

Rev. Ciênc. Saúde

v.14, n. 2, p. 119-126, jul-dez, 2012

ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.

REIS, Aramys S.¹
RIOS, Carlos Eduardo P.²
MELO, Luzia P.³
COSTA, Graciomar C.⁴
SILVA, Lucilene A.⁵
PATRÍCIO, Fernando J.B.⁶
AMARAL, Flavia M.M.⁷
NASCIMENTO, Flávia R.F.^{8*}

Resumo: A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* e representa sério problema de saúde pública em países da África, Ásia e América Latina. *Chenopodium ambrosioides* L., popularmente conhecido como mastruz, tem sido utilizado no Maranhão para o tratamento tópico de úlceras leishmanióticas. O trabalho avaliou a eficácia das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* contra formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonensis*. O fracionamento foi realizado pela partição sequencial do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. ambrosioides* com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). As formas promastigotas foram cultivadas em meio RPMI 1640 com e sem as frações. Após 24h de incubação a 26°C, o número de promastigotas viáveis foi contado pelo método direto em câmara de Neubauer. As concentrações que inibem o crescimento de 50% (CI₅₀) das promastigotas de *L. amazonensis* foram calculadas a partir da avaliação da mortalidade das promastigotas *in vitro*. De acordo com escores padrões nas frações de acetato de etila e hidroalcoólica remanescente não foi observada atividade leishmanicida significativa, mas as frações hexânica e clorofórmica apresentaram-se ativas. Os resultados obtidos demonstram uma ação leishmanicida promissora das frações. Estudos futuros são necessários para investigar a eficácia destas frações no tratamento da leishmaniose em modelos experimentais *in vivo*.

Descritores: *Chenopodium ambrosioides* L.; Mastruz; Leishmaniose; *in vitro*.

Abstract: *In vitro* leishmanicidal activity of fractions obtained from hydroalcoholic extracts of *Chenopodium ambrosioides*' leaves. Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and represents serious public health problem in Africa, Asia and Latin America. *Chenopodium ambrosioides*, popularly known as "mastruz", has been used in Maranhão for the topical treatment of leishmanial ulcers. The study evaluated the effectiveness of the fractions from hydroalcoholic extract of *C. ambrosioides*' leaves against the promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Fractionation was accomplished by partition sequential extract of leaves of *C. ambrosioides* with solvents of increasing polarity (hexane, chloroform and ethyl acetate). The promastigotes forms were cultured in supplemented RPMI 1640 with or without fractions. After 24h incubation at 26°C, the number of viable promastigotes was counted by the direct method in a Neubauer chamber. The concentrations that inhibit growth of 50% (IC₅₀) of *L. amazonensis*' promastigotes were calculated from the assessment of the mortality of promastigotes *in vitro*. According to standard scores, in the ethyl acetate and hydroalcoholic remaining fractions there was no leishmanicidal activity, while the hexane and chloroform fractions were actives. The results showed a promissor leishmanicidal activity of fraction. Future studies are necessary to investigate the effectiveness of these fractions in the treatment of these fractions in experimental models *in vivo*.

Descriptors: *Chenopodium ambrosioides* L.; Mastruz; Leishmaniasis; *in vitro*.

¹ Mestre em Ciências da Saúde – UFMA.

² Graduando em Medicina – UFMA.

³ Farmacêutica – Residência Multiprofissional – HU-UFMA.

⁴ Doutorando em Patologia Humana – Fiocruz-BA.

⁵ Professora do CCAA- UFMA.

⁶ Doutor em Biotecnologia, RENORBIO.

⁷ Professora do Departamento de Farmácia - UFMA.

⁸ Professora do Departamento de Patologia - UFMA.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Nas Américas a transmissão do parasito ocorre, naturalmente, pela picada de fêmeas infectadas dos flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, dependente de um contexto multifatorial que envolve o hospedeiro, o vetor e o reservatório doméstico ou silvestre³⁶

No homem, a infecção pode se apresentar sobre diversas formas clínicas, estando relacionada à espécie de *Leishmania*, à infecção e à condição imunológica do hospedeiro^{12,28}.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis doenças tropicais de maior relevância no mundo, apresentando alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina^{14,38}. Dois milhões de indivíduos são infectados por ano no mundo, sendo que cerca de 350 milhões estão sob risco de desenvolver infecção³⁸.

