

## INIBIÇÃO DA INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis* POR EXTRATO E FRAÇÕES DE *Chenopodium ambrosioides* L.

LIMA JUNIOR, José A. C.<sup>1</sup>

COSTA, Graciomar C.<sup>2</sup>

REIS, Aramys S.<sup>3</sup>

BEZERRA, Jeamile L.<sup>4</sup>

PATRÍCIO, Fernando J. B.<sup>4</sup>

SILVA, Lucilene A.<sup>5</sup>

AMARAL, Flavia M. M.<sup>6</sup>

NASCIMENTO, Flávia R. F.<sup>5</sup>

**Resumo:** A utilização de espécies vegetais, como *Chenopodium ambrosioides* L., para o tratamento da leishmaniose na terapêutica tradicional tem despertado interesse na busca de novos compostos mais eficazes e menos tóxicos. Nosso grupo demonstrou as atividades imunestimuladora e anti-*Leishmania in vivo* do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *C. ambrosioides* e efeito anti-promastigota *in vitro* do EBH e das suas frações. Neste trabalho, avaliou-se a atividade anti-*Leishmania* do EBH e suas frações acetato de etila (FAC) e clorofórmica (FCHCl<sub>3</sub>) em macrófagos infectados *in vitro* por *Leishmania amazonensis*. Foram realizados dois modelos: “profilático” e “terapêutico”. No primeiro, macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram tratados com EBH, FAC ou FCHCl<sub>3</sub> nas concentrações de 62,5µg/mL, 125µg/mL e 250µg/mL e, após 4 horas, infectados com formas promastigotas do parasito na razão de 1:10 por 24 horas. No segundo, os macrófagos foram infectados com promastigotas (1:10) e, após 4 horas, tratados com EBH, FAC ou FCHCl<sub>3</sub> por 24 horas. Foram então realizados a quantificação das amastigotas fagocitadas e o cálculo das taxas de infecção. No modelo “profilático”, apenas os macrófagos expostos ao EBH nas maiores concentrações apresentaram taxas de infecção inferiores ao controle negativo. Entretanto, no modelo “terapêutico”, as três concentrações de EBH e também da FAC reduziram a infecção de macrófagos em relação ao controle negativo, sendo a maior concentração do EBH mais efetiva inclusive que o controle positivo. Em conclusão, o EBH de folhas de *C. ambrosioides* e a sua FAC possuem efeito terapêutico anti-*Leishmania* na infecção *in vitro* de macrófagos.

**Descritores:** Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*; *Chenopodium ambrosioides*.

**Abstract: Inhibit of *in vitro* macrophage infection by *Leishmania amazonensis* by extract and fractions from *Chenopodium ambrosioides* L.** The use of plant species such as *Chenopodium ambrosioides* L. for the treatment of leishmaniasis in traditional medicine has aroused interest in finding new, more effective and less toxic compounds. Our group demonstrated the immunostimulatory and *in vivo* anti-*Leishmania* activities of the crude hydroalcoholic extract (HCE) from *C. ambrosioides* L. and the *in vitro* anti-promastigote effect of the HCE and its fractions. In this study, we evaluated the anti-*Leishmania* activity of the HCE and its fractions ethyl acetate (FAC) and chloroform (FCHCl<sub>3</sub>) in macrophages infected *in vitro* with *Leishmania amazonensis*. Two models, “prophylactic” and “therapeutic”, were performed. In the first, Swiss mice peritoneal macrophages were treated with HCE, FAC or FCHCl<sub>3</sub> in concentrations of 62,5µg/mL, 125µg/mL and 250µg/mL and, after 4 hours, infected with promastigote forms in the ratio of 1:10 for 24 hours. In the second model, the macrophages were infected with promastigotes (1:10) and, after 4 hours, treated with HCE, FAC or FCHCl<sub>3</sub> for 24 hours. Quantification of phagocytosed amastigotes and calculation of infection rates were then performed. In the “prophylactic” model, only macrophages exposed to the highest concentrations of HCE presented infection rates lower than the negative control. However, in the “therapeutic” model, the three concentrations of both the HCE and FAC reduced the infection of macrophages compared to the negative control, with the highest concentration of HCE being even more effective than the positive control. In conclusion, the HCE from leaves of *Chenopodium ambrosioides* and its FAC have an anti-*Leishmania* therapeutic effect on the *in vitro* macrophages infection.

