dissolveu-se 10 mg do extrato hidroalcoólico bruto liofilizado de *D. ambrosioides*, em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1, v/v) depois de se utilizar um banho de ultrassom durante 5 minutos. As

amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm, e alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no sistema FIA-BESI-IT-MSⁿ. A infusão do fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador do tipo ion trap linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma voltagem do spray de 5,00 kV, tensão capilar de -90 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL/min. A análise completa da varredura foi registrada na faixa de m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons.

O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado, utilizando uma varredura de dados dependente nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico foi feita comparando seus tempos de retenção e espectros UV com dados da literatura (SALDANHA et al., 2013).

4.4 Manutenção dos parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia em garrafas de cultura estéreis, contendo meio Schneider (SIGMA) suplementado com Soro Fetal Bovino (GIBCO) 10% e acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C.

4.5 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *D. ambrosioides*

4.5.1 Contagem das formas promastigota

O efeito leishmanicida do extrato de *D. ambrosioides* foi avaliado através da inibição do crescimento das formas promastigotas após 24 horas de incubação em estufa B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) à 27°C. Foi realizada a contagem do número total das formas promastigotas, considerando-se a motilidade do flagelo. Foram testadas cinco concentrações, a saber 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, em triplicata, para estabelecer a concentração inibitória do crescimento parasitário (IC₅₀) (MUGANZA et al., 2016; REIS et al., 2012).

A contagem foi feita em câmara de Neubauer e microscópio óptico de luz comum, e comparada com os Controle Negativo utilizando meio Schneider (SIGMA) e as formas promastigotas, e o Controle Positivo contendo meio Schneider, formas promastigotas e 4 µg/mL de anfotericina.

4.5.2 Avaliação da mortalidade do parasito após exposição ao extrato de *Dysphania ambrosioides*

Para avaliarmos a taxa de mortalidade celular induzido pela exposição das formas promastigotas da *L. amazonensis* ao extrato de *D. ambrosioides*, os parasitos foram marcados com os corantes fluorescentes Iodeto de Propídio (IP) e a proteína Anexina V (AV) (BD Pharmingen®).

O IP penetra nas células onde a integridade da membrana está comprometida (apoptose tardia ou necrose), se combinando com ácidos nucleicos e, quando estimulado por lazer, emite fluorescência no vermelho, Cy3-Cisteína 3. Enquanto a AV se liga à fosfatidilserina exposta na superfície externa da membrana, em células que estão processo de apoptose inicial, emitindo um sinal fluorescente na faixa do verde (EGFP) (MARTIN et al.,1995; CHANDRASEKARAN et al.,2013).

As formas promastigotas, na concentração 10⁶ células/poço, foram mantidas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em placas de 96 poços na ausência ou presença do extrato vegetal. As concentrações utilizadas foram 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL por 24 horas, em estufa à 27° C. As concentrações deste ensaio, foram determinadas a partir do CI₅₀ do nosso extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* e os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante do Kit Annexin V-FITC Fluorescence Microscopy (BD Pharmingen®). Como Controle Negativo, utilizamos o meio Schneider com formas promastigotas. Para o Controle Positivo utilizamos meio Schneider, as formas promastigotas e 0,5 µg/mL de anfotericina.

Após incubação, as culturas foram lavadas em PBS (1008 RCF/10min/8°C) e, em seguida, submetidas à marcação com 10 µL de AV em 100 µL de cultura por 5 minutos. Passados os cinco minutos foi adicionado 10 µL de IP na cultura e incubado por mais 10 minutos, em seguida, foi realizado a lavagem e ressuspensas em PBS.

Para confecção das lâminas, as amostras foram distribuídas sobre lâminas de vidro e espalhadas em movimento circular com auxílio de alça bacteriológica e expostas a uma cortina de vento para secagem das amostras (OUAKAD et al.,2011). Estas foram ser seladas com mowiol e o conseguinte registro fotográfico foi realizado como análise das promastigotas nos

filtros Cy3 (vermelho) referente ao IP e EGFP (verde) referente à AV. A leitura foi realizada em microscópio invertido (Nikon, Ti-U) com aumento de 400x.

4.6 Pomada de *Dysphania ambrosioides* a 25%

Para a obtenção da pomada de *D. ambrosioides*, formulou-se uma concentração de 25% (250mg/g) do extrato hidroalcoólico liofilizado pelos métodos de homogeneização, à pomada base de lanolina e vaselina, sendo esta oriunda de um fabricante especializado e com os devidos laudos de certificado de análise de cada componente. O extrato foi dividido em três partes iguais para facilitar sua incorporação ao excipiente durante a homogeneização com o auxílio do gral e pistilo. Todo este procedimento foi realizado em ambiente estéril (FOSTER et al., 1998).

4.7 Estudos de Estabilidade da formulação farmacêutica contendo 25% de extrato hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides*

Amostras de pomada de *D. ambrosioides* a 25%, foram submetidas a diferentes rotações e em seguidas armazenadas em condições extremas de temperatura afim de acelerar mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade, sem que provocassem alterações que não ocorreriam no mercado (ANVISA, 2004).

O teste de centrifugação produz estresse na amostra aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades, sendo estas possíveis de serem observadas em forma de precipitação ou separação de fases (Anvisa, 2008). Amostras de cinco gramas da pomada de *D. ambrosioides* foram centrifugadas em tubos cônicos estéreis de 15mL, a rotações crescentes de 108, 363 e 1008 RCF (*Relative Centrifugal Force*) por 15 minutos, à temperatura ambiente (IDSON, 1993; RIEGER, 1996; ANVISA, 2008).

Para os testes de Estabilidade Preliminar e Acelerada e considerando-se a zona climática onde os produtos possam ser produzidos, comercializados e condições de transporte, foram realizadas triplicatas da pomada de *D. ambrosioides* e acondicionadas em tubos de metal de 30g, com vedação total. As amostras foram expostas a temperaturas de 37°C (estufa), 5°C (geladeira) e 25°C (temperatura ambiente), valores estes geralmente adotados para temperaturas elevadas, com acompanhamento e observação periódicas das amostras e todas as condições, ao abrigo da luz.

O teste de Estabilidade Preliminar consiste na realização de testes na fase inicial do desenvolvimento do produto. Com duração reduzida e emprego de condições extremas de temperatura, como objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes de cada

produto. Pelas condições que é conduzido, este teste não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto (ANVISA, 2004). A duração deste estudo foi de 15 dias.

O teste de Estabilidade Acelerada além de ser exposto às mesmas condições, prevê o tempo de vida útil do produto e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento e possui duração de 90 dias, podendo ser estendida por 6 meses ou até 1 ano (ANVISA, 2004).

4.8 Avaliação das características da pomada

4.8.1 Avaliação organoléptica

As características organolépticas indicam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Neste teste foram determinados os itens: aspecto, cor e odor nos tempos 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o preparo da pomada e caracterizados como: *Sem Alteração*, *Levemente modificado*, *Modificado*, *Intensamente Modificado*, *Precipitado* e *Separado* (Anvisa, 2004). Essa classificação foi determinada levando-se em consideração a formação de grumos ou alterações no odor e cor, em comparação ao aspecto inicial da amostra (Tempo Zero).

4.8.2 Avaliação físico-química

Esse tipo de avaliação é importante para pesquisar alterações visualmente não perceptíveis. As análise físico-química sugeridas pela ANVISA (2004), levam em consideração as necessidades particulares do formulador. Em virtude disso, para a avaliação da pomada de *D. ambrosioides*, foi utilizado o teste de verificação do valor de pH.

A determinação do pH foi realizada em uma dispersão de 10% (m/v) em solução salina. Foram analisadas as amostras armazenadas nas temperaturas 5°C, 25°C e 37°C e a leitura das amostras foi feita em pHmetro digital (ANVISA, 2004).

4.8.3 Avaliação microbiológica

O teste de estabilidade microbiológica foi realizado em amostras de extrato liofilizado de *D. ambrosioides*, pomada Base, pomada de *D. ambrosioides*, Tampão Fosfato (PBS - *Phosphate Balanced Salt Solution*) e Solução salina. Este teste permite verificar a ocorrência de interações entre os componentes da formulação que prejudiquem sua eficácia (ANVISA, 2008).

A técnica utilizada foi a de Contagem Microbiana, pelo método de Contagem em Placas, de acordo como descrito para Substancias Insolúveis em água (BRASIL, 2010). Para cada amostra foi feita triplicata e nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000, em salina.

As placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton utilizadas para o cultivo bacteriano, foram incubadas por 3 dias e as placas com meio Ágar Sabourand, utilizado para o cultivo de fungos, foram incubadas por 7 dias, ambas a 37°C. Ao fim deste período, foi realizado a contagem de colônias, calculando a média aritmética das placas de cada meio e o número de UFC por grama do produto (UFC/g) (BRASIL, 2010).

Posteriormente foi realizado a Técnica de Coloração de Gram para pesquisa de microrganismos patogênicos.

4.9 Delineamento experimental

4.9.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos adultos machos da linhagem BALB/c (CARDOSO et al., 2010, ABREU-SILVA et al., 2004), com idade entre 8 e 12 semanas, pesando em média 29 g, adquiridos na Unicamp - São Paulo. Os animais foram mantidos a temperatura de 21°C e umidade 65%, sob ciclos normais de claro e escuro de 12 horas e tiveram livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (Protocolo CEUA/UFMA n°23115.005550/2016-07).

4.9.2 Infecção por *Leishmania amazonensis*

Os animais foram previamente anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina 2% (16 mg/kg) e cloridrato de ketamina 5% (90 mg/kg), em um volume de 0,01mL, por via intraperitoneal e em seguida inoculados na orelha direita, via intradérmica, com 5×10^5 promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, suspensas em 10µL de solução tamponada com fosfato (PBS) estéril (OLIVEIRA & BARRAL NETTO, 2005).

4.9.3 Protocolo de tratamento

Após 5 semanas, os animais foram divididos em quatro grupos de 10 animais denominados: Controle negativo (Base) tratado com 0,1mL do excipiente da pomada por 28 dias, Grupo experimental (D.a) tratado com 0,1mL da pomada de *D. ambrosioides* durante 28 dias (Honda et al., 2010), Grupo controle positivo (Sb^{+5}) recebeu via intraperitoneal, o antimonial pentavalente (28 mg/kg/dia) por 15 dias (Patrício et. al. 2008; Godinho et. al. 2012)

e o Grupo que recebeu associação dos compostos (D.a +Sb⁺⁵) foi tratado simultaneamente com pomada de *D. ambrosioides* durante 28 dias e antimonial pentavalente (28 mg/kg/dia) via intraperitoneal durante 15 dias. Os tratamentos com a pomada foram realizados 2 vezes ao dia, com intervalo de 12 horas.

Toda a manipulação da pomada foi feita em ambiente estéril e antes do tratamento, a lesão era lavada com 1mL de PBS e seca com gaze limpa.

4.9.4 Acompanhamento da lesão

A mensuração das lesões foi realizada por planimetria digital considerando-se as medidas vertical e horizontal. Semanalmente as lesões foram registradas por meio de fotografias com câmera digital adaptada a um tripé, com distância à lesão padronizada. Seguiu-se o cálculo da área das lesões, a partir da média das medidas, utilizando a fórmula: $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde: $\pi = 3,14$; R = raio maior da lesão; r = raio menor da lesão (PRATA et al., 1988, EURIDES, 1998; MACIEL, 2007; NASCIMENTO K.A.F., 2014;).

Posteriormente, foi calculado o delta da lesão dentre as semanas. Também foram feitas observações macroscópicas a respeito do processo inflamatório (formação de crosta, edema, presença de secreção, vascularização e sinais de necrose tecidual).

4.9.5 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados por dosagem excessiva de anestésico, com 150 mg/Kg de cloridrato de Ketamina associado à 120 mg/Kg de cloridrato de xilazina, por via intraperitoneal (MACIEL et al., 2014).

4.9.6 Contagem das células peritoneais, baço, linfonodo e medula óssea.

As células peritoneais foram coletadas a partir da lavagem da cavidade, com 5mL de PBS estéril e gelado.

O baço foi removido cirurgicamente, pesado e triturado junto à 5mL de solução salina tamponada, em tamiz, com o êmbolo de seringa de 1mL. O linfonodo cervical foi retirado, pesado e macerado em 1 mL de PBS estéril. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur foi perfundido com 1mL de PBS.

As suspensões celulares foram coradas com Cristal violeta ($p < 0,05\%$ em ácido acético 30%) para a realização da contagem do número total de células (MACHADO et al., 2012).

4.9.7 Contagem das células da orelha direita

As amostras de lesão da orelha foram coletadas em tubo Falcon com meio RPMI completo com antibiótico Gentamicina (50 µg/mL) e refrigeradas. Posteriormente, as amostras foram pesadas em placa de Petri e cortadas em partes menores com auxílio de bisturi. Os fragmentos foram adicionado ao meio RPMI (5 mL/g de tecido) e suplementado com collagenase (0.056 mg/mL). A solução foi mantida em banho-maria, sob agitação, por 2 horas (CHAUX et al., 1996; ANSELMO et al., 2005; SANTOS et al., 2010). Após este período, a suspensão foi lavada e centrifugada para a contagem total de células em câmara de Neubauer em microscópio óptico de luz comum.

4.9.8 Cultura de células do lavado peritoneal

Após contagem e quantificação, as células peritoneais foram incubadas na concentração de 2×10^6 /mL em placa de 96 poços de fundo chato. As células foram divididas em grupos que não receberam estímulo e que foram reestimuladas com extrato de *D. ambrosioides* (250 µg/mL). Em seguida, foram incubadas por 24 horas para obtenção do sobrenadante da cultura para realização dos ensaios de dosagem de óxido nítrico e quantificação de citocinas.

4.9.9 Quantificação da carga parasitária

A carga parasitária foi estimada pelo ensaio de Diluição Limitante (BUFFER et al., 1995) em amostras do linfonodo cervical de todos os grupos que receberam tratamento.

Os linfonodos foram macerados e homogeneizados em meio PBS estéril (1mL). A partir desse homogeneizado celular, foram realizadas 12 diluições de 1:10 em placa de 96 poços contendo meio Schneider, seguido de incubação por 7 e 14 dias quando após esses períodos, a placa foi examinada em microscópio invertido. O título final foi a última diluição contendo pelo menos um parasito viável.

Para o cálculo da carga parasitária o último título positivo de cada animal foi dividido pelo peso do órgão. O valor obtido foi multiplicado pela recíproca da fração do órgão homogeneizado no primeiro poço. O número de parasitos foi transformado e expresso em escala logarítmica (PATRÍCIO et al., 2008).

4.9.10 Imunofenotipagem das células do linfonodo, baço, peritônio e lesão

As populações de células do linfonodo drenante (cervical), do baço, do peritônio e da orelha, foram caracterizadas por imunofenotipagem. Para tanto, as células foram marcadas com seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 e anti-CD14

conjugados com FITC, anti-CD28, anti-CD86 e anti-CD80 conjugado com PE e anti-CD4, anti-CD8 e iNOS conjugados com PercP.

Para identificação de macrófagos, foi analisada a população de CD14⁺ de maior complexidade (SSC - *Side Scatter*) e a partir desta população foi feito o quadrante para avaliar a dupla marcação iNOS/CD80 ou iNOS/CD86 (BD Biosciences Pharmingen).

Para marcação de linfócitos, foi estabelecido um gate a partir da morfologia de menor tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e complexidade (SSC). Desta população foi avaliada a população CD3⁺ para isolar Linfócitos T e a partir dessa população de linfócitos detectados, identificamos o perfil de Linfócito T CD4 ou CD8 e CD28⁺ para verificar a sua ativação (BD Biosciences Pharmingen).

Após protocolo de fenotipagem, realizado conforme orientação do fabricante, as amostras foram lidas por citometria de fluxo (BD FACSCalibur – BD Biosciences) e os dados analisados com o programa FlowJo (TreeStar).

4.9.11 Quantificação da produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico foi quantificado de forma indireta por meio da medida de nitritos nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais, segundo o ensaio descrito por Ding et al., (1988).

Dessa forma, 50 µL do sobrenadante da cultura foram adicionados à 50 µL do reagente de Griess em placa de 96 poços e incubada por 10 minutos ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro a 540nm e os valores obtidos foram analisados com base numa curva de concentração. O grupo controle, foi composto por macrófagos obtidos de animais sem infecção, denominado Sadio.

4.9.12 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células peritoneais

Para a quantificação das interleucinas, 6 (IL-6), 10 (IL-10), 12 (IL-12), Interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), foi utilizada a técnica de CBA (Citometria de esferas ordenadas). Os reagentes utilizados foram provenientes do “Mouse Inflammation Cytokine Kit” obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA) e os procedimentos foram realizados conforme protocolo e recomendação do fabricante.

Após a leitura dos padrões e das amostras, realizada no FACSCalibu (BD, USA), os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

4.9.13 Análise histopatológica

Após a eutanásia, as orelhas de cinco exemplares de cada grupo de animais escolhidos aleatoriamente, foram coletadas e armazenadas em formol a 10% para posterior confecção das lâminas. As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968) e a análise, realizada pelo patologista, foi feita sem identificação dos grupos.

Os parâmetros analisados foram: infiltrado celular, extensão da lesão, quantidade de células parasitadas, edema, colágeno, acantose e necrose.

O sistema de escore utilizado para caracterizar os parâmetros analisados foi determinado da seguinte forma: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso (CHARRET et al., 2013). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Para a caracterização da presença de colágeno foi realizada a coloração de Tricrômico de Masson que permite diferenciar o colágeno de outras estruturas, com a coloração azul.

4.10 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Siminov. Em seguida realizou-se teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA), com pós teste de Bonferroni, para variáveis paramétricas ou teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns, para variáveis não paramétricas. Os resultados referentes à concentração inibitória do crescimento parasitário (IC₅₀), foram calculados por regressão linear. Em todas as análises foi considerado como significativo $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química do extrato de *Dysphania ambrosioides*

Conforme cromatograma de íons totais do extrato hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* (Figura 6) identificou-se picos cromatográficos adquiridos através da técnica de LC-ESI-IT-MS e a partir desses, foi feita a identificação das estruturas correspondentes aos picos das análises dos fragmentos gerados pela espectrometria de massas.