No Brasil, tanto a Leishmaniose Visceral (LV) como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorrem em todo o território, sendo endêmicas nas regiões Norte e Nordeste devido, principalmente, às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão²⁷.

No Maranhão essa alta prevalência é observada para todos os tipos de leishmaniose. Em 2004 e 2005, o Estado apresentou o maior número de notificações de LTA da região Nordeste registrando 3.123 e 3.326 casos, respectivamente. Dentre os municípios maranhenses um dos mais afetados é Buriticupu, situado na Amazônia do Maranhão, distante 450 km de São Luís, capital do Estado. Buriticupu, em 2004 e 2005, apresentou o maior número de registros com percentual de 5,68 e 6,13% do total de casos de LTA do Estado, respectivamente^{27,34,35}.

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo

elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito^{6,8-10}. A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento^{9,10}. O monitoramento do tratamento do paciente também é difícil, visto que este deve ser submetido semanalmente à avaliação das funções cardíaca, renal e hepática^{9,10}. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos¹³.

Em regiões de alta endemicidade, como áreas do Norte e Nordeste brasileiro, é comum o uso de plantas no tratamento alternativo de úlceras causadas por *Leishmania* spp., a exemplo da espécie *Chenopodium ambrosioides*^{16,25,26}.

Essa espécie possui ampla distribuição pelo mundo, utilizada em muitos lugares como antiespasmódico, tônico, pró-cinético, antirreumático e antipirético, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo²⁰. No Brasil, é popularmente conhecida como erva de Santa Maria, mastruz ou mastruço, entre outros, sendo seu uso largamente difundido em todo o país¹⁹.

Recentemente foi demonstrado pelo nosso Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão, que o extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides*, quando utilizado por via intralesional, induz significativa redução da disseminação da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos, sugerindo que a ação pró-inflamatória local do extrato estaria controlando a infecção³⁰. De fato, em estudos anteriores demonstramos que *C. ambrosioides* induz ativação de macrófagos¹¹ o que, por si só, seria um bom indicador do potencial anti-*Leishmania in vivo* dessa espécie.

Tendo em vista a grande utilização de plantas para fins terapêuticos por grande parte da população, o alto potencial leishmanicida de *C. ambrosioides* evidenciado em estudos prévios do nosso grupo, além do baixo índice terapêutico

dos tratamentos convencionais, a busca da fração ativa dessa planta é de fundamental importância visando a obtenção de fitoterápico eficaz e seguro; bem como a identificação e/ou elucidação de princípio ativo que venham contribuir para o tratamento dessa infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato hidroalcoólico e frações das folhas de *C. ambrosioides*

As folhas de *C. ambrosioides* foram coletadas no Herbário Paz e Harmonia, localizada no município de São José de Ribamar, estado do Maranhão, Brasil; e identificadas no Herbário Ático SEABRA da Universidade Federal do Maranhão (exsicata nº 1148/SLS017213). Elas foram secas a 37°C, moídas (pó moderadamente grosso) e maceradas em solução hidroalcoólica a 70% em uma relação droga/solvente de 1:5 por 7 dias, com agitação constante. O macerado foi concentrado em evaporador rotativo para obtenção do extrato seco, como descrito por Patricio³⁰ et al. (2008). O rendimento obtido foi de 10,4 %.

O fracionamento foi realizado pela partição sequencial com solventes de polaridade crescente [hexano (FHx), clorofórmio (FCI) e acetato de etila (FAEt)] em balão de separação, a partir de uma solução hidroalcoólica do extrato seco de *C. ambrosioides*, até o líquido extrator não apresentar mais coloração. Todas as frações obtidas, inclusive a hidroalcoólica remanescente (FHET), foram concentradas até secura, em evaporador rotatório; em seguida os resíduos secos das frações foram diluídos diretamente em solução tamponada de fosfato (PBS/ pH: 7,2) em concentração final de 5 mg/mL e mantidas em frascos estéreis, a 4°C, para a realização dos ensaios biológicos².

Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino 10% à temperatura ambiente (25°C)⁴.