**Descriptors:** Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; *Chenopodium ambrosioides*.

### INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as seis doenças tropicais de maior relevância no mundo, com cerca de 12 milhões de indivíduos infectados em 88 países e 360 milhões sob risco de desenvolver a infecção<sup>29</sup>. No Brasil, a região Nordeste é aquela

que registra o maior número de casos, representando o Maranhão o segundo estado em número de registros com total de 9.734 casos entre 2009 e 2012, ficando atrás apenas da Bahia<sup>12</sup>. Tais números apontam a leishmaniose tegumentar como relevante problema de saúde pública, cujo manejo ainda é um importante desafio clínico.

<sup>1</sup> Graduando em Medicina - UFMA.

<sup>2</sup> Doutor em Patologia Humana - Fiocruz-BA.

<sup>3</sup> Doutorando em Ciências - USP.

<sup>4</sup> Doutores em Biotecnologia - RENORBIO.

<sup>5</sup> Professoras do Departamento de Patologia - UFMA.

<sup>6</sup> Professora do Departamento de Farmácia - UFMA.

Atualmente, os medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose no Brasil são os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos como quimioterápicos na década de 1940. Anfotericina B desoxicolato ou lipossomal são as drogas de segunda escolha na terapêutica, indicadas para gestantes, portadores do vírus HIV e/ou indivíduos maiores de 50 anos, submetidos a transplante ou com doença renal crônica, respectivamente<sup>13</sup>. Contudo, a utilização destas drogas é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral e a elevada toxicidade hepática, renal, gastrointestinal e cardiovascular, podendo ocasionar arritmias fatais e até morte súbita. Além disso, há relatos de resistência parasitária devido à baixas dosagens e tratamentos descontínuos<sup>21,25</sup>.

Diante da necessidade de identificar novos compostos anti-*Leishmania* mais eficazes e menos tóxicos em relação às drogas convencionais, pesquisadores têm buscado o isolamento de substâncias a partir de espécies vegetais, particularmente aquelas já utilizadas terapêuticamente pelas populações de áreas endêmicas para a doença. Até o presente momento, substâncias pertencentes a diversas classes, como a dos alcaloides, terpenos, flavonoides, benzopirenos, compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas possuem comprovada atividade anti-*Leishmania*<sup>3,7,27</sup>.

Em áreas do Nordeste brasileiro é comum o uso de plantas no tratamento alternativo de úlceras causadas por *Leishmania* spp., a exemplo da espécie *Chenopodium ambrosioides* L.<sup>6,16,17</sup>. Essa espécie possui ampla distribuição global, sendo utilizada em muitas regiões como pró-cinético, antiespasmódico<sup>22</sup>, tônico<sup>11</sup>, antir-reumático e antipirético<sup>5</sup> e considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das espécies mais utilizadas como remédio tradicional no mundo<sup>9</sup>. No Brasil, esta espécie é popularmente conhecida como erva-de-santa-maria, mastruz ou mastruço, com uso largamente difundido em todo o país<sup>8</sup>.

Bezerra<sup>2</sup> et al. (2006) realizaram avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* para formas promastigotas de *L. amazonensis* de dez extratos vegetais

selecionados com base em levantamentos etnofarmacológicos e relação quimiotaxonômica, demonstrando que o extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *C. ambrosioides* é ativo na inibição dos parasitos flagelados. Posteriormente, foi mostrado que essa atividade está relacionada às substâncias presentes nas frações hexânica e clorofórmica do EBH<sup>26</sup>. Em estudo *in vivo*, Patrício<sup>23</sup> et al. (2008) observaram que o EBH de *C. ambrosioides* induz uma significativa redução da disseminação da infecção por *L. amazonensis* em camundongos quando utilizado por via intralesional, sugerindo que a ação pró-inflamatória local do EBH estaria controlando a infecção.