Dentre os dezesseis compostos identificados, a maioria foi caracterizado com flavonóides do tipo quercetina e kaempferol (Tabela 2).

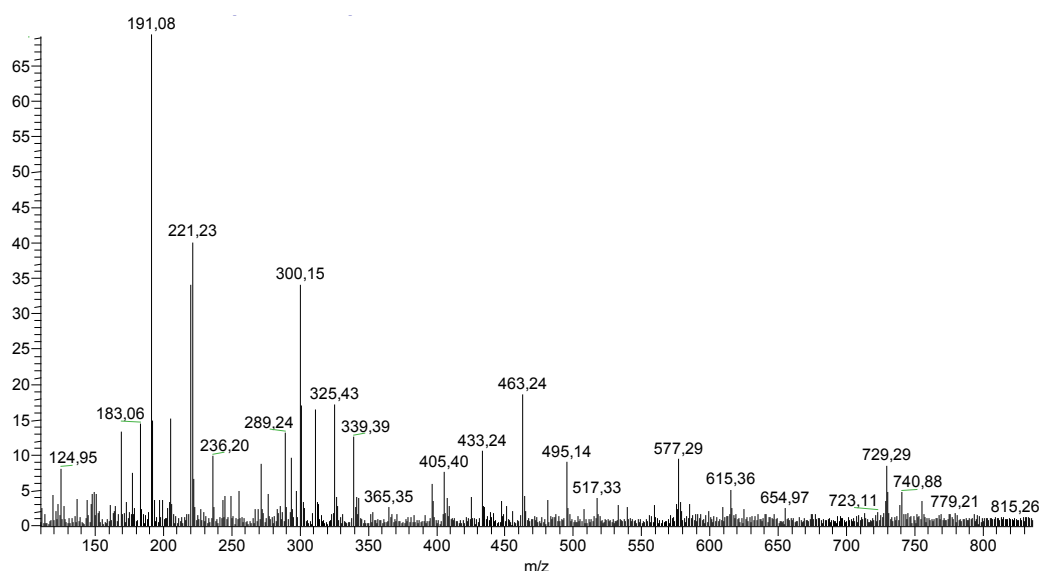


Figura 6: Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides*. Fonte: A autora (2017)

Tabela 2. Composição química do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*.
 Análise por espectrometria de massa. Principais fragmentos do espectro obtido.
 *(**M-H**⁺): massa do composto subtraindo um H⁺, **MS**ⁿ: Íon filho.

(M-H ⁺)	MS ⁿ	Compostos
191	173, 127, 85	Ácido quínico
193	135	Ácido glucorônico
285	257	Kaempferol
295	163	Ácido <i>p</i> -coumaroil-xilose
301	285, 267, 241, 173	Hesperetina
431	285	Kaempferol-3- <i>O</i> -alfa-L-raminosídeo
463	301	Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo
563	431, 285, 151	Kaempferol- <i>O</i> -ramosídeo-pentosídeo
579	447, 285	Quercetina <i>O</i> -raminosídeo-pentosídeo
579	447, 301	Naringin
593	285	Kaempferol-3-Glucosídeo-3 " - Rhamnosídeo
595	301, 151	Quercetina-3- <i>O</i> -arabinoglucosídeo
609	463, 301	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo
623	447, 301	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo
739	593, 285	Kaempferol-3-Glicosídeo-2 " - Rhamnosídeo-7-Rhamnosídeo
725	285	Kaempferol- <i>O</i> -pentosídeo-ramnosídeo-hexosídeo

5.2 Extrato de *D.ambrosioides* apresenta atividade leishmanicida *in vitro*

A avaliação do extrato de *D.ambrosioides* mostrou que este extrato possui atividade leishmanicida com IC₅₀ de 250 µg/m (Figura 7).

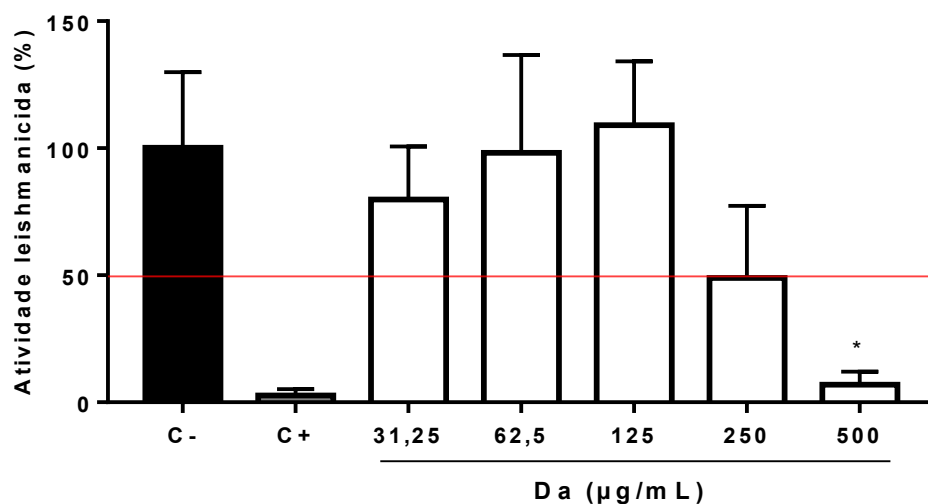


Figura 7. Viabilidade celular das formas promastigotas após exposição ao extrato de *D.ambrosioides* por 24 horas. Foi realizada a contagem do número total das formas promastigotas, considerando a motilidade do flagelo, após exposição às concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL. (*) Indica $p < 0,05$ entre o Controle negativo.

5.3 Extrato de *Dysphania ambrosioides* promove morte por apoptose e necrose após exposição ao extrato de *Dysphania ambrosioides*

Para análise da mortalidade celular pela exposição ao extrato de *D. ambrosioides*, as formas promastigotas foram marcadas com Anexina (AV) e Iodeto de Propídio (IP) para identificar as células apoptóticas e as células necróticas, respectivamente. Para quantificar a morte do parasito, foram consideradas as células duplamente marcadas.

As concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle negativo (Figura 8).

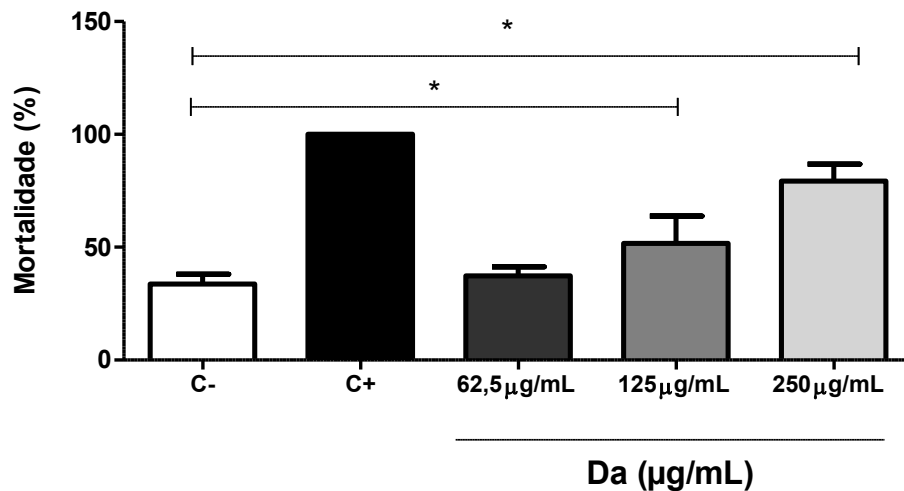


Figura 8. Análise da mortalidade celular de *L. amazonensis* após exposição a diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides*. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram expostas ao extrato de *D. ambrosioides* nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, em cultura axênica no período de 24 horas. Como Controle Negativo, utilizamos o meio Schneider com formas promastigotas. Para o Controle Positivo utilizamos meio Schneider, as formas promastigotas e 0,5 µg/mL de anfotericina. As formas promastigotas foram marcadas com anexina V e iodeto de propídeo (Kit Annexin V-FITC Fluorescence Microscopy (BD Pharmingen®). Quantificadas em microscópio óptico (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) com auxílio do programa NIS-Elements advanced research (Nikon Corporation®, Japão).

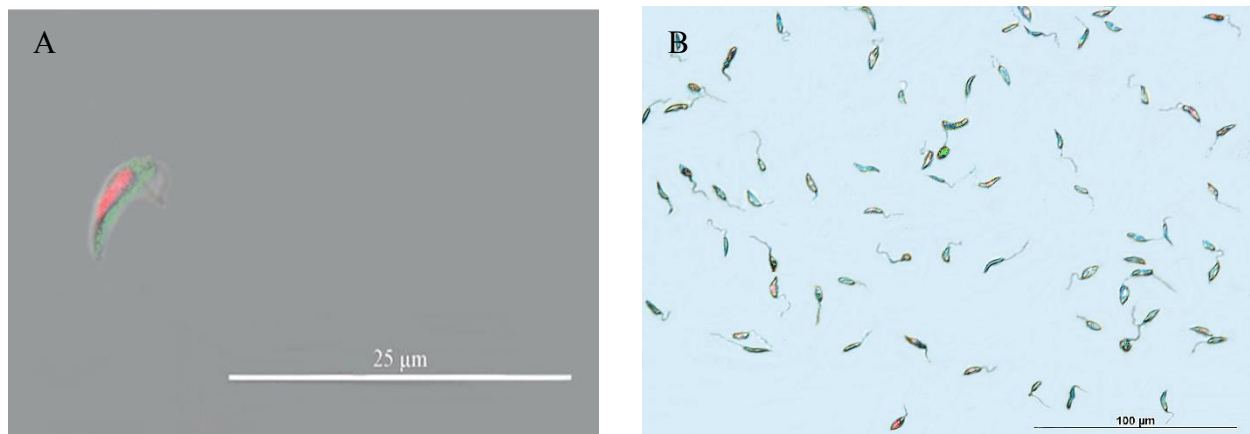


Figura 9: Análise da mortalidade de *Leishmania amazonensis* após exposição ao extrato de *Dysphania ambrosioides*, sob visualização por microscopia de fluorescência.. A) Forma promastigota de *L. amazonensis* em sobreposição de imagem, filtro (DIC) e filtro (Cy3), aumento de 1000x. B) A) Forma promastigota de *L. amazonensis* em sobreposição de imagem, filtro (DIC) e filtro (Cy3), aumento de 1000x. B) Formas promastigotas de *L. amazonensis* em sobreposição de imagem, filtro (DIC) e filtro (Cy3), aumento de 200x.

5.4 Avaliação da estabilidade da pomada de *Dysphania ambrosioides* a 25%

5.4.1 Processo de centrifugação demonstra estabilidade da pomada de *D. ambrosioides*

Após ser submetida ao processo de centrifugação por diferentes rotações, a pomada de *D. ambrosioides*, não apresentou separação de fases entre os seus compostos, mostrando-se estável nesse processo.

5.4.2 Teste de Avaliação Preliminar e Acelerada não identifica alterações organolépticas na pomada de *D. ambrosioides*

Para avaliar possíveis reações entre os componentes da pomada de mastruz e prever o tempo de vida útil do produto, foram realizados os testes de Avaliação Preliminar e Acelerada além da observação das características organolépticas.

A pomada de mastruz não apresentou alterações organolépticas exceto no item Aspecto que mostrou leve modificação, com a formação de pequenos grumos, após o sexagésimo dia de observação macroscópica (Tabela 3)

Tabela 3. Análise sensorial quanto à cor, aspecto e odor das amostras da pomada de *D. ambrosioides* quando armazenadas em geladeira, temperatura ambiente e estufa.

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DA POMADA DE <i>D.ambrosioides</i>																					
Tempo de armazenamento	COR							ASPECTO							ODOR						
	T ₁	T ₇	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₉₀	T ₁	T ₇	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₉₀	T ₁	T ₇	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₉₀
Geladeira (5°C)	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Temperatura ambiente (25°C)	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Estufa (37°C)	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	LM	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

***Legenda:** SA=Sem Alteração; LM=Levemente modificado; M=Modificado; LM=intensamente Modificado; P=Precipitado S=Separado.

Tabela 4. Análise microbiológica do extrato e pomada de *D. ambrosioides*, cultivadas em placas de meio Ágar Mueller Hinton e Ágar Sabourand. Os valores determinados estiveram abaixo do recomendado pela RDC N°481(ANVISA, 1999).

Microrganismos	Amostras	Recomendação	Resultados
Bactérias aeróbicas	Extrato de <i>D. ambrosioides</i>	5x10 ³ UFC/g	0,3x10 ³ UFC/g
	Pomada de <i>D. ambrosioides</i>	5x10 ³ UFC/g	2x10 ³ UFC/g
Fungos e leveduras	Extrato de <i>D. ambrosioides</i>	5x10 ³ UFC/g	0,3x10 ³ UFC/g
	Pomada de <i>D. ambrosioides</i>	5x10 ³ UFC/g	0,8x10 ³ UFC/g

*UFC/g: unidade formadora de colônias por grama.

5.5 Determinação do pH da pomada de *Dysphania ambrosioides*

A análise do pH das amostras foi realizada em um pHmetro digital. Suas médias e os desvio padrão são apresentados na Tabela 5, onde mostra que todas as amostras submetidas a diferentes condições, apresentaram comportamento relativamente estável de pH, onde a variação ocorrida foi entre 5,8 e 5,9.

Tabela 5. Identificação do pH das triplicatas das amostras de pomada *Dysphania ambrosioides* armazenadas em geladeira (5°C), prateleira (25°C) e estufa (37°C). Os dados foram apresentados (media $\pm$ o desvio padrão).

Amostras	Análise em pHmetro digital
Geladeira	5,92 $\pm$ 0,07
Prateleira	5,87 $\pm$ 0,02
Estufa	5,90 $\pm$ 0,06

5.6 Avaliação microbiológica da pomada de *Dysphania ambrosioides*

Após as amostras do extrato liofilizado de *D. ambrosioides*, pomada base (excipiente da pomada de mastruz), pomada de *D. ambrosioides*, Tampão Fosfato (PBS) e solução salina serem cultivadas em placas com ágar Mueller-Hinton e ágar Sabourand, apenas as amostras do extrato e da pomada de *D. ambrosioides*, apresentaram crescimento de colônias. Contudo, os valores determinados estiveram abaixo dos que são preconizados pela RDC nº 481 (Anvisa, 1999) e seguem descrito na Tabela 4.

5.6.1 Coloração de Gram das colônias isoladas do extrato e da pomada de *Dysphania ambrosioides*

A partir do crescimento de colônias isoladas, estas foram coletadas e submetidas à Coloração de Gram para pesquisa de bactérias patogênicas, quando não foi detectado crescimento de cepas patogênicas descritas como não recomendada pela Farmacopéia (2010), conforme Tabela 6. As cepas que cresceram nas culturas contendo extrato e pomada de mastruz apresentaram características bacilar gram-positiva.

Tabela 6. Análise pela técnica de coloração de Gram das colônias isoladas da amostra do extrato e pomada de *D. ambrosioides*. Os resultados da coloração de Gram mostraram que não foram identificados microrganismos patogênicos citados pela Farmacopeia.

Coloração GRAM	Morfologia	Microrganismos	Recomendação	Resultados
Negativo	Bacilo	<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
Negativo	Bacilo	<i>Salmonella sp.</i>	Ausência	Ausente
Positivo	Cocos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
Negativo	Bacilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente

Com base nos dados de monitoramento da estabilidade da pomada de *D. ambrosioides*, da baixa carga microbiana oriunda da espécie vegetal e da não detecção de espécies bacteriana patogênicas determinada pela técnica de Gram, a pomada de *D. ambrosioides* foi considerada apta para o uso e prosseguiu-se os testes *in vivo*.

5.7 Tratamento com pomada de *D. ambrosioides* apresenta redução da área da lesão

Para acompanhar o desenvolvimento da lesão nos animais, a mesma foi mensurada semanalmente durante todo o tratamento e registradas por fotografia. Foi observado na primeira semana um aumento da área da lesão em todos os grupos, com aumento significativo para o grupo tratado com pomada de *D. ambrosioides* e associação de compostos, quando comparados ao grupos tratado com antimonial (Figura 10A). A partir da segunda semana, todos os grupos passaram a apresentar redução da área da lesão (Figura 10B, 10C). Já na quarta semana, observou-se aumento da área da lesão em todos os grupos, exceto no grupo de *D. ambrosioides* (Figura 10D). Ao acompanhar o desenvolvimento da lesão entre as quatro semanas, observou-se que o grupo tratado com pomada de *D. ambrosioides*, apresentou redução significativa da área da lesão, entre a segunda e quarta semana de tratamento (Figura 11).

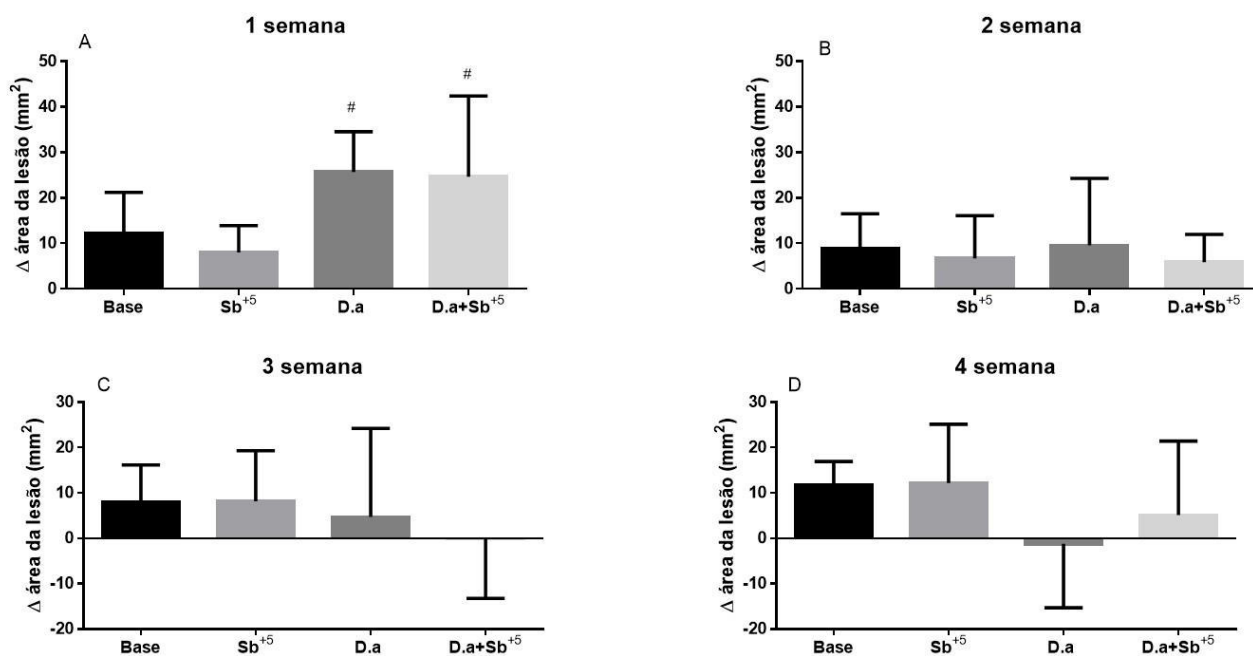


Figura 10. Efeito do tratamento com a Pomada de *D. ambrosioides* em lesões induzidas por *L. amazonensis*. As lesões foram mensuradas semanalmente com auxílio de um paquímetro digital. Foram feitas as medidas do diâmetro vertical e horizontal, onde foi calculada o delta da área da lesão utilizando a média aritmética das duas medidas. A) Primeira semana de tratamento; B) Segunda semana de tratamento; C) Terceira semana de tratamento; D) Quarta semana de tratamento. **Grupo Base:** Tratado com pomada base. **Grupo Sb⁺₅:** grupo tratado com antimonial pentavalente. **Grupo D.a:** tratado com pomada de mastruz. **Grupo D.a + Sb⁺₅:** grupo tratado com associação de compostos.