Avaliação do efeito anti-*Leishmania* das frações do extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro*.

A atividade leishmanicida do extrato e frações de *C. ambrosioides* foi avaliada pela mortalidade das promastigotas *in vitro*. Para o ensaio foram adicionados 100 µL de meio RPMI em placa de 96 poços, na qual foi diluído o extrato bruto e frações do extrato de *C. ambrosioides* nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,75 µg/mL. Cada poço recebeu 10 µL de uma suspensão de formas promastigotas de *L. amazonensis* contendo 5x10⁶ células/mL. Como controle, foram utilizadas as formas promastigotas cultivadas somente em meio RPMI 1640 suplementado. Após 24h de incubação a 26°C, foi realizada a contagem do número de promastigotas viáveis em câmara de Neubauer, sendo calculado o percentual de inibição do crescimento das promastigotas tomando-se como referência o número de promastigotas viáveis nos poços controle⁴. O valor da atividade leishmanicida (CI₅₀: 151,9 µg/mL) do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* obtido segundo metodologia de Bezerra⁴ et al. (2008) foi empregado como valor de referência nesse estudo.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad* versão 5.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀), calculados por regressão linear⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em algumas regiões endêmicas do Nordeste brasileiro, onde o acesso aos serviços de saúde, especialmente aos medicamentos sintéticos, é extremamente difícil, plantas e/ou suas

preparações têm sido usadas no tratamento das ulcerações causadas por espécies do gênero *Leishmania*. França¹⁶ et al. (1996) mostraram que *C. ambrosioides* é uma das plantas mais frequentemente utilizadas para tratar essas ulcerações; com tratamento realizado pela aplicação tópica das folhas ou pela ingestão do infuso preparado com elas. De fato, Patrício³⁰ et al. (2008) demonstraram que o tratamento intralesional da infecção murina causada por *L. amazonensis* com extrato das folhas hidroalcoólico de *C. ambrosioides* diminuiu a carga parasitária no foco da infecção, além de controlar os mecanismos que regulam a disseminação dessa espécie de *Leishmania*.

Baseado na intensa atividade leishmanicida das folhas de *C. ambrosioides* evidenciada em estudos prévios^{5,21-24,30}, torna-se imperativa a busca pela fração ativa do extrato; visando desenvolvimento de fitoterápico seguro, acessível e eficaz, com garantia de certificação de qualidade assegurada pela identificação de um ou mais princípios ativos, a serem empregados como marcadores químicos.

Nesse trabalho foi avaliado o potencial citotóxico direto, *in vitro*, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* com quatro frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides*.

Amaral¹ et al. (2006) propuseram uma classificação da ação de extratos vegetais sobre parasitos flagelados, com base em valores de CI_{50} da seguinte forma: altamente ativo ($CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$), ativo ($100 < CI_{50} \leq 250 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativo ($250 < CI_{50} \leq 500 \mu\text{g/mL}$) e inativo ($CI_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$). De acordo com essa classificação as frações FHx ($CI_{50} = 177 \mu\text{g/mL}$) e FCl ($CI_{50} = 220 \mu\text{g/mL}$) foram ativas para a atividade leishmanicida, enquanto a fração FHET ($CI_{50} = 498 \mu\text{g/mL}$) é moderadamente ativa e a fração FAET ($CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) não possui atividade citotóxica direta contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 1 - Atividade *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, expressos em valores 01 CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), das frações de extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L.

Frações de extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Atividade leishmanicida CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Fração FHx	177,0
Fração FCl	220,0
Fração AEt	>500,0
Fração HEt	498,0
Extrato Bruto Hidroalcoólico ^a	151,9
Antimoniato de Meglumina ^b	440,0
Anfotericina B ^b	1,6

FHx: fração hexânica; FCl: fração clorofórmica; FAET: fração de acetato de etila; FHEt: fração hidroalcoólica remanescente.

a CI_{50} (valor de referência empregado nesse estudo) para o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* segundo Bezerra⁴ et al (2006).

b Fármacos de referência para tratamento da leishmaniose.