Já foi demonstrado que a espécie *C. ambrosioides* apresenta um efeito imunoestimulador, com aumento do recrutamento celular para órgãos linfóides secundários, além de provocar aumento da atividade macrofágica, com maior espriamento, fagocitose e produção de óxido nítrico (NO)<sup>4</sup>. Além disso, Nascimento<sup>20</sup> et al. (2006) observaram que o tratamento com o extrato de *C. ambrosioides* administrado 48 horas antes ou após a implantação do tumor de Ehrlich na pata ou cavidade peritoneal de camundongos reduziu o crescimento tumoral, via ativação macrófagos, células que cruciais na inibição do crescimento de neoplasias e microorganismos, principalmente pela produção de metabólitos do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitrogênio (NO) e citocinas<sup>18,19</sup>.

Sabendo que o extrato de *C. ambrosioides* induz ativação de macrófagos e sabendo ainda que esta espécie possui efeito anti-*Leishmania in vivo*, estabelecemos a hipótese de que macrófagos estimulados pelo extrato ou frações de *C. ambrosioides*, antes ou após a infecção, poderia controlar melhor a infecção por promastigotas de *L. amazonensis*. Para testar esta hipótese, foi usado ensaio de infecção *in vitro* de macrófagos com promastigotas de *L. amazonensis*, que simula uma situação de infecção *in vivo*<sup>10</sup>, em dois protocolos de estimulação dos macrófagos, profilático e terapêutico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *C. ambrosioides* foi realizada no Herbário Paz e Harmonia, São José de

Ribamar – MA. A identificação foi feita no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão. Realizou-se coleta manual do material vegetal por volta das 8:00h da manhã, visando a manutenção de sua integridade e minimizando perdas de compostos voláteis, tais como óleos essenciais, um dos principais grupos responsáveis pela ação farmacológica do *C. ambrosioides*<sup>28</sup>, pela interferência de temperatura elevada no período de coleta.

### **Preparação do extrato bruto hidroalcoólico**

As folhas de *C. ambrosioides* foram dessecadas a 37°C. Depois de trituradas, foram maceradas em uma solução hidroalcoólica a 70%. A mistura permaneceu sob agitação durante seis dias, sendo em seguida submetida à filtração e concentração em rotoevaporador, para obtenção do extrato seco. Posteriormente, o extrato foi pesado para o cálculo do rendimento<sup>23</sup>. Foi obtido um rendimento de 18,48% em relação às folhas secas.

### **Fracionamento do Extrato**

O fracionamento foi realizado pela partição sequencial com solventes de polaridade crescente (clorofórmio e acetato de etila), a partir de uma solução hidroalcoólica do extrato seco de *C. ambrosioides*. Todas as frações obtidas, inclusive a hidroalcoólica remanescente, foram concentradas até total secagem, em evaporador rotatório.

### **Parasitas**

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em garrafas para cultura estéreis contendo meio RPMI (SIGMA®) suplementado com Soro Fetal Bovino à 10% (GIBCO®) e acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio à 27°C.

### **Animais e obtenção de macrófagos peritoneais**

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (n=4), fornecidos pelo Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Imunofisiologia em ambiente controlado. Os animais foram manipulados de

acordo com as Normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e os procedimentos avaliados pelo Comitê de ética em pesquisa da UFMA (Protocolo: 23115-012975/2008-43).

Após sacrifício precedido por anestesia com cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (25 mg/kg), a cavidade peritoneal dos animais foi lavada com 5mL de solução tamponada com fosfato (PBS) estéril para obtenção de macrófagos. A contagem total do número de células foi realizada sob microscopia óptica de luz comum, com aumento de 400x, em câmara de Neubauer, contendo 90 µL da suspensão celular e 10 µL de solução de cristal violeta. Após a contagem, as células foram centrifugadas (10 minutos, 1200 RPM, 4°C), ressuspensas em meio RPMI incompleto, ajustadas para 5x10<sup>6</sup> células/mL e distribuídas uniformemente entre os poços (5x10<sup>5</sup> células/poço) em *Chamber Slides* Lab-Teck (Nunc, Naperville, IL, USA). As lâminas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> à 5% à 37°C por 1 hora para a aderência dos macrófagos.