(*) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com pomada base. (#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺₅.

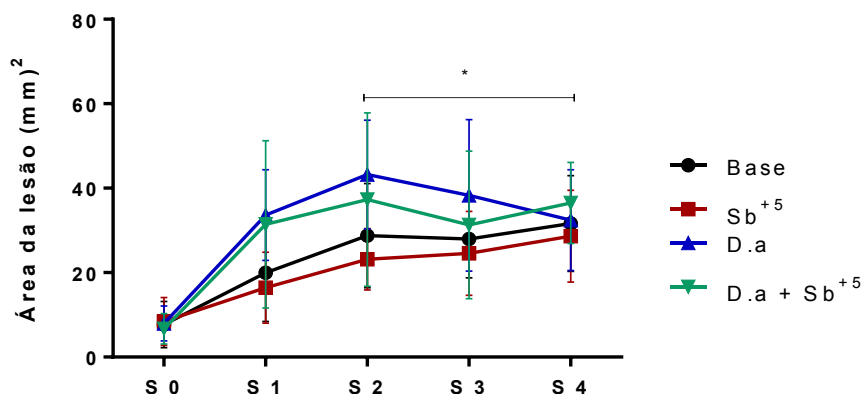


Figura 11. Efeito do tratamento com a Pomada de *D. ambrosioides* em lesões induzidas por *L. amazonensis*. Média da área da lesão analisado a cada semana e em todos os grupos que receberam tratamento ou não.

(*) Indica $p < 0,05$ em relação a segunda e quarta semana, no grupo tratado com pomada de mastruz (D.a).

5.8 O tratamento com pomada de *D. ambrosioides* reduz a carga parasitária no linfonodo dos animais que receberam tratamento

O ensaio da Diluição Limitante demonstrou uma redução da carga parasitária no linfonodo cervical ao identificar menor quantidade de formas viáveis de promastigota na cultura de sete (Figura 12A) e quatorze dias (Figura 12B), dos grupos tratados com pomada de mastruz e associação de compostos, quando comparados ao grupo que recebeu tratamento com antimonial pentavalente (Sb^{+5}).

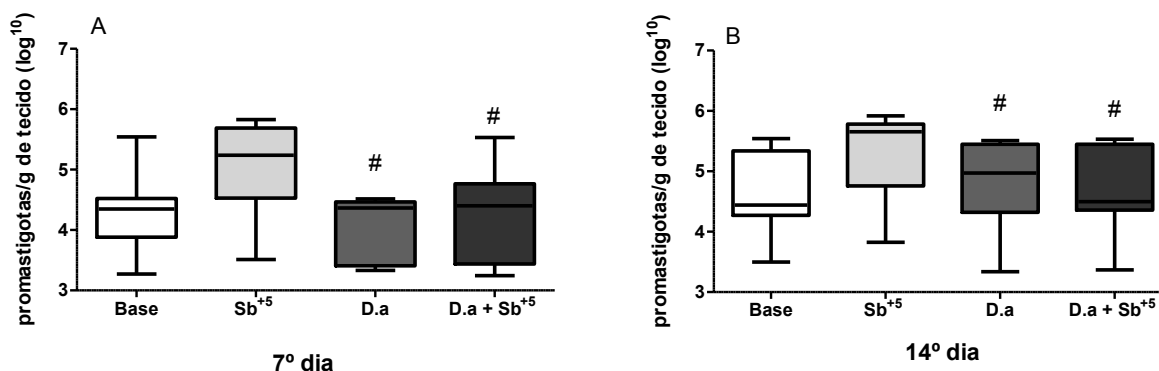


Figura 12. Avaliação da carga parasitária do linfonodo drenante dos camundongos que receberam tratamento ou não. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺₅), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺₅). Estes animais tiveram linfonodo cervical retirado, pesados, macerados e homogeneizados e realizada 12 diluições em placas de 96 poços para avaliação da carga parasita no 7º (A) e 14º (B) dia após o fim do tratamento. (#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺₅

5.9 Avaliação histopatológica das lesões

Para determinar a abrangência das lesões histológicas que ocorreram na orelha direita dos animais infectados e tratados, além de outros parâmetros que permitam caracterizar um processo inflamatório, foram feitas lâminas com o material coletado e corado com hematoxilina e eosina. Os parâmetros analisados indicaram alterações histopatológicas variadas nos diferentes grupos.

Após avaliação histopatológica no 30º dia de tratamento, o grupo tratado com pomada de mastruz, demonstrou aumento do infiltrado celular quando comparado ao grupo tratado com antimonial. Este mesmo grupo também apresentou a menor área da lesão e aumento do edema, em relação ao grupo tratado com pomada base. Em relação ao número de células parasitadas, o grupo tratado com associação de compostos, apresentou diminuição em relação ao grupo tratado com pomada base (Tabela 7).

Tabela 7. Escore clínico da orelha de camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* e com os diferentes tipos de tratamento. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb^{+5}), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb^{+5}).

ESCORE	Base	Sb^{+5}	D.a	D.a + Sb^{+5}
Infiltrado	$2,8 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,4$	$3 \pm 0^{\#}$	$2,4 \pm 0,5$
Extensão da lesão	3 ± 0	$2,4 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,4^*$	$2,4 \pm 0,5$
Célula parasitada	$2,9 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,8^*$
Edema	$0,6 \pm 0,8$	$1,8 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,5^*$	$2 \pm 0,7$
Acantose	$0,4 \pm 0,5$	ND	1 ± 1	$1 \pm 0,7$
Necrose	$2,2 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,5$	2 ± 0	$1,6 \pm 0,5$

(*) Indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com pomada base.

(#) Indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com Sb^{+5} .

A coloração de Tricrômico de Masson, foi utilizada para identificação da deposição de colágeno no espaço da lesão caracterizando o processo de reestruturação do tecido. O grupo tratado com pomada de mastruz, apresentou aumento na deposição de colágeno em relação ao grupo tratado com antimonial (Tabela 8).

Tabela 8. Escore clínico das lâminas coradas com Tricrômico de Masson. Identificação da deposição de colágeno nos grupos tratados. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb^{+5}), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb^{+5}).

ESCORE	Base	Sb^{+5}	D.a	D.a + Sb^{+5}
Colágeno	$1,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,5^{\#}$	$1,6 \pm 0,5$

(#) Indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com Sb^{+5} .

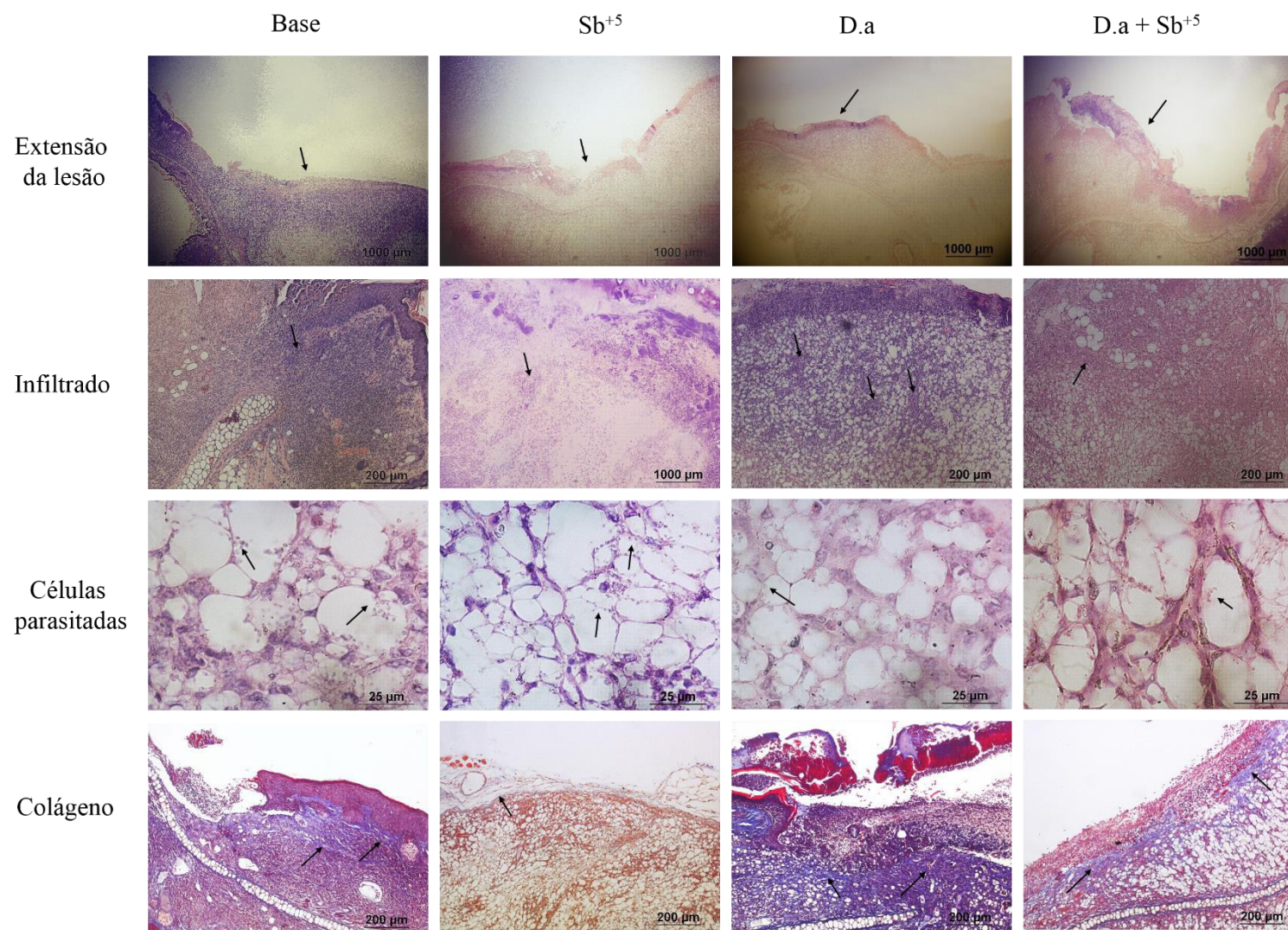


Figura 13. Fotomicrografias dos cortes histológicos das orelhas infectadas após 28 dias de tratamento. Os parâmetros Extensão da lesão, Infiltrado celular e células parasitadas, foram corados com hematoxilina e eosina. Para identificação do colágeno, as lamínas foram coradas com Tricrômio de massom. Nas colunas estão dispostos os grupos, e nas linhas estão dispostos os parâmetros de análise.

5.10 Efeito do tratamento com pomada de *D.ambrosioides* sobre o peso dos órgãos linfóides e da orelha direita

Ao final das quatro semanas de tratamento, os grupos tratados com pomada de *D.ambrosioides* e associação de compostos, apresentaram aumento no peso do linfonodo cervical quando comparados ao grupo que recebeu tratamento com o antimonial pentavalente (Figura 14A).

No baço, o grupo tratado com pomada de *D.ambrosioides* apresentou aumento de peso do órgão, em relação aos controles positivo e negativo (Figura 14B).

Em relação ao peso da orelha dos animais, o grupo Sb^{+5} e o grupo D.a, apresentaram aumento no peso quando comparado ao grupo com tratamento com a pomada base e houve diminuição no peso do grupo tratado com associação dos compostos em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente (Figura 14C).

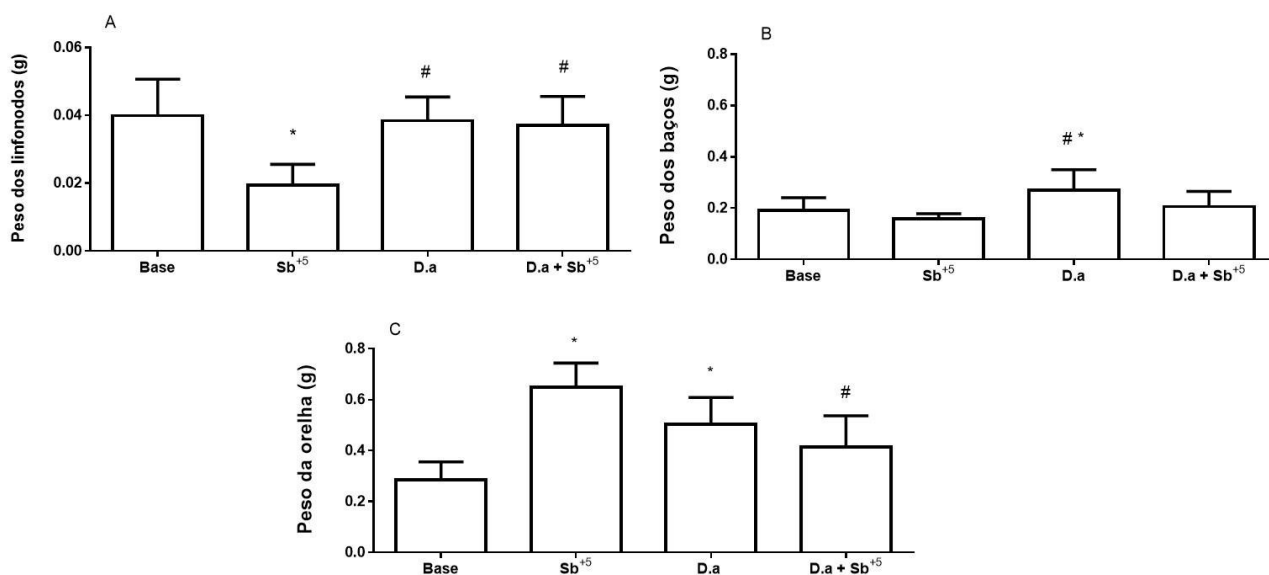


Figura 14. Peso dos órgãos linfóides e da orelha dos animais que receberam tratamento. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb^{+5}), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb^{+5}). A) Peso do linfonodo cervical dos animais, dos grupos tratados. B) Peso do baço dos animais dos grupos tratados. C) Peso da orelha direita dos animais dos grupos tratados. (*) Indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com pomada base. (#) Indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com Sb^{+5} .

5.11 Efeito do tratamento da pomada de *D.ambrosioides* e antimonial pentavalente sobre a celularidade do órgãos linfoides e orelha dos animais

Para verificar a influência do tratamento com pomada de *D. ambrosioides*, sobre a celularidade, foi realizada contagem total de células dos tecidos da medula, linfonodo, baço, peritônio e orelha direita. Os grupos tratados com antimonial pentavalente, pomada de *D. ambrosioides* e associação de composto apresentaram um aumento do número de células em relação ao grupo sem infecção (denominado sadio) na medula.

No linfonodo, os grupos pomada de *D. ambrosioides* e associação de composto, apresentaram um aumento do número de células quando comparados aos animais tratados com antimonial pentavalente, e este teve uma diminuição de células em relação ao grupo tratado com pomada base.

O grupo tratado com a associação de compostos apresentou diminuição do número de células no baço em relação ao grupo sadio. O mesmo grupo com associação de compostos ainda apresentou diminuição do número de células na lesão, quando comparado ao grupo tratado com antimonial pentavalente.

A orelha dos animais apresentou uma diminuição na celularidade do grupo associação de compostos em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente, no entanto esse mesmo grupo, teve um aumento de celularidade em relação ao grupo tratado com pomada base (Tabela 9).

Tabela 9. Contagem total de células (10⁶/mL) dos animais que receberam tratamento ou não com pomada de *D. ambrosioides* e Antimonial pentavalente. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). Estes animais tiveram as células da medula, linfonodo, baço, peritônio e da lesão contabilizados. Os dados foram apresentados (media ± o desvio padrão) p < 0,05 em relação aos demais grupos.

Local	Sadio	Base	Sb ⁺⁵	D.a	D.a + Sb ⁺⁵
Medula (10 ⁶ /mL)	2,2 ± 0,4	2,9 ± 0,8	4,0 ± 0,7 ^a	3,9 ± 1 ^a	3,6 ± 0,7 ^a
Linfonodo (10 ⁶ /mL)	ND	48,6 ± 17,7	25,0 ± 8,4 [*]	51,1 ± 13,2 [#]	49,5 ± 16,5 [#]
Baço (10 ⁶ /mL)	55 ± 11,1	51,5 ± 14,6	44,1 ± 12,3	52,7 ± 26,7	37,7 ± 6,7 ^a
Peritônio (10 ⁶ /mL)	5,4 ± 1,2	5,4 ± 2,2	4,7 ± 2,3	5,5 ± 2,8	5,9 ± 1,4
Orelha (10 ⁶ /mL)	ND	5,9 ± 2,5	14,7 ± 3,4 [*]	10,1 ± 2,7	7,3 ± 2,7 [#]

(a) Indica p < 0,05 em comparação ao grupo sadio. (*) Indica p < 0,05 em comparação ao grupo tratado com pomada base. (#) Indica p < 0,05 em comparação ao grupo tratado com Sb⁺⁵. (ND) Não identificado.