As frações FHx e FCl tiveram atividade biológica semelhante ao extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* obtidos por Bezerra⁴ et al (2006), empregado como valor de referência nesse estudo, porém com atividade menos significativa (tabela 1). Essa redução da atividade biológica das frações por comparação ao extrato pode estar relacionada a provável perda da ação sinérgica dos compostos presentes, como já demonstrado com outras espécies vegetais frente a outro protozoário; comprovando que a interação entre duas ou mais substâncias do extrato pode ter um efeito biológico mais potente que quando utilizadas individualmente³³.

Apesar das frações terem sido menos ativas que o extrato bruto, entre elas, as que apresentaram melhor atividade biológica foram as mais apolares (FHx e FCl); o que pode estar relacionada às suas composições químicas características. Enquanto o hexano consegue extrair, potencialmente, substâncias da classe dos lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas e alguns óleos essenciais, o clorofórmio arrasta bases livres, óleos essenciais, antraquinonas e glicosídeos cardiotônicos. Por sua vez, o acetato de etila, extrai flavonóides e cumarinas simples, enquanto o álcool acrescido de água, extrai, saponinas e taninos³⁷.

Os óleos essenciais possuem uma potente atividade leishmanicida tanto *in vitro* quanto *in vivo*²¹⁻²³. A atividade biológica desses óleos essenciais frequentemente tem sido atribuída ao monoterpene bicíclico ascaridol. Esse monoterpene demonstrou ser um potente inibidor do crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, sendo sugerido que a presença do grupo peróxido parece ter papel importante no efeito antiplasmódio, uma vez que o cineol, com estrutura similar ao ascaridol (exceto pela presença de um grupamento epóxi no lugar do peróxido), não apresentou nenhuma atividade contra o protozoário³¹. Já a significativa atividade antifúngica do óleo essencial descrita por Jardim¹⁸ et al. (2008) foi observada apenas na fração composta por *p*-cymene (25,4%), (*Z*)-ascaridol (44,4%) e (*E*)-ascaridol (30,2%), indicando que o ascaridol foi o principal componente fungitóxico do óleo essencial testado.

Entretanto, existem demonstrações de que a atividade biológica pode estar associada a outros componentes. Prasad³² et al. (2009) não encontraram resíduos de ascaridol em amostra de óleo essencial que apresentou atividade antifúngica e atribuíram tal efeito ao *m*-cimeno, componente majoritário (43,9%) do óleo testado. Além disso, tem sido demonstrado que o limoneno, outro monoterpene encontrado em *C. ambrosioides*, apresenta atividade anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo*³. Apesar da sua potente atividade biológica, o ascaridol tem sido relacionado à atividade tóxica do óleo essencial^{24,29}, o que prejudica seu uso terapêutico.

Já a moderada atividade da fração FHET e a inatividade da fração FAET sobre as formas promastigotas, não significa, necessariamente que deve ser desconsiderado um possível potencial terapêutico para o tratamento da leishmaniose. As substâncias presentes nessas frações podem agir, por exemplo, estimulando uma resposta imunológica eficaz frente ao parasito ou precisam ser metabolizadas para exercerem suas ações biológicas. De fato, semelhante a essas frações, o antimoniato de meglumina, fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose, também mostrou uma baixa atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania*¹⁵. Para exercer sua ação citotóxica o

fármaco precisa, primeiramente, ser transformado na sua forma ativa dentro do macrófago¹⁷. Logo, as substâncias presentes nessas frações mais polares podem agir por mecanismo semelhante ao antimoniato de meglumina, sendo necessário avaliar, também, a eficácia das frações frente às formas amastigotas em macrófagos infectados para confirmar ou não essa hipótese. Além disso, é importante avaliar o efeito imunomodulador dessas substâncias, o que poderia contribuir para uma ação leishmanicida eficaz. Realmente, tem sido verificado que a ação leishmanicida do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* está relacionada tanto a uma ação leishmanicida direta quanto a uma ativação da resposta imunológica^{11,30}.

Análises mais apuradas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Nuclear Magnética, serão necessárias para conhecimento dos compostos químicos presentes em cada fração e então, prosseguir com os ensaios com tais compostos avaliando a ação sobre as formas amastigotas e promastigotas; bem como, o desenvolvimento de estudos pré-clínicos *in vivo*.