### **Modelos de utilização do extrato e frações de *C. ambrosioides***

Após a incubação das lâminas na estufa de CO<sub>2</sub>, os poços foram lavados com PBS estéril para remoção das células não aderentes. De acordo com o modelo executado, os procedimentos realizados seguiram as sequências descritas a seguir.

#### **“Modelo Profilático”:**

#### **(Macrófago + *C. ambrosioides*) + *L. amazonensis***

Neste modelo, os macrófagos foram expostos ao extrato ou frações de *C. ambrosioides* antes da infecção por promastigotas de *L. amazonensis*, na tentativa de simular o uso profilático de *C. ambrosioides*.

Após a lavagem das lâminas, o extrato bruto hidroalcoólico de *C. ambrosioides* e as frações acetato de etila (FAc) e clorofórmica (FCHCl<sub>3</sub>) foram adicionados em duplicata nas concentrações 62,5µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL. A escolha dessas concentrações foi baseada nas concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>) observadas em ensaios com a forma promastigota do parasito e em experimentos posteriores que avaliaram a citotoxicidade sobre macrófagos

realizados pelo nosso grupo de pesquisa<sup>24,26</sup>.

O controle negativo foi representado por poços que continham apenas macrófagos mantidos em meio RPMI completo (suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de ácido fólico, 1% de ácido pirúvico, 1% de glutamina e 1% de asparagina) e o controle positivo por poços onde foi adicionado antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) na concentração de 40 µg/mL. As lâminas foram mantidas por 4 horas em câmara de CO<sub>2</sub>, sendo posteriormente lavadas com PBS estéril para a remoção do EBH e frações.

Em seguida, foram colocadas em cada poço, 5x10<sup>6</sup> promastigotas de *L. amazonensis*/poço, resultando em uma proporção de 10 parasitos para 1 macrófago. As lâminas foram então incubadas por 24 horas em câmara de CO<sub>2</sub>. Ao término desta etapa, os poços foram lavados com PBS estéril para retirada das formas promastigotas extracelulares e as lâminas foram coradas com kit Instant-Prov<sup>®</sup> (Newprov, PR, Brazil) para posterior análise.

#### “Modelo Terapêutico”:

##### (Macrófago + *L. amazonensis*) + *C. ambrosioides*

Este modelo tentou simular a utilização terapêutica de *C. ambrosioides*, já que inicialmente ocorreu a infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* e posteriormente a exposição ao extrato ou frações de *C. ambrosioides*.

O mesmo procedimento descrito anteriormente para obtenção, contagem e ajuste do número de parasitos foi realizado. A suspensão contendo os parasitos foi distribuída uniformemente entre os poços das lâminas, obedecendo a proporção de 10 parasitos para 1 macrófago e, a seguir, estas foram incubadas por 4 horas em câmara de CO<sub>2</sub>. Após este período, os poços foram lavados para retirada dos parasitos extracelulares.

Em seguida, as mesmas doses do extrato e frações utilizadas no modelo profilático foram utilizadas em duplicata. O controle negativo foi substituído por poços que continham apenas macrófagos mantidos em meio RPMI completo e o controle positivo por poços onde foi adicionado antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) na concentração de 40 µg/mL. As lâminas foram mantidas por 24

horas em câmara de CO<sub>2</sub>. Ao término desta etapa, os poços foram lavados com PBS estéril e as lâminas coradas com kit Instant-Prov<sup>®</sup> (Newprov, PR, Brazil) para posterior análise.