5.12 Imunofenotipagem

Para caracterizar a população celular identificada na contagem total, foi realizado a Imunofenotipagem das células do linfonodo cervical, baço, lavado peritoneal e células da lesão.

A frequência relativa da população de macrófagos no linfonodo se manteve semelhante em todos os grupos (Figura 15A) demonstrando que o tratamento não alterou a população de macrófagos mas sim, a população total de células do órgão, ao observar a contagem absoluta (Figura 15B) onde também os grupos tratados com pomada de mastruz e associação de compostos apresentaram o maior número de células em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente. Quando analisados pela dupla marcação CD86⁺/iNOS⁻ (Figura 15C) ou CD80⁺/iNOS⁻ (Figura 15D) mostrou que a maioria dos macrófagos não estavam ativados.

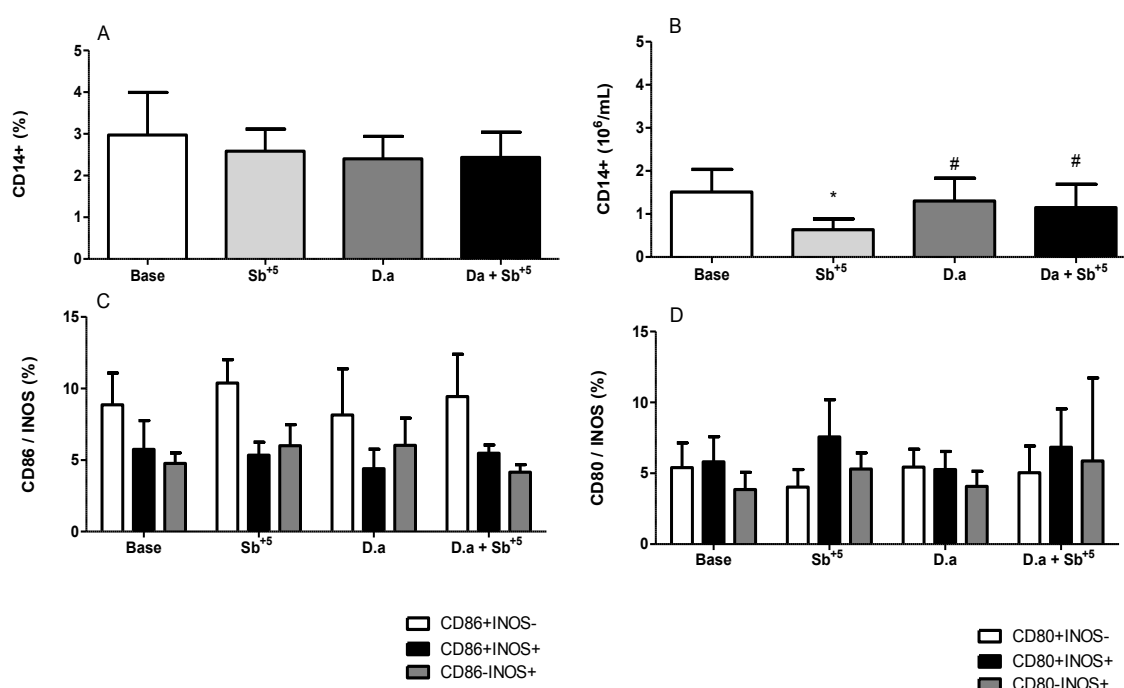


Figura 15. População de macrófagos no linfonodo cervical caracterizados por imunofenotipagem. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). A) População de macrófagos por contagem relativa (%). B) População de macrófagos por contagem absoluta (10⁶/mL). C) Dupla marcação de ativação CD86/iNOS. D) Dupla marcação de ativação CD80/iNOS.

(*) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com pomada base.

(#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺⁵.

No total de linfócitos, CD3⁺ (10⁶/mL) do linfonodo cervical, o tratamento com pomada de mastruz e associação de compostos, aumentou o número de linfócitos nos grupos tratados com a associação da pomada de mastruz e o antimonial pentavalente (Figura 16B).

Em relação à população de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), não houve diferença entre os grupo dessas populações (Figura 16C e 16D), apesar de observarmos um maior número de Linfócitos T $CD4$. Quanto a dupla marcação analisada, identificou-se que a maioria dos Linfócitos T $CD4$ não estavam ativados (Figura 16E).

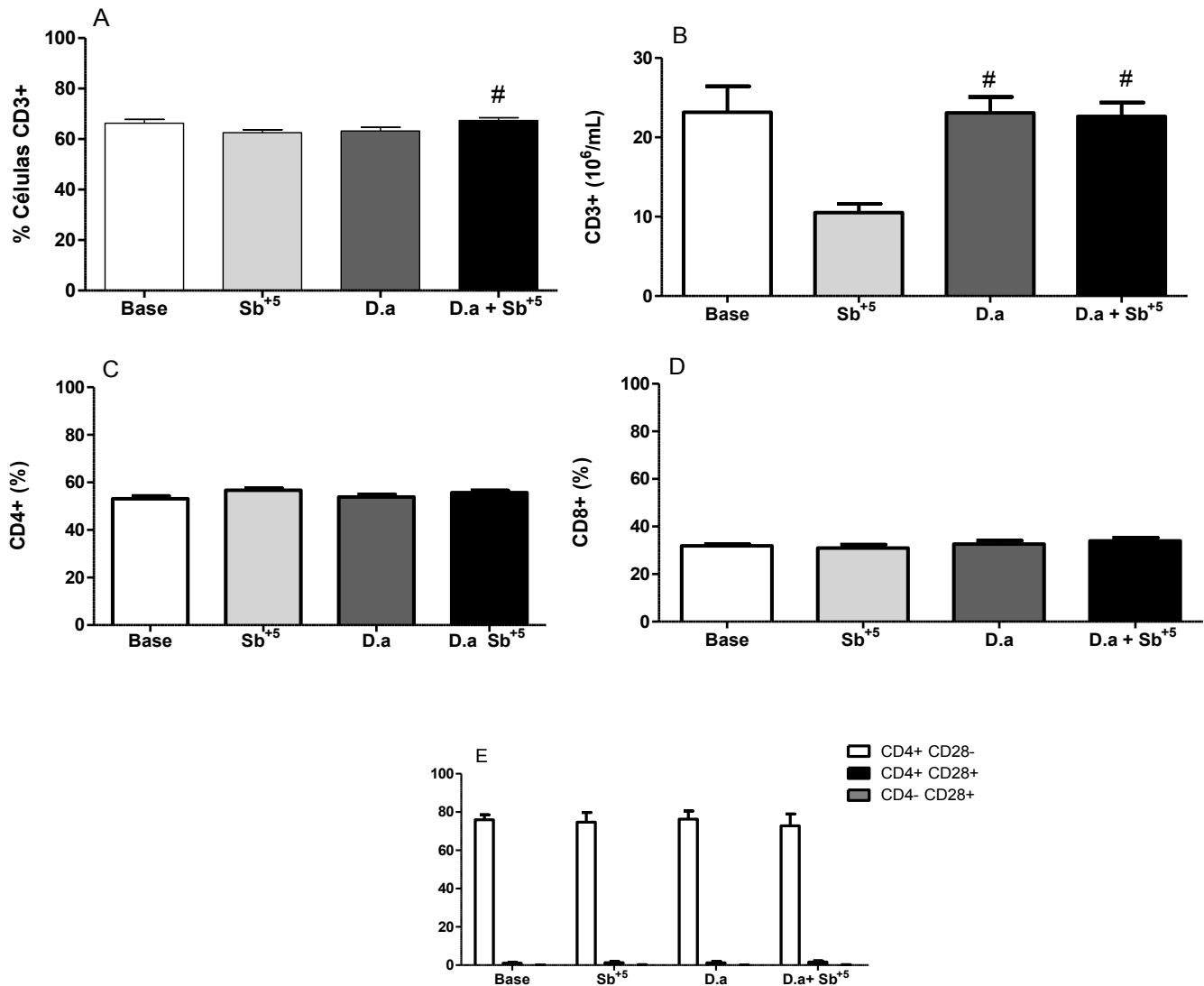


Figura 16. População de Linfócitos T no linfonodo cervical caracterizados por imunofenotipagem. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb^{+5}), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb^{+5}). A) População de Linfócitos T por contagem relativa (%). B) População de Linfócitos T por contagem absoluta ($10^6/mL$). C) Determinação da população de Linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) de todos os grupos que receberam tratamento ou não. D) Determinação da população de Linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$). E) Determinação da população de Linfócitos T helper ativados ($CD3^+CD4^+CD28^+$). (#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb^{+5} .

A contagem relativa e absoluta de macrófagos no peritônio, mostra uma redução na população de macrófagos em virtude de uma baixa expressão de CD14⁺, o que talvez não remeta a um efeito do tratamento, pois os demais grupos mantiveram expressão semelhante, de macrófagos, com o grupo que não recebeu tratamento (Figura 17A e 17B).

A presença de macrófagos duplamente marcados, mostra a maior quantidade para células não ativadas (Figura 17C e 17D).

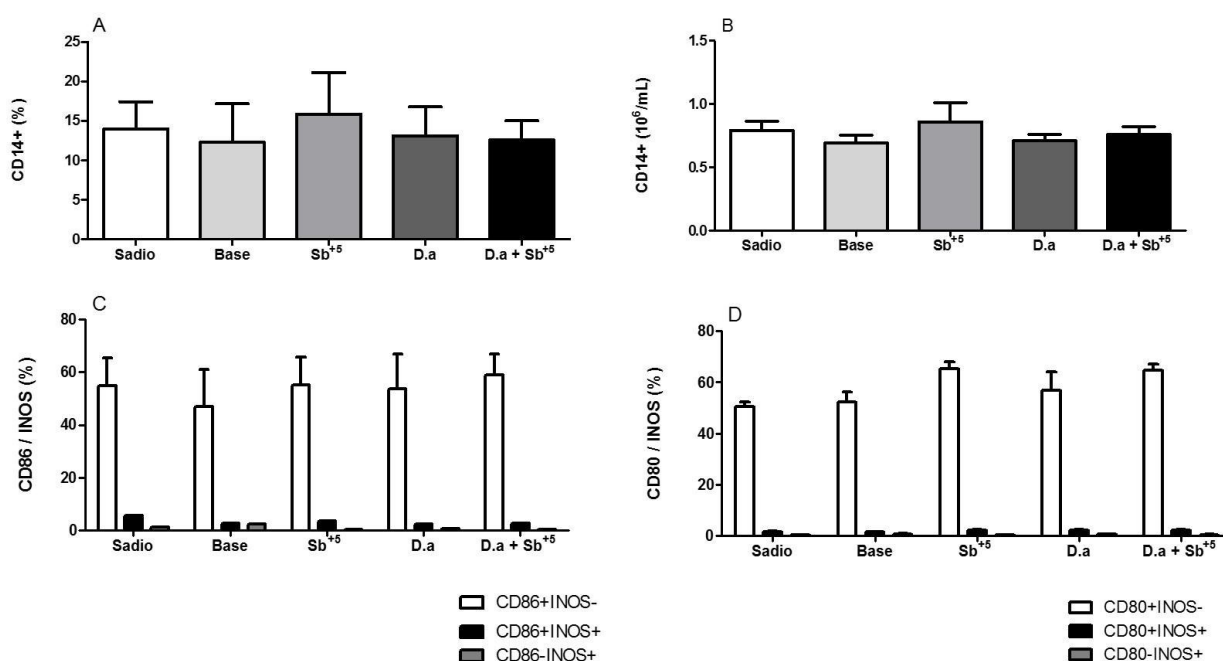


Figura 17. População de Macrófagos no lavado peritoneal caracterizados por imunofenotipagem.

Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). A) População de macrófagos por contagem relativa (%). B) População de macrófagos por contagem absoluta (10⁶/mL). C) Dupla marcação de ativação CD86/iNOS. D) Dupla marcação de ativação CD80/iNOS.

(*) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com pomada base.

(#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺⁵.

A contagem relativa da população de linfócitos identificados no baço, revelou uma diminuição dessas células no grupo tratado com pomada de mastruz ao ser comparada aos grupos tratados com pomada base e antimonial pentavalente (Figura 18A) e em sua contagem absoluta, houve uma redução de linfócitos T em todos grupos tratados em relação ao grupo com pomada base (Figura 18B)

Ao ser identificada a população de Linfócito T CD4⁺, essa mostrou uma diminuição de células no grupo tratado com pomada de mastruz (Figura 18C). No entanto, a dupla marcação

analisada (CD4/CD28), identificou que a maioria dos Linfócitos T CD4 não estavam ativados (Figura 18E).

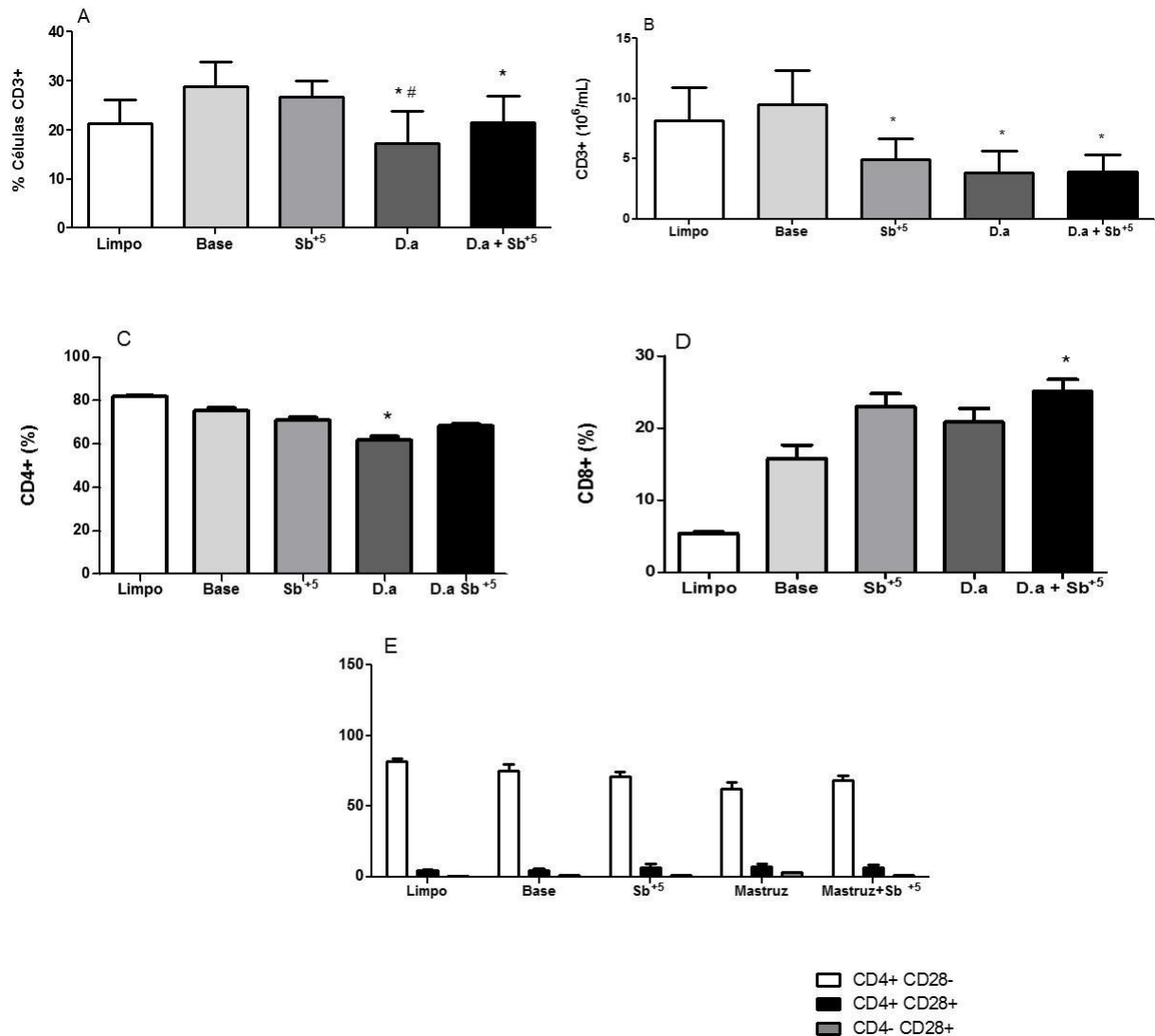


Figura 18. População de Linfócitos no baço caracterizados por imunofenotipagem. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). A) População de Linfócitos T por contagem relativa (%). B) População de Linfócitos T por contagem absoluta (10⁶/mL). C) Determinação da população de Linfócitos T auxiliares (CD3⁺CD4⁺) de todos os grupos que receberam tratamento ou não. D) Determinação da população de Linfócitos T citotóxico (CD3⁺CD8⁺). E) Determinação da população de Linfócitos T helper ativados (CD3⁺CD4⁺CD28⁺).

(*) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com pomada base.

(#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺⁵.

Na contagem do total de células presentes na lesão, houve uma redução no grupo tratados com pomada de mastruz em relação à pomada base e ao antimonial pentavalente, e no grupo associação de compostos em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente (Figura 19A).

Ao se determinar a população de macrófagos, por tamanho e complexidade, observou-se uma redução nos grupo tratados com pomada de mastruz e associação de compostos, em relação ao grupo antimonial pentavalente e também o grupo mastruz em relação ao grupo pomada base (Figura 19B).

Partindo da maior população de marcadores identificados na amostra, observou-se um aumento na expressão de CD86, molécula constitutiva do macrófago, no grupo tratado com pomada de mastruz em relação aos controles e no grupo associação de compostos em relação ao grupo antimonial pentavalente (Figura 19C). Em relação ao CD80, molécula induzível no macrófago, houve um aumento no grupo tratado com pomada de mastruz em relação ao grupo pomada base e no grupo associação de compostos, em relação ao grupo antimonial pentavalente (Figura 19E).

Na dupla marcação para macrófagos e produção de iNOS (CD14/iNOS), referente ao painel para CD86, o modelo também sugere a presença de uma outra célula produzindo iNOS (CD14-/iNOS+). Entretanto o grupo pomada de mastruz apresentou a maior presença de macrófagos expressando iNOS (CD14+/iNOS+) em relação aos demais grupos (Figura 19D). O mesmo foi observado no painel oriundo do painel do CD80, quando o grupo pomada de mastruz apresentou a maior população de macrófagos ativados em relação aos grupos controles (Figura 19F).