CONCLUSÕES

No presente trabalho ficou constatado que as frações hexânica e clorofórmio das folhas de *C. ambrosioides* apresentaram atividade citotóxica contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de estudos mais apurados que visem determinar os compostos químicos presentes em cada fração para que futuramente possamos desenvolver um fármaco eficaz no tratamento da leishmaniose.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto, pela concessão de bolsa de Iniciação científica a LPM, de mestrado a ASR e de produtividade a FRFN. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto, pela concessão de bolsa de Iniciação científica a CEPR e doutorado a FJBP.

REFERÊNCIAS

1. Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. Rev. Bras. Farmacogn 2006; 16 (Supl): 696-720.
2. Andrade CA, Peitz C, Cunico M, Carvalho JLS, Abrahao WM, Miguel MD, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyrifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae. Rev Bras Farmacogn 2005; 15 (1): 13-15.
3. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katzin AM, Uliana SR. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. Biomed Pharmacother 2009; 63 (9): 643-9.
4. 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 (Supl): 631-37.
5. 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; 16 631-37.
6. Blum JA, Hatz CF. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. J Travel Med 2009; 16 (2): 123-31.
7. Camacho MR, Phillipson JD, Croft SL, Solis PN, Marshall SJ, Ghazanfar SA. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. J Ethnopharmacol 2003; 89 (2-3): 185-191.
8. Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. Biochem Biophys Res Commun 2011; 416 (1-2): 7-12.
9. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol 2003; 19 (11): 502-508.
10. Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect 2011; 17 (10): 1478-1483.
11. Cruz GV, Pereira PV, Patricio FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazao 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 (1): 148-154.
12. Cuna WR, Velasquez R, Riva J, Guachalla I, Rodriguez C. Enhancement of a TH1 immune response in amphotericin B-treated mucocutaneous leishmaniasis. J Biomed Biotechnol 2007; 2007 (5): 96410.
13. De Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia 2001; 72 (6): 599-618.
14. Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends Parasitol 2006; 22 (1): 4-6.
15. Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43 (2): 278-82.
16. França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1996; 29 (3): 229-232.
17. Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (3): 913-916.

18. Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire MM. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. J Chem Ecol 2008; 34 (9): 1213-1218.
19. Lipsky PE, Tao XL. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. Semin Arthritis Rheum 1997; 26 (5): 713-23.
20. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.
21. Monzote L, Garcia M, Montalvo AM, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. Forsch Komplement-med 2009; 16 (5): 334-8.
22. Monzote L, Garcia M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. *In vitro* activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. Phytother Res 2007; 21 (11): 1055-1058.
23. Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. Biomed Pharmacother 2007; 61 (2-3): 148-53.
24. Monzote L, Stamberg W, Staniek K, Gille L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 240 (3): 337-47.
25. 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 (Supl 1): T248, 126.
26. Moreira RCR, Rebêlo 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 Saúde Pública 2002; 18 (1): 187-195.
27. Ms/Funasa. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.
28. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366 (9496): 1561-1577.
29. Okuyama E, Umeyama K, Saito Y, Yamazaki M, Satake M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of "Paico," a medicinal Peruvian plant. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1993; 41 (7): 1309-1311.
30. Patricio FJ, Costa GC, Pereira PV, Aragao-Filho WC, Sousa SM, Frazao 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.
31. Pollack Y, Segal R, Golenser J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res 1990; 76 (7): 570-572.
32. Prasad CS, Shukla R, Kumar A, Dubey NK. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. Mycoses 2010; 53 (2): 123-129.
33. Rasoanaivo P, Wright CW, Willcox ML, Gilbert B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. Malar J 2011; 10 Suppl 1 S4.

34. Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LAA, et al. Plebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33 (1): 11-19.
35. Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Costa JML. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal occurrence ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. Rev Bras Biol 2001; 61 (1): 107-115.
36. Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. Immunol Rev 2004; 201 318-38.
37. Simões CMO. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6ª ed. Florianópolis: UFSC; 2007.
38. Who. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO. Expert Comittee of the control of leishmaniasis. Geneva: WHO; 2010. [citado 2012 fev28]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf

*** Autor para correspondência:**

Profª. Dra Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

E-mail: nascimentoofrf@yahoo.com.br