#### Análise das lâminas e cálculo das taxas de infecção

A análise das lâminas foi feita mediante a contagem de 100 macrófagos por campo e da quantidade de formas amastigotas presentes no citoplasma dos macrófagos infectados. Com base nesses dados, calculou-se a taxa de infecção dos diferentes grupos, utilizando-se a fórmula abaixo<sup>24</sup>:

$$\text{Taxa de Infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{n^{\circ} \text{ total de macrófagos}}$$

#### Análise estatística

Foram calculadas as médias e erros padrões das médias (S.E.M.) das taxas de infecção para cada grupo. Utilizou-se o teste ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para comparação das médias entre vários grupos ou teste *t* de Student para comparação entre dois grupos. Significância estatística foi definida como valores de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism versão 6.0.

## RESULTADOS

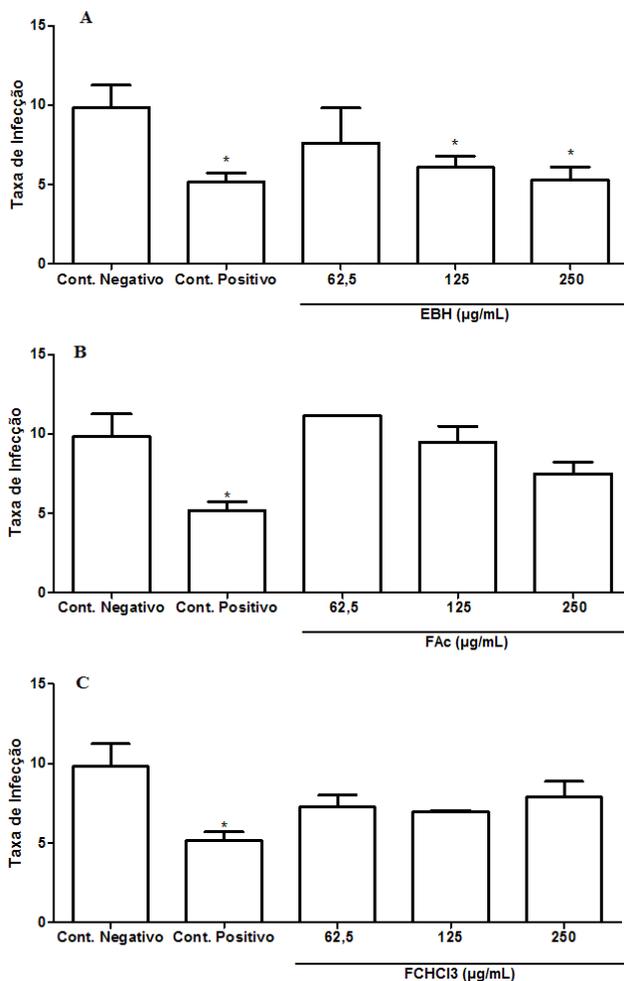
#### “Modelo Profilático”

Macrófagos pré-tratados com EBH nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL do EBH apresentaram taxas de infecção menores em comparação ao controle negativo e semelhantes à do controle positivo (Figura 1A). Não houve diferença nas taxas de infecção entre essas duas concentrações do EBH. O EBH na concentração de 62,5 µg/mL e as diferentes concentrações da FAC e FCHCl<sub>3</sub> não reduziram taxas de infecção em relação ao controle negativo (Figura 1B).