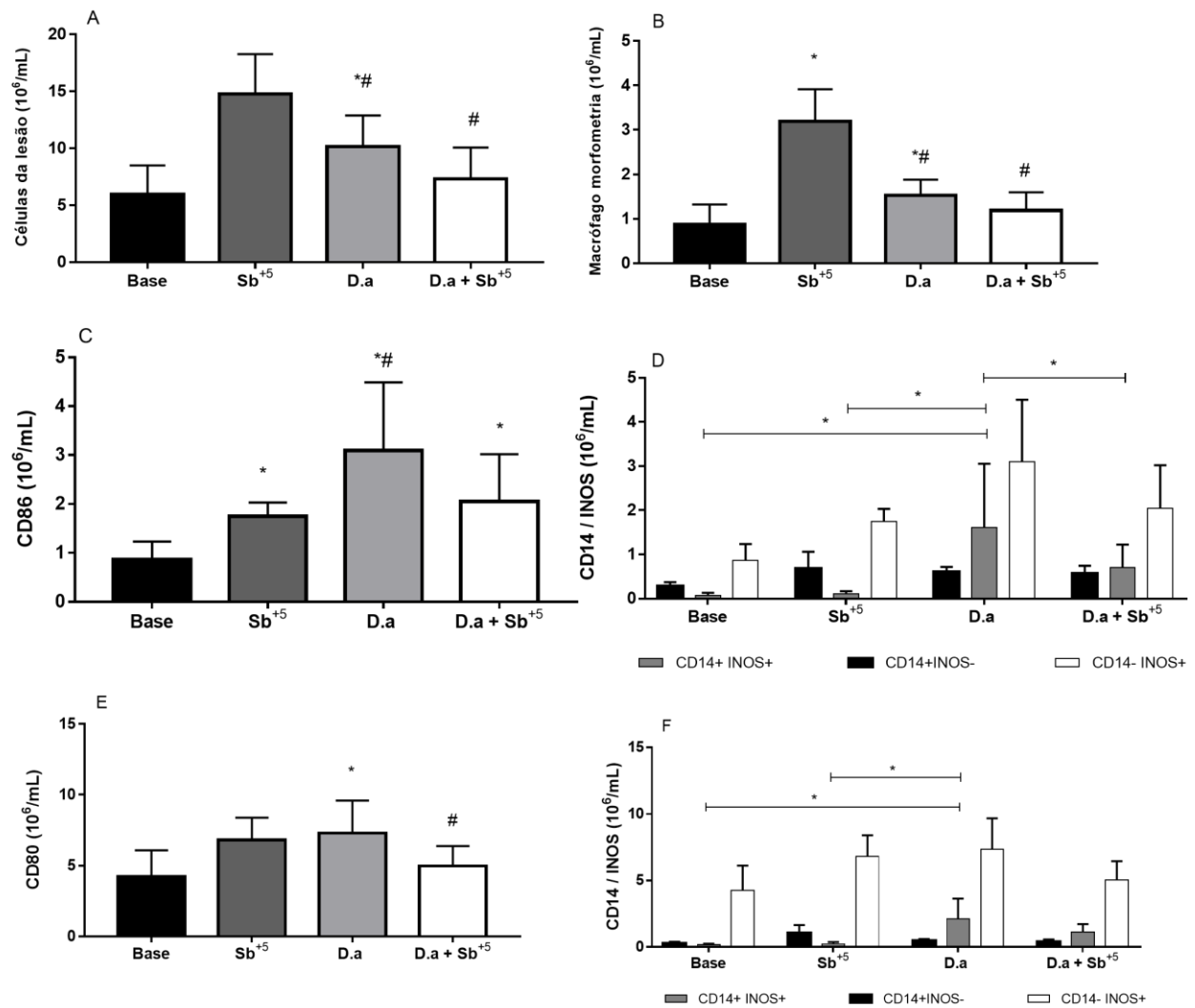


Figura 19. População de Macrófagos na lesão caracterizados por imunofenotipagem. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). A) Número de células (10^6) quantificadas na lesão. B) População de macrófagos identificados por morfometria (SSCxFCS). C) Determinação da população marcada pelo CD86. D) Dupla marcação da população CD14/iNOS, a partir do painel do CD86. Grupo D.a apresentou $p < 0,05$, entre os demais grupos para CD14⁺/iNOS⁺. E) Determinação da população marcada pelo CD80. F) Dupla marcação da população CD14/iNOS, a partir do painel do CD80. Grupo D.a apresentou $p < 0,05$, entre os grupos controles, para CD14⁺/iNOS⁺.

(*) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com pomada base.

(#) Indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com Sb⁺⁵.

5.13 Tratamento com pomada de mastruz e antimonial pentavalente, aumenta a produção de Óxido Nítrico

Houve um aumento espontâneo na produção de óxido Nítrico peritoneal, no grupo tratado com associação de compostos em relação aos demais grupos que receberam tratamento ou não. A partir do reestímulo com extrato de *D. ambrosioides*, houve aumento de produção de NO em todos os grupos, com diferença significativa entre o grupo tratados com antimonial pentavalente e o grupo tratado com associação de compostos (Figura 20).

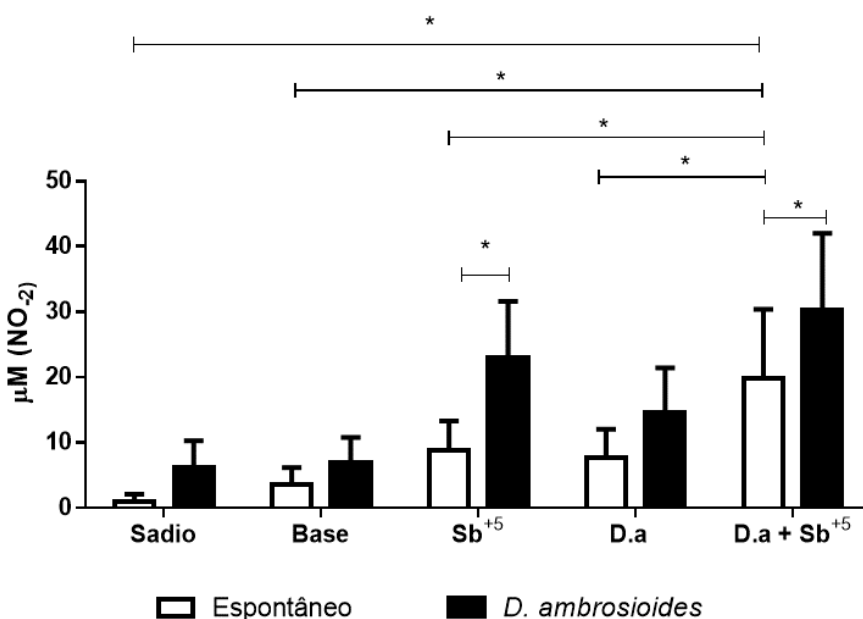


Figura 20. Quantificação da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). Macrófagos de camundongos Balb/c foram cultivados na presença ou não de extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides*. Após 48 horas de cultura, o sobrenadante foi colhido para determinação da produção de óxido nítrico (NO). (*) Indica p < 0,05 em relação entre os grupos.

5.14 Efeito do tratamento com pomada de mastruz e antimonial pentavalente sobre a produção de citocinas inflamatórias

Como o perfil da Leishmaniose Tegumentar é caracterizado por uma inflamação crônica, investigamos algumas citocinas que estão envolvidas nesse processo. Foram dosadas as citocinas IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e MCP1 no sobrenadante da cultura de células obtidos do lavado peritoneal. As mesmas citocinas também foram dosadas, após as células serem reestimuladas com extrato de *D. ambrosioides*.

Os dados mostram uma redução da citocina IFN- γ no grupo não estimulado tratado com associação de compostos e aumento em todos os grupos após serem reestimulados com mastruz (Figura 21A).

A citocina IL-10 teve aumento espontâneo, no grupo tratado com pomada de mastruz em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente, e após serem reestimulados, todos os grupos tiveram aumento desta citocina, apesar de não apresentar diferença entre os grupos (Figura 21B).

Houve aumento de TNF- α em todos os grupos, em relação aos grupos não estimulados (Figura 21C).

Observamos aumento da citocina IL-12 nos grupos tratados com pomada de mastruz e associação de compostos em relação ao grupo tratado com pomada base, e após o reestímulo, todos os grupos tiveram aumento de IL-12, exceto o grupo pomada base (Figura 21D).

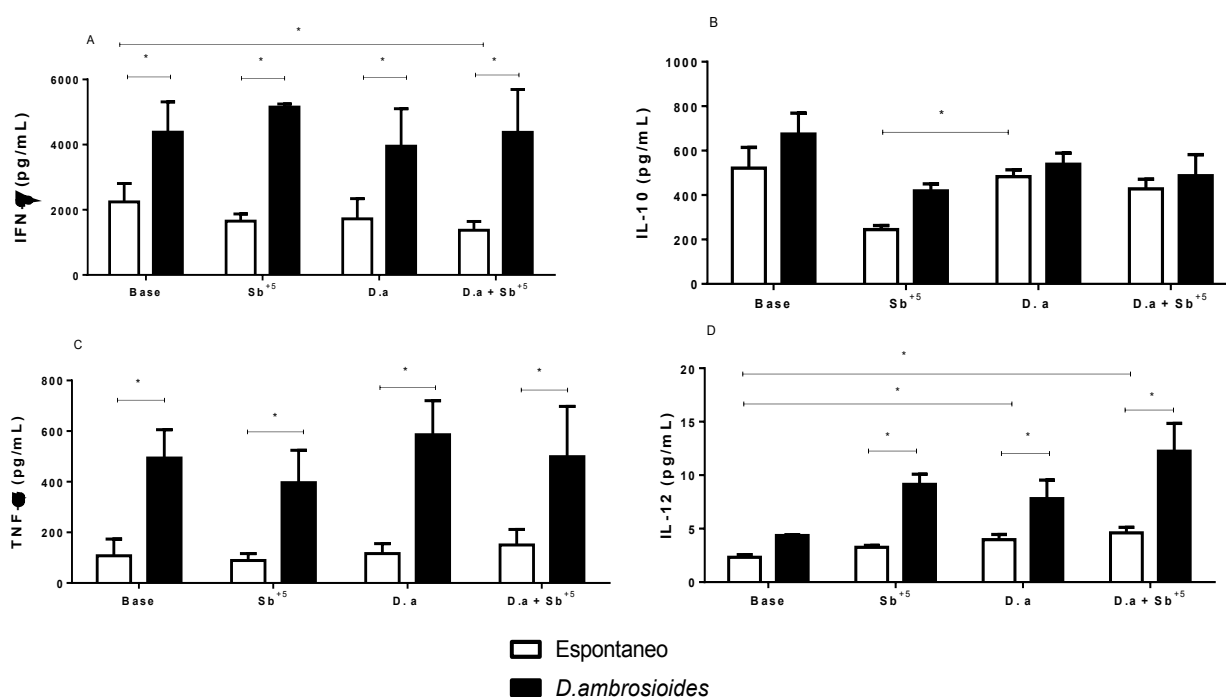


Figura 21. Quantificação da produção de citocinas de células obtidas do peritônio de camundongos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com pomada de *Dysphania ambrosioides*. Camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com pomada base (Base), antimonial pentavalente (Sb⁺⁵), pomada de mastruz (D.a) ou associação de compostos, sendo pomada de mastruz e antimonial pentavalente (D.a + Sb⁺⁵). Os grupos foram analisados pela produção espontânea de citocinas (Espontâneo) e também depois de estimulados com extrato de *Dysphania ambrosioides* (*D.ambrosioides*). (*) Indica p < 0,05 em relação entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

Extratos vegetais tem sido amplamente utilizados como produtos finais ou intermediários para obtenção de diferentes formas farmacêuticas (SILVA JÚNIOR et al., 2011). Os extratos proporcionam, em pequenas quantidades e numa forma física estável e conveniente, a ação medicinal e característica da espécie vegetal que procedem (ANSEL et al., 2000). O extrato hidroalcoólico obtido das folhas secas da *D. ambrosioides* utilizado neste trabalho, foi submetido a uma triagem para identificação de sua atividade leishmanicida e da concentração capaz de inibir 50% das formas promastigotas. Após contagem das formas promastigotas mantidas 24 horas em cultura e em cinco diferentes concentrações, o extrato apresentou atividade leishmanicida com IC₅₀ de 250 µg/mL (Figura 7), podendo ser classificado como Extrato Ativo, segundo uma classificação proposta por Amaral et al.,(2006) que classificaram a ação de extratos vegetais sobre parasitos flagelados, com base em valores de IC₅₀ da seguinte forma: altamente ativo (IC₅₀ ≤ 100 µg/mL), ativo (100 < IC₅₀ ≤ 250 µg/mL), moderadamente ativo (250 < IC₅₀ ≤ 500 µg/mL) e inativo (IC₅₀ ≥ 500 µg/mL). Esta mesma classificação se adequa ao IC₅₀ obtido por Bezerra et al., (2006) que obtiveram um IC₅₀ de 151,9 µg/mL da mesma espécie vegetal, tendo sido caracterizado também como Extrato Ativo.

A fim de observarmos o tipo de morte celular do parasito após contato direto com extrato de *D. ambrosioides*, as formas promastigotas foram marcadas com Iodeto de Propídio e Anexina V. A Anexina V consiste em uma molécula com afinidade à fosfatidilserina, a qual nas etapas iniciais da apoptose é exteriorizada através da membrana plasmática (BRITA et al., 2014; DESOTI et al., 2012). O Iodeto de Propídio, por ser uma macromolécula impermeável à célula viável, se liga fortemente aos ácidos nucleicos de células que estão com a permeabilidade seletiva da membrana plasmática comprometida, caracterizando a necrose (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Em análise por microscopia de fluorescência, foi demonstrada a atividade leishmanicida do extrato nas três concentrações a partir do IC₅₀ (250µg/mL, 125µg/mL e 62,5µg/mL) sendo à concentração de 250 µg/mL, a responsável pelo maior número de células mortas (Figura 8) quando essas apresentaram fenótipo compatível com a morte celular por necrose, caracterizado pela dupla marcação de Anexina V e Iodeto de Propídio (Figura 9).

A caracterização química é de suma importância para o estudo de uma espécie vegetal, pois a partir disso, pode-se compreender a característica do extrato através dos seus constituintes. A partir da caracterização química realizada em nosso extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, dentre os dezesseis compostos identificados, a maioria foram compostos

fenólicos do tipo flavonóides como a quercetina e kaempferol (Tabela 2), atribuindo ao extrato um caráter antioxidante (KUMAR et al.,2007; BARROS et al., 2013; ZOHRA et al.,2019) devido a características deste composto. Um extrato com características antioxidante reduz a eliminação de radicais livres, sendo eficaz no tratamento de distúrbios mediados pelo estresse oxidativo (AYAZ, 2017) o que também caracteriza a patogênese de várias doenças parasitárias como as causadas por *Leishmania* spp (BILDIK et al.,2004; BRITTI et al.,2008).

Vale ressaltar que muitas das propriedades da espécie *D.ambrosioides*, como cura hipotensiva, imunomoduladoras, antimicrobianas e analgésicas, são atribuídas à presença dos flavonóides (IBRAHIM et al.,2007) e como Hironori (1996) e Rane (2003) já afirmavam, componentes químicos como flavonóides também são conhecidos por promover a cicatrização de feridas, em especial quando utilizadas topicamente.

A atividade antiprotozoário dos flavonóides é geralmente associada à inibição do metabolismo energético, ruptura das membranas mitocondriais, entre outras (TASDEMIR et al.,2006). Compostos fenólicos, também como a quercetina, podem atuar na membrana celular dos parasitos, promovendo sua lise (MIRANDA et al.,2013), o que foi sugerido em nosso trabalho, ao observar a marcação das formas promastigotas com Anexina V e Iodeto de propídio indicando a atividade leishmanicida do extrato, alterando a estrutura da membrana e expondo o meio intracelular, reduzindo a viabilidade das formas promastigotas, com concomitante morte do parasito por necrose.

A investigação farmacêutica de produtos naturais representa uma importante estratégia para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (TIUMAN et al., 2011) para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, especialmente contra protozoários parasitos (SINGH et al., 2014). O uso de extratos vegetais, faz parte da prática da medicina popular que complementa o tratamento usualmente empregado, para a população de menor renda (BRUNING et al., 2012) e também devido ao fácil acesso a essas espécies vegetais. A partir dessa realidade, baseado nas atividades biológicas já testadas experimentalmente do extrato de *D. ambrosioides* e buscando avaliar o efeito leishmanicida e cicatrizante em modelo experimental, desenvolvemos uma pomada de *D. ambrosioides* a 25% manipulada a partir da incorporação do extrato bruto liofilizado, à pomada Lanolina e Vaselina que além da sua capacidade de estabilidade, foi escolhida por sua característica de absorver água adicional e sua natureza oleosa promovendo assim uma base com função protetora e emoliente, protegendo o local da lesão (BRASIL, 2011).

Ao desenvolver uma nova formulação à base de produtos naturais, é imprescindível que essa seja aprovada em análises que testifiquem sua estabilidade e índice de contaminação por

microrganismo. Em virtude disso, formulações com extratos vegetais devem apresentar compatibilidade entre seus constituintes que promovam um produto final com boa aparência que estimule seu consumo pelo paciente além de apresentar estabilidade (BARROS, 2010).

Antes dos Testes de Estabilidade da pomada de *D. ambrosioides* serem iniciados, foi realizado o Teste de Centrifugação com a finalidade de identificar possíveis instabilidades entre seus componentes (ANVISA, 2008). Não foram encontrados sinais de instabilidade após os períodos de diferentes rotações.

A partir deste resultado, prosseguimos com os Testes de Estabilidade Preliminar e Acelerada. Após o armazenamento e observação até o nonagésimo dia, a pomada apresentou consistência e nenhuma alterações significativas nos aspectos observados como cor e odor, mostrando uma plausível compatibilidade entre os compostos empregados (Tabela 3).

A medida do potencial hidrogeniônico obtida diretamente sobre as amostras de pomadas armazenadas até noventa dias, apresentou uma faixa de variação de 5,85 a 5,9, se mostrou relativamente estável frente às três condições testadas (Tabela 5). Apesar de apresentar pequenas alterações no pH, a pomada de *D. ambrosioides* pôde ser considerada própria para uso uma vez que é condizente com o pH médio cutâneo que mostra-se levemente acidificado numa faixa de 5,5 a 6,5 (ISSAC, 2008).

Em função da origem das espécies vegetais, muitos microrganismos como bactérias e fungos podem estar presentes, devido a fontes de contaminação como poluição da água de irrigação, solo, coleta (TAKAHASHI et al., 2009). Estes itens devem ser considerados no controle microbiológico de produtos naturais por gerarem contaminação além do preconizado pela Farmacopéia como “número de microrganismos viáveis”.

Um fator importante na produção e utilização de fármacos é o controle da qualidade microbiológica, o que gera confiabilidade na qualidade do produto comercializado. Desse modo, produtos farmacêuticos de uso oral e tópico, que não tem como requerimento a esterilidade, devem sujeitar-se ao controle de contaminação microbiológica, ou seja, que atendam aos limites aceitáveis para microrganismos (BRASIL, 2010; DA SILVA et al., 2015).

Com esse pressuposto, foi realizado o teste de análise microbiológica da pomada de *D. ambrosioides* e em todos os diluentes utilizados neste teste, como PBS, solução salina, além da pomada base de lanolina e vaselina e extrato bruto do vegetal. Os mesmos ao serem cultivados em meio Ágar Sabourand e meio Ágar Miller Hinton, apenas as culturas do extrato e da pomada de *D. ambrosioides* apresentaram crescimento microbiológico e de acordo com os limites de aceitabilidade recomendado pela RDC nº 481 (Tabela 4) (ANVISA, 1999).

Ao analisarmos as formas e os tipos dos microrganismos, pela coloração de Gram, em algumas colônias isoladas crescidas nas placas de cultivo, não foi observado crescimento de cepas patogênicas (Tabela 6).

Partindo dos resultados dos ensaios de estabilidade e controle microbiológico onde não se detectou sinais de instabilidade e contaminação do produto manipulado, prosseguiu-se para os testes biológicos afim de investigar a eficácia da pomada no tratamento de lesões provocadas por *L. amazonensis*. Vale lembrar, que úlceras induzidas de forma semelhante quando foram tratadas intralesionalmente com óleo de *D. ambrosioides* apresentaram redução significativa (Monzote, 2014), bem como quando tratadas com pomada de *D. ambrosioides* a 5%, (Sousa, 2015). Em nosso trabalho apesar de identificarmos o aumento da área da lesão nos grupos tratado com pomada de mastruz e o associação de compostos, na primeira semana de tratamento, em relação ao grupo antimonial (Figura 10A), observamos a diminuição da área em todos os grupos no decorrer da segunda e terceira semana (Figura 10B e 10C). E na quarta semana de tratamento, o grupo tratado com pomada de mastruz, apresentou a menor área da lesão em relação aos grupos controles (Figura 10D).

Além de avaliarmos o desenvolvimento da lesão, também acompanhamos a infecção por *L. amazonensis* através da verificação da carga parasitária pelo teste de Diluição Limitante no sétimo e décimo quarto dia de cultura do linfonodo drenante, realizada após eutanásia dos animais ao fim do tratamento. Esta técnica permite determinar o número de parasitos viáveis, presentes num determinado local, através de diluições seriadas. Observou-se a diminuição da carga parasitária nos grupos tratados com pomada de *D. ambrosioides* e associação de compostos nos dois períodos avaliados, em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente (Figura 12A e 12B). Fato semelhante foi visto por Patrício et al., (2008), onde o uso de HCE (Extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*) via intralesional, reduziu a carga parasitária dos órgãos linfóides de camundongos infectados com *L. amazonensis* no entanto não foi capaz de reduzir a área da lesão, ou ainda quando através do tratamento oral, diminuiu a área da lesão, mas não teve efeito sobre a carga parasitária, o que mostra que apesar de parecerem controversos, esses resultados corroboram para o fato que a redução da carga parasitária não necessariamente reduz a área da lesão, ou vice-versa.

O processo de cicatrização envolve uma série de processos inflamatórios desencadeando uma proliferação celular com remodelamento tecidual. Para que isto ocorra de forma eficaz, processos celulares e molecular precisam ocorrer concomitantemente, visando o restabelecimento estrutural e funcional do tecido danificado (RAINA et al., 2008; AFONSO et al., 2014; ARNOLD et al., 2014). Os dados histológicos guardam certa relação com alterações

características de um quadro inflamatório, em virtude disso, esses dados também foram analisados a fim de avaliar a eficácia do tratamento com a pomada de mastruz sob úlceras leishmanióticas que caracterizam um quadro inflamatório crônico. O grupo tratado com a pomada de mastruz apresentou o maior escore em relação ao edema e ao infiltrado celular. O edema ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular que causa exsudação de líquido rico em proteínas (NASCIMENTO, K.A.F, 2014).

O infiltrado de leucócitos desempenha um importante papel na secreção de citocinas e no recrutamento de queratinócitos e células endoteliais, durante a fase de reparo celular (SILVA, 2016). Este mesmo fato foi observado em nosso trabalho ao percebermos que o grupo tratado com pomada de mastruz apresentou aumento de infiltrado em relação ao grupo tratado com antimonial (Tabela 7).

Em relação ao escore de células parasitadas, observou-se uma redução significativa no grupo tratado com associação de compostos ao se comparar ao grupo tratado com pomada base, sendo este efeito possivelmente oriundo do tratamento complementar de antimonial pentavalente com pomada de mastruz, já que os tratamentos isolados apresentaram número maior de células parasitadas (Tabela 7).

Ao observar o escore de Extensão da lesão, o grupo tratado com a pomada de mastruz foi o grupo que apresentou a menor área de lesão (Tabela 7), o que ratifica os nossos dados sobre o acompanhamento do tamanho da área da lesão, sendo o grupo tratado com pomada de mastruz, o grupo que apresentou a redução da área. O mesmo foi observado por Sérvio et al.(2011) ao constatar a cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com extrato aquoso de *D. ambrosioides*. Este fato sugere melhores resultados em nosso trabalho, tendo em vista que foi utilizado um extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* que provavelmente relaciona-se aos distintos metabólitos obtidos nas extrações aquosa e etanólica, o que confere maior atividade aos extratos etanólicos quando comparados aos aquosos (COWAN, 1999; SANCHES et al.,2005).

A cicatrização de feridas consiste num processo de quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (KESICI et al.,2018). A deposição de colágeno ocorre na fase proliferativa e possui grande importância clínica (NASCIMENTO K.A.F., 2014). Os nossos dados referentes à deposição de colágeno nos mostra sua maior deposição no grupo tratado com pomada de mastruz em relação aos grupos controles (Tabela 8) resultado este, também identificado por Sousa et al., (2015), o que complementa os nossos dados em relação ao tamanho da área da lesão que se mostrou menor neste mesmo grupo (Figura 12D), tendo em vista que a deposição de colágeno acompanha o remodelamento tecidual.

Para avaliação do estado geral dos animais que receberam o protocolo de tratamento, foi realizada a contagem global da medula, linfonodo, baço, peritônio e lesão (Tabela 9). Esses dados podem ser complementares quando comparamos com o peso desses mesmos órgãos dos grupos que receberam tratamento (Figura 14A, 14B e 14C).

Com relação ao efeito dos tratamentos sobre a contagem total de células nos órgãos, o linfonodo cervical apresentou um aumento de células no grupo tratado com pomada de mastruz e no grupo com associação de compostos em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente, podendo-se inferir que o tratamento com pomada de mastruz induziu o aumento de células no linfonodo drenante. E ao abordar o número de células na lesão, observamos uma diminuição nos grupos de pomada de mastruz e associação de compostos, apresentando diferença significativa apenas entre o grupo com associação de compostos e antimonial pentavalente, mostrando que o tratamento com pomada de mastruz, reduziu a quantidade de células na lesão.

O controle ou cura para leishmaniose é caracterizada por um amplo complexo de parâmetros imunológicos como a presença de macrófagos, células NK, linfócitos T, produção de citocinas, entre outros. Em virtude disso, investigamos as populações celulares marcando-as com fluorocromos para a realização do protocolo de imunofenotipagem, no baço, linfonodo, peritônio e lesão.

Ao analisarmos a população de macrófagos no linfonodo (Figura 15B), identificamos o aumento desta população nos grupos pomada de mastruz e associação de compostos em relação ao controle positivo.

A população de macrófagos identificada no lavado peritoneal apresentou-se homogênea em todos os grupos (Figura 17A, 17B) e a dupla marcação para os dois marcadores de população (iNOS/CD86 e iNOS/CD80) mostrou que os macrófagos não estavam mais fortemente ativados naquele momento.

A determinação da população de macrófagos na lesão, por dupla marcação, evidenciou um aumento de macrófagos ativados no grupo tratado com pomada de mastruz quando comparado aos grupos que receberam tratamento ou não (Figura 19D), a partir do painel para CD86 (Figura 19C). O mesmo aumento de macrófagos ativados, foi observado a partir do painel para CD80 (Figura 19E), quando o grupo tratado com pomada de mastruz apresentou aumento de macrófagos ativados em relação aos controles (Figura 19F). O aumento de macrófagos identificado na fenotipagem do nosso modelo, condiz com o fato dessas células serem a primeira linha de defesa contra parasitos intra e extracelulares em hospedeiros

infectados e o tipo de resposta que desencadearão, está relacionado aos tipos de metabólitos produzidos durante sua ativação (HOLZMULLER et al., 2018).

Ao observarmos a população de linfócitos T, identificamos o aumento desta população no linfonodo cervical nos grupos tratados com pomada de mastruz e associação de compostos, em relação ao controle positivo (Figura 16B) e uma diminuição no baço em relação ao grupo controle negativo (Figura 18B). Dentre as populações de linfócitos T identificados no linfonodo cervical e baço, a maior parte foi de linfócitos T CD4⁺ (Figura 16C e 18C), o que caracteriza uma resposta à infecção de leishmaniose tegumentar impulsionadas por células CD4⁺ Th1, que produzem citocinas ativadoras de macrófagos como TNF- α , IFN- γ , juntamente com citocinas regulatórias como IL-10 (KAYE & SCOTT, 2011, GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014,)

O estresse oxidativo tem sido apresentado como um dos meios para a fisiopatogenia da leishmaniose, onde o aumento da produção de NO, por exemplo, resulta na morte do parasito (ASSCHE et al, 2011; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). O que se observou em nosso modelo experimental foi a maior produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais do grupo tratados com associação dos compostos em relação aos demais grupos, e a produção foi ainda maior quando a cultura de células peritoneais foi estimulada com extrato de *D. ambrosioides* (Figura 20), como também observado por Cruz e colaboradores (2007).

O óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível, é um potente indutor da morte de parasito intracelular (OLEKHNOVITCH & BOUSSO, 2015). IFN- γ que é produzido pelas células do tipo Th1, promoverá a produção da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos. Essa enzima catalisa a oxidação do terminal guanidino nitrogenado da L-arginina em óxido nítrico, causando a morte do parasito (HORTA et al., 2012; OLEKHNOVITCH & BOUSSO, 2015). Essa mesma capacidade de ativação macrofágica, por aumento da produção de NO, induzido pelo extrato de *D. ambrosioides* e consequente diminuição da infecção por *L. amazonensis*, também já foi apresentado por Lima Junior (2014).

Além de atuar no processo inflamatório, o NO participa do processo de cicatrização tecidual, estimulando a expressão gênica e a diferenciação celular, em especial dos queratinócitos, promovendo assim a reepitelização, e também participa da deposição de colágeno durante o processo de cicatrização (WITTE e BARBUL, 2002; CHIARA et al., 2006). O aumento na produção de NO observado em nosso trabalho pode ter contribuído com a maior deposição de colágeno no grupo tratado com pomada de mastruz, dados esses observados em nosso score do histopatológico.

Adicionalmente as citocinas pró e anti-inflamatorias desempenham diferentes papéis na patogênese da infecção por *Leishmania*. TNF- α , IFN- γ , IL-12 (Th1) são fundamentais na

iniciação da resposta imune contra *Leishmania* enquanto que as citocinas anti-inflamatória, permitem a viabilidade do parasito (MASPI; ABDOLI, 2016).

A resposta imunológica contra o parasito *Leishmania* spp. se dá pela produção de citocina pró-inflamatórias produzidas por células T CD4+, como a TNF- α , IFN- γ , IL-12 (STRAUSS-AYALI; BANETHA; JAFFET, 2007). Dependendo da magnitude da ativação das células T, esta célula irá gerar citocinas com função regulatória ou citotóxica (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007), com isso o resultado da infecção dependerá do balanço entre a habilidade do hospedeiro em induzir uma resposta leishmanicida e a estratégia do parasita em evadir-se a resposta imune do hospedeiro (CARVALHO, 2012). Em virtude disso, células reguladoras (Treg) do sistema imune produzem citocinas reguladoras como a IL-10, que inibe uma resposta inflamatória exacerbada (MASPI; ABDOLI, 2016).

Nossos dados revelaram um aumento da citocina pro-inflamatórias IL-12 no grupo tratado com pomada de mastruz e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos que receberam tratamento com a pomada de mastruz e associação de compostos. E ao serem estimulados com o extrato, a produção das citocinas foi ainda maior, dando diferença significativa entre os grupos estimulado e não estimulado para as citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ .

Estes resultados sugerem que essa regulação é de extrema importância na resposta inflamatória, contribuindo para a fase de reparo tecidual, visto ao final do processo.

Assim, nossos resultados colaboram com a hipótese preliminar que a pomada de *D. ambrosioides* a 25% agiu de forma promissora sobre a cicatrização de úlceras leishmanióticas e na diminuição da carga parasitária, constituindo um passo inicial para a formulação de um fármaco a base de extrato vegetal e de uso concomitante à droga já preconizada para o tratamento da leishmaniose.

7. CONCLUSÃO

O tratamento tópico com pomada de *D. ambrosioides* mostrou-se eficaz no tratamento de úlceras leishmanióticas quando:

- Promoveu a morte do parasito por necrose em diferentes concentrações, quando exposto diretamente ao extrato
- Reduziu a área da lesão no grupo tratado com pomada de mastruz
- Apresentou diminuição da carga parasitária observada após 7 e 14 dias de incubação, em relação ao grupo tratado com antimonial pentavalente
- Estimulou a deposição de colágeno como mostrado nos cortes histológicos feitos a partir da lesão
- Induziu a produção de óxido nítrico, *in vitro*, por macrófagos peritoneais
- Induziu o aumento de macrófagos ativados na lesão, no grupo tratado com a pomada de *D. ambrosioides*
- Estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-12) e reguladora (IL-10) sugerindo um potencial efeito inflamatório e cicatrizante.

8 REFERÊNCIAS

- AIN, Q.U., DAVID, M., SHAH, Q., AHMAD, M., JAHAN, S. Antifertility effect of methanolic leaf extract of *Chenopodium ambrosioides* Hook. in male Sprague Dawley rats. *Andrologia*, 50(10), e13129.
- ALEMAYEHU, B., ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1-12. (2017). <https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>
- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN, M. B. WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**. 7: e35671(2012)
- ALVAREZ, C., RODRIGUES, P., CARVAJA, L. Efecto del extracto de paico (*Chenopodium ambrosioides*), en parásitos gastrointestinales de gallos de pelea (*Gallus domesticus*). **Revista Cultura Científica JDC**, 9:77-80; 2011.
- ALMEIDA, R. O.; KRYCHAK-FURTADO, S.; RICHTER, E. M.; OLIVEIRA, C. N. G.; CERDEIRO, A. P. S.; SCHAFFHAUSER, E. 2009. Avaliação da Atividade Anti-helmíntica do *Chenopodium ambrosioides* contra *Trichostrongylidae* de Ruminantes. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 4 (2): 1507- 1510.
- AMARAL, F.M.M., RIBEIRO, M.N.S., FILHO-BARBOSA, J.M., REIS, A.S., NASCIMENTO, F.R.F., MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Rev. Bras. Farmacogn** 2006; 16 (Supl): 696-720.
- AMARO, R. R., COSTA, W. A. Transformações socioespaciais no Estado do Rio de Janeiro enquanto determinante social da saúde: no contexto das leishmanioses. *Hygeia*, v. 13, n. 26, p. 198-210, 2017.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and experimental dermatology*, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, V.G. & ALLEN Jr., L.V. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de liberação de fármacos. 6ª. Ed., São Paulo, Editora Premier, 568p, 2000.
- ANSELMO L.B, GROSS J.L, HADDAD F, SILVA R.A, COUTO W.J, DEHEINZELIN W.D, YOUNES R.N, Ab'saber A.M, CANZIAN M, CAPELOZZI V.L, BARBUTO J.A.M (2005) Dendritic cell distribution in primary lung cancer patients. **Keystone Symposia/Basic Aspects of Tumor Immunology**, 2005
- ANVISA. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição (2018)
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Suplemento+FFFB.pdf/478d1f83-7a0d-48aa-9815-37dbc6b29f9a>

ARAÚJO, C. A. C., ALEGRIO, L. V., LEON L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** 49:751-754. (1998)

AYAZ, M, JUNAID, M., ULLAH, F., SUBHAN F., SADIQ A., ALI G., OVAIS M, SHAHID M., AHMAD A., WADOOD A., ET AL. 2017. Anti-Alzheimer's studies on beta-sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. **Front Pharmacol.** 8:697.

AZEVEDO, V. M., KRUEL, V. S. F.(2007). Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 263-275.

BACELLAR, O., LESSA, H., SCHRIEFER, A., MACHADO, P., RIBEIRO DE JESUS, A., DUTRA, W.O., GOLLOG, K.J., CARVALHO, E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740, 2002.

BARRAL, A., SAMPAIO, D. P., GRIMALDI JUNIOR, G., MOMEN, H., PRAT, D. M., JESUS, A. R., ALMEIDA, R., BARRAL NETO, M., CARVALHO, E. M., Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BARROS, L., PEREIRA, E., CALHELHA R. C., DUEÑAS, M., CARVALHO, A. M., SANTOS-BUELGA, C. FERREIRA, I.C.F.R., 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**. 5, 1732-1740.