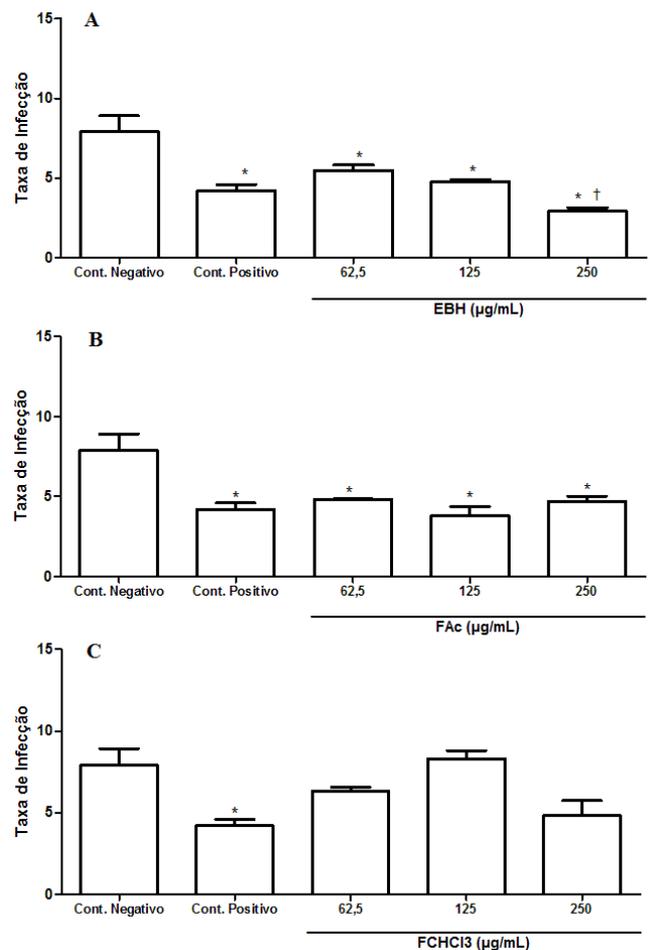
#### “Modelo Terapêutico”

No modelo terapêutico as três concentrações do EBH diminuíram a taxa de infecção quando comparadas ao controle negativo e a concentração de 250µg/mL foi inclusive mais efetiva que o controle positivo. Este efeito foi dependente da concentração

(Figura 2A). Em relação à FAc, as três concentrações também diminuíram a taxa de infecção em relação ao controle negativo, porém sem diferença estatisticamente significativa entre as mesmas (Figura 2B). Por outro lado, a FCHCl<sub>3</sub> não induziu diminuição na taxa de infecção em nenhuma das concentrações testadas (Figura 2C). O EBH nas concentrações de 125µg/mL e 250µg/mL foi igualmente ou mais eficaz na redução das taxas de infecção que as três concentrações da FAc, respectivamente.



**Figura 1 - Taxas de infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* no modelo “profilático”.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram tratados com o EBH de *C. ambrosioides* ou suas frações FAc ou FCHCl<sub>3</sub> nas concentrações de 62,5µg/mL, 125µg/mL e 250µg/mL por 4 horas e, posteriormente, infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 1:10 por 24 horas. As formas amastigotas fagocitadas foram quantificadas e as taxas de infecção calculadas. Os dados representam a média ± S.E.M. A) Taxas de infecção de macrófagos tratados com o EBH e nos grupos controle negativo e positivo. B) Taxas de infecção de macrófagos tratados com a FAc e nos grupos controle negativo e positivo. C) Taxas de infecção de macrófagos tratados com a FCHCl<sub>3</sub> e nos grupos controle negativo e positivo. \*p<0,05 em relação ao grupo controle negativo.



**Figura 2 - Taxas de infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* no modelo “terapêutico”.** Macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 1:10 por 4 horas e, posteriormente, tratados com o EBH de *C. ambrosioides* ou suas frações FAc ou FCHCl<sub>3</sub> nas concentrações de 62,5µg/mL, 125µg/mL e 250µg/mL por 24 horas. As formas amastigotas fagocitadas foram quantificadas e as taxas de infecção calculadas. Os dados representam a média ± S.E.M. A) Taxas de infecção em macrófagos tratados com o EBH e nos grupos controle negativo e positivo. B) Taxas de infecção em macrófagos tratados com a FAc e nos grupos controle negativo e positivo. C) Taxas de infecção em macrófagos tratados com a FCHCl<sub>3</sub> e nos grupos controle negativo e positivo. \*p<0,05 em relação ao grupo controle negativo. \*p<0,05 em relação ao grupo controle positivo.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrada a eficácia do EBH de *C. ambrosioides* tanto no modelo “profilático” quanto no “terapêutico” de infecção *in vitro*

por *L. amazonensis*. No primeiro modelo, as doses de 125 µg/mL e 250 µg/mL do EBH reduziram as taxas de infecção de macrófagos em relação ao controle negativo. No modelo “terapêutico”, tanto o EBH quanto a FAc reduziram as taxas de infecção em relação ao controle negativo, com maior eficácia do EBH na dose de 250 µg/mL, sendo mais efetivo que o Glucantime.