BARROS K.N, Guimarães H.E.T., Sartor C.P., CORTEZ L.E.R., AMARAL V., Felipe D.F. Desenvolvimento de uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata*. *Iniciação Científica CESUMAR*. 12, 29-37 (2010)

BASTOS, MM., BOECHAT, N., GOMES, A. T., NEVES, M. G., & CAVALEIRO, J. A. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, 4(3), 257-267. (2012)

BASANO, S. D. A., & CAMARGO, L. M. A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, SP

BERMAN JD., GALLALEE D., BEST JM. (1987). Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathay, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical. Pharmacology*. 36: 197-201.

BERMAN JD., EDWARDS N., KING M., DOREA JG. (1989). Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. 40:159-164.

BEZERRA J. L.; COSTA G.C.; LOPES T. C.; CARVALHO I.C.D.S.; PATRÍCIO F.J.; SOUSA S.M.; AMARAL F.M. M.; REBELO J. M. M.; GUERRA R N.M.; RIBEIRO M. N. S.; NASCIMENTO F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.16, 631-637. (2006)

BFG. The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

BIZERRA, A., SILVA, A. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações." **Revista Saúde e Meio Ambiente** 3.2 (2016): 1-12.

BILDIK, A; KARGIN, F; SEYREK, K.; PASA, S.; ÖZENSOY, S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n.1, p.63-66, 2004.

BORBA, H. R.; AMORIM, A. 2004. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, 13 (4): 133-136.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos: Série Qualidade em Cosméticos. Brasília.** (2004)

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Formulações Farmacêuticas**, 1.ed. Brasília. (2005)

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência Geral de cosméticos. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos.** Brasília. (2008)

BRASIL. Ministério da Saúde. (2009). **Plantas Medicinais de interesse ao SUS.** Brasília.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**, 1 ed. Brasília: Anvisa. (2011)

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_481_1999_COMP.pdf/bb0b8dce-f570-4f75-acf1-49c45bf32621?version=1.0.

Acesso em: 13/02/2018.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**. (2010)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar americana. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>. Acesso em 12/03/2017

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 184p, 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde : volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de

Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017

BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia das Doencas Transmissiveis. Manual de vigilancia da leishmaniose tegumentar [recurso eletronico] / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia das Doencas Transmissiveis. – Brasilia : Ministerio da Saude, 2017. 189 p.

BRASIL, 2018. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). {Acesso em 04 de novembro de 2018}. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>

BRITTA, E. A., SCARIOT, D. B., FALZIROLLI, H., UEDA-NAKAMURA, T., SILVA, C. C., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V. (2014). Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC microbiology**, 14(1), 236.

BRITTI, D., SCONZA, S., MORITTU, V. M., SANTORI, D; BOARI, A. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Veterinary Research Communication**, v. 32, n. 1, p. 251-254, 2008.

BRITO, M. V. H.; CARVALHO, D. S.; ALBUQUERQUE, A. M. M. 2007. Efeito do extrato de mastroz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Paraense de Medicina**, 21 (1): 21-25.

BRUNING, M.C.R., MOSEGUI, G.B.G., VIANNA, C.M.M., A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, (2012)

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **J. Immunol.**, v. 166, n. 5, p. 3416-3422, 2001.

BUFFET, P. A., SULAHIAN, A., GARIN, Y.J., NASSAR, N., DEROUIN, F., Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2167-2168, 1995.

CÁCERES-DITTMAR, G., TAPIA, F.J., SÁNCHEZ, M.A., YAMAMURA, M., UYEMURA, K., MODLIN, R.L., BLOOM, B.R., CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505, 1993.

CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; MENDES, V.G.; ABREU-SILVA, A.L.; COSTA, S.C.G.; CALABRESE, K.S., Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, 201(12), 1933-1940, 2010.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de “ulcera de Bauru” avec le Bouton d’Orient. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, [S. l.], v. 2, p. 255-257, 1909.

CARVALHO, A. K. Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania(leishmania) amazonensis* e *Leishmania(Viannia) brazilienses*. (Tese de doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo-Sp, 2012.

CARVALHO, F. H.; MARTINS, G. V.; OLIVEIRA, C.; CONTRERA, M. G. D.; FERRO, D.; PAZ, J.; REGADO, S. C. H.; LOPES, R. A.; SALA, M. 2005. Ação da preparação fitoterápica usada popularmente como vermífugo ontend *Mentha villosa* L., *Bromelia antiacantha* Bertol, *Chenopodium ambrosioides* L., *Citrus sinensis* L., **Punica granatum** L. e *Cucurbita pepo* L. no camundongo. **Revista Científica da Universidade de Franca**, 5 (1): 215-222.

CHANDRASEKARAN, S., DAYAKAR, A., VERONICA, J., SUNDAR, S., MAURYA, R. (2013). An *in vitro* study of apoptotic like death in *Leishmania donovani* promastigotes by withanolides. **Parasitology international**, 62(3), 253-261.

CHARRET, K. S., LAGROTA-CÂNDIDO, J., CARVALHO-PINTO, C. E., HOTTZ, C. F., LIRA, M. L. F., RODRIGUES, R. F., AMARAL, V. F., 2013. The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. *Exp. Parasitol*, 133(2), 201-210.

CHIARA, C. GIOVANNINNI, I., SIEGEL, J. H. Plasma arginina and correlations in trauma and sepsis. *Amino Acids*. 2006;30(1):81–6

CHAUX P, MOUTET M, FAIVRE J, MARTIN F, MARTIN M (1996) Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7–1 and B7-2 costimulatory molecules of T-cell activation. *Lab Invest* 74:975–983

CHU, S. S.; HU, J. F.; LIU, Z. L. 2011. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Managemet Science*, 67: 714–718.

COÊLHO, M. D. G., XAVIER, T. B., DA COSTA, J. F., MACIEL, L. T. R., BOZO, L. S. O., DA SILVA COÊLHO, F. A., & AKISUE, G. (2017). Avaliação do uso de extratos vegetais para controle da hemoncos e em ovinos naturalmente infectados. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 12(2), 331-339.

CONNER, E.M., GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*. 12, 274-277.(1996)

COSTA, J. M. L., COSTA, A. A. U. M. L. D., ELKHOURY, A. N. S. M., BEZERRIL, A. C. R., BARRAL, A. M. P., & SALDANHA, A. C. R. (2009). Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição.

CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 148–154, 2007.

DA SILVA, L.R.F., CORDIER, P.D.C., SANTOS, R.X., VITA, A.V.D., MAIA, A.M. Avaliação da qualidade de drogas vegetais indicados pelo Sistema Único De Saúde (SUS). **Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências**, v. 1, n. 1, 2015.

DAVID, C. V., CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* 22, 491-502 (2009)

DESOTI, V. C., LAZARIN-BIDÓIA, D., SUDATTI, D. B., PEREIRA, R. C., ALONSO, A., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V., SILVA, S. Trypanocidal action of (–)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Marine drugs*, 10(8), 1631-1646. (2012).

DING, A. H., NATHAN, C. F., STUEHR, D. J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal Immunology**, 141(7), 2407-2412.

DNDi. DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. INFOLEISH. Boletim informativo da redeLeish-3.aedição, 2018. (Acesso em 05 de novembro de 2018).

Disponível em: https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2016/06/DNDi_Infoleish_Newsletter_1_PORTUGUESE_160510.pdf

EURIDES, D., MANTOVANI, M. M., MENEZES, G. F. D., SILVA, L. A. F. D., SOUZA, L. A. D., OLIVEIRA, B. J. N. A. D., BAUNGARTEN, L.B. ARRUDA, A. F. D. P. D., (2010). Efeito do concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos.

FALCÃO, S. A., WEINKOPFF, T., HURRELL, B. P., CELES, F. S., CURVELO, R. P., PRATES, D. B., DE OLIVEIRA, C. I., 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. **PLoS Negl Trop Dis**, 9(3), e0003601-e0003601.

FARIA, V. P.; SOUZA, L. M.; SILVA, I. C.; SOARES, V. E.; BELO, M. A. A.; TORRENTE, A. C. G.; SILVA, J.; MAZZONETTO, F.; CHAGAS, A. C. S. 2010. Avaliação “*in vitro*” do efeito larvicida do extrato aquoso de Erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides*), sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Saúde**, 4 (1): 127.

FIUZA, J. A., GAZE, S. T. "Journal of Immunobiology". Immune Response Profile in Susceptibility and Protection in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Immunobiology**. (2018)

FOSTER T, RYBINSKI W.V. Applications of emulsions. In: Binks BP, editor. Modern aspects of emulsion science. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 395-406. (1998)

FRANÇA, F., LAGO, E. L., & MARSDEN, P. D. (1996). Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 29(3), 229-232.

FALCÃO, S. A., WEINKOPFF, T., HURRELL, B. P., CELES, F. S., CURVELO, R. P., PRATES, D. B., DE OLIVEIRA, C. I., 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. **PLoS Negl Trop Dis**, 9(3), e0003601-e0003601.

FIRMO, W. D. C. A., DE MENEZES, V. D. J. M., PASSOS, C. E.C., Dias, C. N., ALVES, L. P. L., DIAS, I. C. L., OLEA, R. S. G. (2012). Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cadernos de Pesquisa*.

FUENTES-BAZAN, S., UOTILA, P., BORSCH, T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). *Willdenowia*, Berlin, v. 42, n. 1, p. 5-24, June (2012).

FURTADO TA. Leishmaniose tegumentar americana. In: Machado-Pinto J, editor. Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas. Rio de Janeiro: Medsi; 1994. p. 319-29;334-6.

GARRA, A. O., VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat Rev Immunol**. 2007;7(6):425-8.

GODINHO, J. L. P., SIMAS-RODRIGUES, C., SILVA, R., ÜRMENYIC, T. P., SOUZA, W., RODRIGUES, J. C. F. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International Journal of Antimicrobial Agents** 39, 326– 331, 2012.

GOLLOB, J.K., VIANA, A.G., DUTRA, W.O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 367-376, 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Londres, v.8, p. 419-433, 2010.

GOYAL, R., MACRI, L.K., KAPLAN, H.M., Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2015.

GROZEVA, N. H. CVETANOVA, Y.G. Karyological and morphological variations within the genus *Dysphania* (chenopodiaceae) in Bulgaria. **Acta Botanica Croatica**, 72 (1): 49-69; 2013.

HARWOOD, R.; PALMER, J. Flora of the Darwin Region. Darwin Region, Oxford, v. 1, n. 2, p. 01-23, 2011.

HIRONORI T., SATO, T. M. M., Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J Ethnopharmacol**. 50:27-34. (1996)

HOLZMULLER, P., GEIGER, A., NZOUMBOU-BOKO, R., PISSARRA, J., HAMROUNI, S., RODRIGUES, V., DAUCHY, F. A., LEMESRE, J.L., VINCEDEAU, P., GONÇALVES, R.B. (2018). Trypanosomatid infections: How do parasites and their excreted–secreted factors modulate the inducible metabolism of l-Arginine in macrophages?. **Frontiers in immunology**, 9, 778.

HORTA, M. F., MENDES, B.P., ROMA, E. H., NORONHA, F. S., MACEDO, J. P., OLIVEIRA, L.S., DUARTE, M. M., VIEIRA, L.Q. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012

IBRAHIM L. F., KAWASHTY S. A., BAIUOMY A.R., SHABANA M. M., EL-ERAKY W. I., EL-NEGOUMY S. I. 2007. A comparative study of the flavonoids and some biological activities of two *Chenopodium* species. **Chem Nat Compd.** 43:24–28.

IDSON, B. Stability Testing of Emulsions-Part I. Drug and cosmetic industry, v. 152, p. 27-27, 1993.

ISAAC, V. L. B., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Correa, M. A. (2009). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, 29(1), 81-96.

JUNIOR, J. A. L., COSTA, G. C., REIS, A. S., BEZERRA, J. L., PATRÍCIO, F. J., SILVA, L. A., AMARAL, F.M.M & NASCIMENTO, F. R. (2014). INIBIÇÃO DA INFECÇÃO in vitro DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis* POR EXTRATO E FRAÇÕES DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, 16(1).

KAYE P., SCOTT P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen. **Nature Reviews/ Microbiology**. 9: 604-615.

KLEIN, T., LONGHINI, R., BRUSCHI, M.L., MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 30 (3): 241-248, (2009)

KLIKS, M.M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. *SocSci Med.*, 1985; 21; 879-886.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** 13, 159–75.

KROEMER, G; GALLUZZI, L; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, (2007)

KUMAR, R., MISHRA, A.K., DUBEY, N.K., TRIPATHI, Y.B. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. **Int J Food Microbiol** 115(2):159–64.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br. Med. Bull.* [S. l.], v. 28, p. 44-48, 1972.

LAINSON R, SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendric K, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.

LAINSON R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina** 1997; 11(1): 29-40.

LAINSON R, SHAW JJ. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Microbial Infections* (9 a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LÉVÊQUE, C. A biodiversidade. Bauru: Ed. Da Universidade Sagrado Coração, 1999.

LEZAMA-DÁVILA, C. M., PAN, L., ISAAC-MÁRQUEZ, A. P., TERRAZAS, C., OGHUMU, S., ISAAC-MÁRQUEZ, R., PECH-DZIB, M. E., CALOMENI, E., PARINANDI, N., KINGHORN, A. D., SATOSKAR A. R. Pentalinon andrieuxii root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy research*, 28(6), 909-916. (2014)

LIEW, F. Y., LI, Y., MILLOT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol*.145(12):4306-10. (1990)

LIMA, P. C., SANTOS, M. G., CALABRESE, K. S., SILVA, A. L. A. & ALMEIDA, F. Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v.44, n.1, p.45-55, (2015).

JUNIOR, JOSÉ A.C. LIMA, COSTA, G. C., REIS, A. S., BEZERRA, J. L., PATRICIO, F. J., SILVA, L. A., AMARAL, F. M. M., NASCIMENTO, F. R. F. Inibição da infecção in vitro de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, 2014.

LIU, D., & UZONNA, J. E. . The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 83, 2012. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>.

LUNA, L.G. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York : McGraw Hill, 1968. 258p.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Intituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 542p.

MACHADO, J. L., ASSUNÇÃO, A. K. M., DA SILVA, M. C. P., REIS, A. S. D., COSTA, G. C., ARRUDA, D. D. S., ROCHA, B.A., VAZ, M.M.O.L.L., PAES, A.M.A., GUERRA, R.N.M., & BERRETTA, A. A. (2012). Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

MACIEL, M.C.G.; BARRAQUEIRO, E.S.B.; AZEVEDO, A. P. S.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação do efeito cicatrizante do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) em feridas de pele induzidas em camundongos. *Revista de Ciências da Saúde*, 9, 2007;11-18.

MAIA, E., ANA N. S, et al. "SisLeish: A multi-country standardized information system to monitor the status of Leishmaniasis in the Americas." **PLoS neglected tropical diseases** 11.9 (2017): e0005868.

MAITY, P.C., BHATTACHARJEE, S., MAJUMDA, S., SIL, A.K., 2009. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. *Inflamm. Research*. 58,22–29.

MARTIN, S.J, REUTELINGSPERGER C.P, MCGAHON A.J, RADER J.A, VAN SCHIE R.C, LAFACE D.M, GREEN D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, v.182, p.1545-1556, 1995.

MANSUETO, P., SEIDITA, A., VITALE, G., CASCIO, A., Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? *Travel Medicine and Infectious Disease* .2014. Volume 12 , Issue 6 , 617 – 627

MASPI, N., ABDOLI, A., GHAFARIFAR, F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, (2016)

MENDES, L., MAIA FILHO, A. L. M., NASCIMENTO, L. R. S., COSTA, C. L. S., SERVIO, E. M. L., SANTOS, I. M. S. P., ARAUJO, K. S. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde** [en línea] 2011.

Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92920013005>> ISSN 1677-1028

MENDONÇA FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S. (2003). Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande - RJ. *Rev. Bras. Farmacogn.*, n. 13, supl., p.55-58.

MILLS, C. D.. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 6, p.1-12, 5, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>.

MILLS, C. D. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 6, p.1-12, 5. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>. (2015)

MACIEL, M.C.; FIALHO, E.M.; GUERRA, R.N; BORGES,V.M.; KWASNIEWSKI, F.H; NASCIMENTO, F.R. Tityus serrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon*, 89, 1-8. (2014)

MIRANDA, G.S.; SANTANA, G. S.; MACHADO, B. B., COELHO, F.P., CARVALHO, C.A. In vitro antibacterial activity of four plant species at different alcoholic contents. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 15:1,104-11, 2013.

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

MORENO E., SCHWARTZ J., LARREA E., CONDE I.E, F., S. CARMEN, I. J. MANUEL, ESPUELAS S., Assesment of β - lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015.

MUGANZA, D. M., FRUTH, B., NZUNZU, J.L., TUENTER, E., FOUBERT, K., COS, P., MAES, L., KANYANGA, R.C., EXARCHOU. V., APERS, S., PIETERS, L. In vitro antiprotozoal activity and cytotoxicity of extracts and isolated constituents from *Greenwayodendron suaveolens*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 193, p. 510-516, 2016.

MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GOERDT, S., ... WYNN, T. A. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p.14-20, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.

NASCIMENTO, K.A.F. *Chenopodium ambrosioides* L: do uso popular ao bioproduto com atividade cicatrizante. 2014.

NASCIMENTO, F. R.F.; CRUZ, G. V.B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C.G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, E. S. B.; GUERRA, R. N.M. 2005. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Sciences, 78: 2650 – 2653.

NASCIMENTO, F. R. F., GOMES, E. A., RUSSO, M., LEPIQUE, A. P. Interferon regulatory factor (IRF)-1 is a master regulator of the cross talk between macrophages and L929 fibrosarcoma cells for nitric oxide dependent tumoricidal activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2015.

NATHAN, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat. Rev Immunol. 6,173–182.

NEIVA, V.A.; AMARAL,F.M.M.; CARTÁGENES, M.S.S.; MORAES-COUTINHO,D.F.; NASCIMENTO, F.R.F.;REIS,A.S.; RIBEIRO, M.N.S. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**, São Luís, v.13, n.2, p155-165,jul-dez, 2011

NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 12^a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Trends in Parasitology**, v.31, n.12, p.653-664, 2015.