O mecanismo pelo qual *C. ambrosioides* leva à redução das taxas de infecção de macrófagos por *Leishmania* spp. ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que a ativação de macrófagos é fundamental no controle da infecção por *Leishmania*, uma vez que o parasito prolifera preferencialmente no interior destas células. Um dos mecanismos essenciais para a eliminação destes parasitos pelos macrófagos é a produção de metabólitos tóxicos como ânion super óxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO)<sup>1</sup>.

Cruz<sup>4</sup> et al. (2007) testaram o efeito do tratamento com EBH de *C. ambrosioides* sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas *in vitro*, evidenciando incremento no espriamento e atividade fagocítica, processos essenciais para o desencadeamento da resposta oxidativa intracelular, bem como aumento da produção de NO, o qual foi concentração e tempo dependentes. Essa foi a primeira evidência de que o EBH age como um indutor da atividade de macrófagos, o que poderia potencializar a resposta microbicida dessas células. Tais achados justificariam a redução das taxas de infecção observada com o uso profilático do EBH em nosso trabalho. De forma complementar a este estudo, Patrício<sup>24</sup> (2011) avaliou o efeito terapêutico das frações acetato de etila e hidroalcoólica do EBH de *C. ambrosioides* na infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis*, verificando que as duas frações na concentração de 250µg/mL reduziram as taxas de infecção em 35% e 52%, respectivamente, em relação ao controle negativo, observando ainda aumento da produção de NO. Esses achados são semelhantes aos do nosso estudo, no qual o uso terapêutico do EBH e da FAc na concentração de 250µg/mL levou à redução de 64% e 41% nas taxas de infecção, respectivamente, in-

dicando que tal efeito poderia estar associado à ativação macrofágica e aumento na produção de NO induzidas por *C. ambrosioides*.

Em contrapartida, Monzote<sup>15</sup> et al. (2007) observaram redução de 50% na infecção de macrófagos por amastigotas de *L. donovani* quando estes foram tratados com 5 µg/mL do óleo essencial de *C. ambrosioides* por 48 horas após a infecção. Em macrófagos pré-tratados com a mesma dose do óleo essencial por 24 horas e posteriormente infectados com *L. donovani*, foi evidenciada inibição de 17,6% na atividade fagocítica. Assim, o óleo essencial levou à uma redução da taxa de infecção mesmo diante da inibição da atividade macrofágica, indicando que a atividade anti-*Leishmania* de *C. ambrosioides* pode estar também relacionada à um efeito tóxico direto sobre as formas amastigotas do parasito.

Em nosso estudo, o uso terapêutico do EBH na concentração de 250µg/mL foi mais efetivo que o controle positivo. Tal achado coincide com aqueles de Monzote<sup>14,15</sup> et al. (2006, 2007) e Patrício<sup>23</sup> et al. (2008), que observaram atividade inibitória do óleo essencial e do EBH de *C. ambrosioides* nas infecções *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, sendo ambos superiores às drogas de referência usadas como controle positivo (Anfotericina B e antimoniato de meglumina). Logo, supõe-se que a maior atividade do EBH sobre a infecção, em relação às suas frações acetato de etila e clorofórmica se associaria a um efeito sinérgico de substâncias que estariam presentes parcialmente ou totalmente. No entanto, estudos de elucidação da completa composição química do EBH e suas frações são necessários para confirmar essa hipótese.