OLIVEIRA, C. I. D., BARRAL-NETTO. M., 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Gaz. Méd Bahia, 74(1).

OLIVEIRA, J.C. Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, M. J. A. Obtenção de Membranas de Hidrogéis para tratamento alternativo de Leishmaniose Tegumentar [Tese de Doutorado]. Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018.
Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses cutânea e mucosa 2016. Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: http://www.panaftosa.org/leish/inf2016_pt/INFO_BRA_PORTUGUES_2016.pdf

OUAKAD, Meriem et al. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1392-1399, 2011.

PALMER, E. M., FARROKH-SIAR, L., SEVENTER, J. M. V., SEVENTER, G. A. V., IL-12 decreases activation-induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. I. IL-12 alters caspase processing and inhibits enzyme function. **J Immunol.** 167(2):749-58. (2001)

ORTEGA-RAMIREZ, L. A., GARCIA, I.R., LEYVA, J.M., CRUZ-VALENZUELA, M. R., SILVA-ESPINOZA, B.A., GONZALEZ-AGUILAR, G.A., SIDDIQUI, M.W., AYALA-ZAVAL, J.F. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, p. R129-R137, 2014.

PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; PEREIRA, P.V.S.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; REBÊLO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F., 2008. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 115, 313–319.

PESSOA S.B. Classificacao das leishmanioses e das espécies do genero *Leishmania*. Arq Fac Hig S Paulo. 1961;26:41-50.

PENTCHEVA-HOANG, T., CHEN, L., PARDOLL, D. M., ALLISON, J. P. . Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 104, n. 45, p. 17765-17770, (2007)

PEREIRA, W.S., RIBEIRO, B.P., SOUSA, A.I.P., SERRA, I.C.P.B., MATTAR, N.S., FORTES, T.S., REIS, A.S., SILVA, L.A., BARROQUEIRO, E.S.B., GUERRA, R.N.M., NASCIMENTO, F.R.F., 2010. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 127, 602-605.

PESSOA SB. (1958). *Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 5a ed.

PESSÔA S.M. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

PETERSON, G.S., M.A. KANDIL, M.D. ABDALLAH & FARAG, A.A.A. 1989. Isolation and characterization of biologically active compounds from some plants extracts. *Pest. Sci.* 25: 337-342.

PICK E, MIZEL DJ 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods** 46: 211-226.

PICK E; KEISARI Y 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**. 38: 161-170.

PIRES, A.M., COSTA, G.C., GONÇALVES, E.G.R., ALVIM, A.C., NASCIMENTO, F.R.F. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma revisão. *Revista de ciências da saúde*, 2012.

PIRMEZ, C., YAMAMURA, M., UYEMURA, K., PAES-OLIVEIRA, M., CONCEIÇÃO-SILVA, F., MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395, 1993.

PRATA, M.B., Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.3, n.2, p.43-48, 1988.

PRISTA L, N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1995. 786 p.

PODOLAK, I., OLECH, M., GALANTY, A., ZAŁUSKI, D., GRABOWSKA, K., SOBOLEWSKA, D., MICHALIK, M., NOWAK, R. 2016. Flavonoid and phenolic acid profile by LC-MS/MS and biological activity of crude extracts from *Chenopodium hybridum* aerial parts. **Nat Prod Res**. 30:1766–1770.

QUINNELL, R., COURTENAY, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915-1934. doi:10.1017/S0031182009991156

RABELLO, E. Formes cliniques de la leishmaniose tégumentaire. In: CONGRÈS DES DERMATOLOGISTES ET SYPHILIGRAPHES DE LANGUE FRANÇAISE, 12., 1923, Strasbourg. [Annales...]. Strasbourg: [s.n.], 1923.

RABELLO E. (1925). Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil I. História e sinonímia. *Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia*. 1: 3-29.

RANE, M. M., MENGI, S. A., Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark on incision and excision wounds in rats. **Fitoterapia**. 74:553-558. (2003)

REIS, A. S., RIOS, C. E. P., MELO, L. P., COSTA, G. C., SILVA, L. A., PATRÍCIO, F. J., AMARAL, F.M.M. & NASCIMENTO, F. R. (2012). ATIVIDADE LEISHMANICIDA in vitro DE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C., LOUZIR, M. D. H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, New York, v. 7, p. 581-596, 2007.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. *Cosmet. Toiletries*, v. 8, n. 5, p. 47-53, 1996.

RIOS, C. E. P.; ABREU, A. G.; FILHO, J. A. F. B. *Chenopodium ambrosioides* L . Improves Phagocytic Activity and Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. February, p. 1–7, 2017.

RODRIGUES, O. R., MARQUES, C., SOARES-CLEMENTE, M., FERRONHA, M. H., & SANTOS-GOMES, G. M. (2009). Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**, 214(2), 101-111.

RODRIGUES, T. S., GUIMARÃES, S. F., RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G., & GABRIEL, J. V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, 2011.

RUSSO, M., TEIXEIRA, H. C., MARCONDES, M. C., & BARBUTO, J. A. (1989). Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian journal of medical and biological research**, 22(10), 1271-1273.

SALAIZA-SUAZO, N., VOLKOW, P., TAMAYO, R.P., MOLL, H., GILLITZER, R., PÉREZ-TORRES, A., PÉREZ-MONTFORT, R., DOMÍNGUEZ, J.D., VELASCO-CASTREJÓN, O., CRIPPA, M., BECKER, I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Trop Med Int Health** 4: 801-811, 1999.

SALDANHA L.L., WAGNER V, ANNE L.D. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR." *Molecules* 18, no. 7 8402-8416. 2013

SANTOS R.V., COIMBRA JR.C.E.A. Saúde e Povos Indígenas. Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ; 1994.251p.

SANTOS, A. P. S. A., BARBUTO, J. A. M. Efeito microambiente tumoral sobre características funcionais e fenotípicas de células dendríticas geradas in vitro a partir de monócitos do sangue periférico de voluntárias saudáveis e pacientes com câncer de mama. 2010. 110p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2010.

SARKAR, A., SAHA, P., MANDAL, G., MUKHOPADHYAY, D., ROY, S., SINGH, S.K., DAS, S., GOSWAMI, R.P., SAHA, B., KUMAR, D., DAS, P., CHATTERJEE, M., 2011. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: its applicability in patients with visceral leishmaniasis. **Cytometry A**. 79(1), 35-45.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p.581-592, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.72>.

SENNA, L. 2015. *Dysphania* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB139759>

SERENO D, HOLZMULLER P, LEMESTRE JL. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop*2000; 74:25-31.

SHARQUIE, E. K; NOAIMI, A. A.; AL-GHAZZI, G. A. Treatment of cutaneous leishmaniasis by topical 25% podophyllin solution (single, blinded, therapeutic, controlled study). **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, v. 19, n. 2, p. 108-113, 2015.

SHAW J.J. Taxonomia do genero *Leishmania*. tradicionalista x conceito moderno. *An Bras Dermatol*. 1985;60:67-72.

SHAW JJ. (2006). Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the a etiologial agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101:577-579.

SILVA JÚNIOR, J. O. C., Vieira, J. L. F., BARBOSA, W. L. R., & PEREIRA, N. L. (2011). Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L.

SILVA, R. C. S; ALMEIDA, J. C. R.; ALMEIDA, A. A. S.; AKISUE, G.; COELHO, M. D. G. Avaliação da toxicidade dos extratos do Araribá (*Centrolobium tomentosum*) com utilização do ensaio com *Artemia salina*. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, supl., p. 158- 167, 2013. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1374>

SILVEIRA FT, LAINSON R, BRITO AC, OLIVEIRA MRF, PAES MG, SOUZA AAA, SILVA BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. Doenças Infecçiosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP; 1997.

SINGH, S., Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of Leishmania–HIV co-infection in India. *International Journal of Infectious Diseases*, Hamilton, 9, p. 103–112, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; SIMON, D. O guia Decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita. Rio de Janeiro: Campus, 2001.

SOTO J., ARANA BA., TOLEDO J., RIZZO N., VEJA JC., DIAZ A., LUZ M., GUTIERREZ P., ARBOLEDA M., BERMAN JD., JUNGE K., ENGEL J., SINDERMAN, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease*, 38: 1266-72.

SOUSA, A. K. S. Avaliação do tratamento de lesões induzidas pela infecção por *Leishmania amazonensis* com formulação farmacêutica a base do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. 2015. Dissertação (Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão

SOUZA, A. P. O., OLIVEIRA, R. M., OLIVEIRA, S. F., & FORTUNA, J. L. (2015). Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, 11(7), 9.

STOCKDALE, L, ROBERT, N. "A review of preventative methods against human leishmaniasis infection." **PLoS neglected tropical diseases** 7.6 (2013): e2278.

STRAUSS-AYALIA, D.; BANETHA, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, p. 547–564, (2007)

SONG, M.; LEE, S.; KIM, D. 2011. Antidiabetic effect of *Chenopodium ambrosioides*. *Phytopharmacology*, 1(2): 12-15.

SU, H.C.F. 1991. Toxicity and repellency of *Chenopodium* oil to four species of stored product insects. *J. Entomol. Sci.* 26: 178-182

SUNDAR S., JHA T.K., THAKUR C.P., ENGEL J., SINDERMAN H., FISHER C., JUNGE K., BRYCESON A., BERMAN J. (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*. 28:1739-1746.

TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL M., RODRIGUES J.C.F., CREPALDI P.H., PIMENTA P.F.P., DE SOUZA W. (2013). The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathogens**.9: 10

TIUMAN, T. S. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, Hamilton, v. 15, n. 8, p. 525-532, 2011.

TORRES-GUERRERO, E., CEDILLO, M. R. Q., ESMENJAUD, J.R. Leishmaniasis: a review. *F1000 Research*, v. 6, 2017.

VERAS, P. S. T., RAMOS, P. I. P., MENEZES, J. P. B. In search of biomarkers for pathogenesis and control of leishmaniasis by global analyses of *Leishmania*-infected macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, 2018.

VERLOOVE, F. A new combination in Oxybasis (Amaranthaceae). *New Journal of Botany*, New York, v. 3, n. 1, p. 59-60, 2013.

URTEAGA-BALLON, O., 1991. Medical representation of nasal leishmaniasis and surgical amputation in ancient Peruvian civilization. In: *Paleopathology: Current Synthesis and Future Options* (D. J. Ortner & A. C. Aufderheide, Orgs.), pp. 95-104. Washington: Smithsonian Institution.

WILGUS, T.A., ROY, S., MCDANIEL, J.C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. **Advances in wound care**, v. 2, n. 7, p. 379-388, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010 First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 949: 1-186.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010." WHO technical report series 949 (2010).

WORLD HEALTH ORGANIZATION - The world medicines situation 2011. *Traditional medicines: global situation, issues and challenges*. Geneva. 12p. 2011

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Situation and trends
Disponível em http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/, acesso em: 12/03/2017.

ZHANG, Q.W., LIU, L., GONG, C.Y., SHI, H.S., ZENG, Y.H., WANG, X.Z., ZHAO, Y.W., WEI, Y.Q. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a metaanalysis of the literature. **PLOS One**, 7 (12): e509-46; 2012.

ZOHRA, T., OVAIS, M, TALHA, A. K., QASIM, M., AYAZ, M. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Natural product research**, v. 33, n. 1, p. 136-142, 2019.

9. ANEXO

Anexo A Identificação botânica da espécie vegetal

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

São Luís, 10 de Julho de 2017.

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação realizada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará, em breve, devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
9.349	GOMES, L. N. e E.B. Almeida Jr. (01)	Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants

Atenciosamente,

Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

Anexo B Laudo dos componentes da pomada base



CERTIFICADO DE ANÁLISE
B.H.T.

Lote AUTO199302
 Fabricação: 25/01/16
 Validade: 24/01/18
 Procedência: BRASIL

Formula: C15H24O
 No DCB: 01627
 Nomenclatura INCI: BHT
 No CAS: 128-37-0

Origem: ESPANHA
 Lote Fabricante: 01103416
 Ordem Fraciona: 032366
 Nome Fabricante: OXIRIS

Peso Molecular: 220.35

Parâmetros	Especificado	Resultados
Aparência	Cristais branco	De acordo
Ponto de Fusão (°C)	Entre 69,00 e 71,00	70,00
Resíduo de ignição (%)	Máximo 0,002000	0,000000
Ensaio realizado pelo fabricante		
Cor (APHA)	Máx. 30 (solução 30% em acetona)	5
Pureza (%)	Mínimo 99,80	99,98
Água (%)	Máximo 0,1200	0,0510
Arsênio	Máx. 3 ppm	< 3
Chumbo	Máx. 2 ppm	< 2
Mercurio	Máx. 1 ppm	< 1
Metais Pesados - Pb	Máx. 10 ppm	< 10

*Fotografia: Metodologia interna.

Conservar fechado ao abrigo da luz solar direta em temperatura entre 15 - 30° C.

Elaborado de acordo com as especificações descritas.

CBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal.

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP.14.851



Dr. Valdir Martin Caña
 Farmacêutico Industrial
 CRF- SP.32.352





Departamento técnico

01/06/16
Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278-080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE
LANOLINA ANIDRA

Lote: AUTO181279
Fabricação: 17/03/15
Validade: 16/03/17
Procedência: BRASIL

Origem: BRASIL
Lote Fabricante: 0000981657
Ordem Fraciona: 029430
Nome Fabricante: CRODA

Formula: S.D
No DCB: 05161
Nomenclatura INCI: Lanolin
No CAS: 8006-54-0

Peso Molecular: . . .

Parâmetros	Especificado	Resultados
Aparência	Semi sólido	De acordo
Cor	Amarelo	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Ponto de Fusão (°C)	Entre 38,00 e 44,00	39,00
Alcalinidade	Teste	De acordo
Amônia	Teste	De acordo
Cloreto	Teste	De acordo
Índice de Acidez (mgKOH/g)	Máximo 1,00	0,76
Índice de Iodo (gI ₂ /100g)	Entre 18,00 e 36,00	26,72
Cinzas Sulfatadas (%)	Máximo 0,10	0,07
Absorção de Água (°C)	Entre 200,00 e 300,00	250,86
Substâncias Solúveis em água	Teste	De acordo
Oxidáveis solúveis em água	Teste	De acordo
Ensaios realizados pelo fabricante		
Cor (Gardner)	Máx: 9	9
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	Entre 90,00 e 105,00	92,54
Umidade (%)	Máximo 0,25	0,07
Índice de Peroxido (meq O ₂ /kg)	Máximo 20,00	15,43
Perda por Secagem (%)	Máximo 0,50	0,09
BHT	< 200 ppm	131,67

Monografia FB IV e: metodologia do fabricante.

Conservar fechado ao abrigo da luz solar direta em temperatura entre 15 - 30° C

Aprovado de acordo com as especificações descritas.

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
Farmacêutico Bioquímico
CRF - SP: 14.851

Ana Carolina Massarani Ramos
Farmacêutica
CRF- SP 35.022

29/12/15

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br


CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

 Autorização de Funcionamento M.S.:1.01284-7
 Aut.Especial de Funcionamento M.S.:1.10238-0

 Página 18/16
 Impressão 17/03/16 15:47
 NF. 121.844 de 17/03/2016

 Insumo: **VASELINA SOLIDA**

Lote : 15116181E	Origem : U.S.A	Fabric : 08/2015
Lote Fab: 635734	Procedencia : Brasil	Validade : 08/2018
Formula : NADA CONSTA	PM : N/C	Frac : 1593715 24/11/2015
DCB : 09104	CAS : 308069-07-0	

Ensaio	Especificação	Resultado	Referencia
* DESCRIÇÃO	MASSA UNTUOSA BRANCA OU LIGEIRAMENTE AMARELADA	MASSA UNTUOSA LIGEIRAMENTE AMARELADA	USP - 38
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM BENZENO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM DISSULFETO DE CARBONO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	SOLÚVEL EM ÓLEOS FIXOS	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	SOLÚVEL EM HEXANO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	SOLÚVEL EM ÉTER ETÍLICO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	POUCO SOLÚVEL EM ÁLCOOL QUENTE OU FRIO, EM ÁLCOOL DESIDRATADO FRIO	CONFORME	USP - 38
* SOLUBILIDADE	INSOLÚVEL EM ÁGUA	CONFORME	USP - 38
* PONTO DE FUSÃO	38°C - 60°C	42°C	USP - 38
* DENSIDADE RELATIVA	0,815 - 0,880 g/mL A 60°C	0,839 g/mL	USP - 38
RESÍDUO POR IGNIÇÃO	MÁXIMO: 0,05%	0,00%	USP - 38
ÁCIDOS ORGÂNICOS	PASSA	PASSA	USP - 38
ALCALINIDADE	PASSA	PASSA	USP - 38
ÓLEOS FIXOS, GORDURAS E ROSIN	PASSA	PASSA	USP - 38
ACIDEZ	PASSA	PASSA	USP - 38
COR	PASSA	PASSA	USP - 38
SOLVENTE RESIDUAL	NENHUM	NENHUM	USP - 38
TAXA DE ODOR	MÁXIMO: 1,0	0,5	FABRICANTE
COR LOVIBOND, 3IN, AMARELA	MÁXIMO: 1,0	0,2	FABRICANTE
CONSISTÊNCIA	170 - 200 dmm	196 dmm	FABRICANTE
PONTO DE FUSÃO	125,0 - 140,0°F	133°F	FABRICANTE

NOMENCLATURA : VASELINA SOLIDA

Ficha de Segurança

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DA LUZ, CALOR E UMIDADE. TEMPERATURA AMBIENTE.

OBS: (*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA CNPJ: 44.015.477/0006-20 e os demais ensaios foram transcritos conforme o Certificado de Análise do Fabricante



Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP:65.711

☒ Aprovado
☐ Reprovado

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

 R Jose Semiao Rodrigues Agosti, 1370
 Cep 06833-300 Centro Log. Embu - SP

 Fone 11 4785-5600
 www.fagron.com.br

Anexo C Protocolo CEUA/UFMA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Obtenção de bioproducto antileishmania para fins terapêuticos**" registrada com o nº 23115.005550/2016-07, sob a responsabilidade de Lucilene Amorim Silva que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/02/2017 à 28/02/2019
Espécie/linhagem/raça	Balb/c
Nº de animais	60 Balb/c
Peso/Idade	20-30g / 3-4 meses
Sexo	Machos
Origem	UNICAMP

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
UFMA