Em suma, este estudo contribuiu com evidências que apontam o potencial farmacológico de *C. ambrosioides* no controle da infecção por *L. amazonensis*. Estudos futuros realizados *in vivo* que possam mensurar o perfil de citocinas ou metabólitos do oxigênio ou nitrogênio secretados pelos macrófagos infectados e identificar os princípios ativos presentes no EBH *C. ambrosioides* e suas frações poderão incrementar o entendimento dos processos envolvidos na inibição de tal infecção.

## CONCLUSÃO

O EBH de *C. ambrosioides* e sua fração acetato de etila se mostraram eficazes em reduzir a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, sendo que o primeiro também foi capaz de inibir de forma profilática a infecção. *C. ambrosioides* portanto é um potencial candidato para a formulação de novos medicamentos para a Leishmaniose. No entanto, mais estudos são necessários para identificar o(s) princípio(s) ativo(s) dessa espécie vegetal e elucidar seu mecanismo de ação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento FAPEMA, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e pelas bolsas recebidas.

## REFERÊNCIAS

1. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-dutra A, O'Donnell CA, Liew FY. Production of nitric oxide and superoxide by macrophages and killing of *Leishmania major*. Eur J Immunol 1994; 24: 672-6.
2. Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício, FJ, Sousa SM et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn 2006; 16: 631-637.
3. Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia 2001; 72: 599-618.
4. Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. J Ethnopharmacol 2007; 111:148-154.
5. De Feo V, Santore F. Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. J Ethnopharmacol 1993; 39: 39-51.
6. França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of *Leishmanial* ulcers due to *Leishmania* (viannia) braziliensis in the endemic area of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1996; 29: 229-232.
7. Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. Parasitol. Today 1994; 10: 65-68.
8. Lipsky PE, Tao XL. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. Semin Arthritis Rheum 1997; (26): 713-723.
9. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.
10. Maia C, Rolão N, Nenes M, Gonçalves L, Campino L. Infectivity of different types of macrophages by *Leishmania infantum*. Acta Trop 2007; 103: 150-155.
11. Mendes FR, Carlini E. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. J Ethnopharmacology 2007; 109: 493-500.
12. Ministério da Saúde do Brasil. SINAN-Sistema de Informação de Agravos Notificáveis. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Consultado em 05/06/2014.
13. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2. ed. atual., 3. reimpr. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2013.
14. Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. Chemotherapy 2006; 52: 130-136.

15. Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. *In Vitro* Activity of an Essential Oil against *Leishmania donovani*. *Phytother Res* 2007; 21: 1055–1058.
16. Moreira RCR, Costa JML, Saldanha AC, Silva AR. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar Americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 Suple I: 126.
17. Moreira RCR, Rebelo JMM, Gama MEA, Costa JML. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 2002; 18: 187–195.
18. Nascimento, FRF, Ribeiro-Dias F, Russo M. Cytotoxic activity of BCG-activated macrophages against L929 tumor cells is nitric oxide-dependent. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1593–1596.
19. Nascimento FRF, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 2002; 168: 4593–4600.
20. Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci* 2006; 78 (22): 2650–2653.
21. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulos B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; 7 (4-5): 257–266.
22. Pardo de Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: an ethnopharmacobotanical review. *J Ethnopharmacology* 2005; 98: 1-19.
23. Patrício, FJ, Costa GC, Pereira PVS, Araújo-filho WC, Sousa SM, Frazão JB et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* 2008; 115(2): 313–319.
24. Patrício FJB. Atividade imunoestimulante e anti-*Leishmania* de *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz) [Tese de doutorado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2011.
25. Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 2003; 26: 550-553.
26. Reis AS, Rios CEP, Melo LP, Costa GC, Silva LA, Patrício FJB, Amaral FMM, Nascimento FRF. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev Ciên Saúde* 2012; 14(2): 119-126.
27. Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12: 514-535.
28. Simões CMO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003.
29. World Health Organization. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Consultado em: 05/06/2014.

**\*Autor de correspondência:**

Flávia R. F. Nascimento

**E-mail:** [nascimentoofrf@yahoo.com.br](mailto:nascimentoofrf@yahoo.com.br)