



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto
anti-*Leishmania* e cicatrizante**

Lucyia Alves de Carvalho Silva

**São Luís - MA
2016**

LUECYA ALVES DE CARVALHO SILVA

**Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto
anti-*Leishmania* e cicatrizante**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra

**São Luís - MA
2016**

Silva, Lucya Alves de Carvalho

Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto anti-*Leishmania* e cicatrizante / Lucya Alves de Carvalho Silva. – 2016.

121f.

Impresso por computador

Orientadora: Rosane Nassar Meireles Guerra

Tese (Doutorado) – Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, 2016.

1. *Anacardium occidentale*. 2. Emulsão. 3. cicatrização. 4. *Leishmania amazonensis*, 5. Leishmaniose Cutânea.

CDU 811.344-002: 634.577

LUECYA ALVES DE CARVALHO SILVA

Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto anti-*Leishmania* e cicatrizante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
UFMA – (Orientadora)

Prof^a. Dra. Flavia Raquel F. do Nascimento
UFMA – (Examinadora)

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto
CEUMA – (Examinador)

Prof^a. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
UEMA – (Examinadora)

Prof^a. Dra. Elizabeth Soares Fernandes
CEUMA - (Examinadora)

Prof^a. Dra. Ana Paula A Santos
UEMA – (Suplente)

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro
UFMA - (Suplente)

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à minha amada mãe e ao meu amado pai, por incentivarem as minhas causas, confiar em mim, me apoiarem e amarem...”

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele nada é possível.

Aos meus pais, Paulo Roberto da Silva e Leoneide Alves de Carvalho, por me ensinarem a seguir pelos caminhos do amor. Obrigada mãe e pai, pelo apoio incondicional à minha trajetória escolar e acadêmica, desde a alfabetização até a realização deste doutorado. Sem seu apoio e incentivo nada disto seria possível.

Aos meus irmãos Leonardo, Lucas e Lucelya, por simplesmente existirem na minha vida. Vocês são os verdadeiros tesouros que a vida me deu.

À minha segunda família Luís Gonzaga e Maria e suas filhas Adelaide, Hielma e Iracema que me apoiaram desde o início da graduação até o final deste doutorado.

Aos meus tios, tias e avó que sempre torceram para que meus objetivos fossem alcançados.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra pela sua dedicação na orientação deste trabalho, paciência nos ensinamentos e por acreditar em mim. Sem os seus ensinamentos e sugestões jamais teria sido possível a execução deste trabalho. Espero ser sua orientanda em muitas outras trajetórias na vida.

Ao meu noivo e, sobretudo, amigo Aramys Reis por estar comigo e me apoiar durante toda a execução deste projeto. Obrigada por todas as críticas feitas a este trabalho, que certamente contribuíram para sua melhoria desde à concepção do projeto até a obtenção dos resultados.

Aos Professores Flavia Nascimento, Lucilene Amorim Silva e Livio Martins Costa Júnior pelas sugestões apresentadas durante a minha qualificação que muito contribuíram para o amadurecimento das ideias científicas e conclusão deste trabalho.

Ao DAPI-UFMA e à Professora Glória pela indispensável contribuição na elaboração da patente obtida com a execução deste trabalho.

À Professora Luiza Helena Araújo do Carmo pelo suporte técnico, disponibilidade e contribuição científica na elaboração das formulações.

À minha amiga e irmã científica, Mayara Cristina Pinto, por toda amizade desde a graduação até o doutorado, pela contribuição na execução e delineamento deste trabalho, ajuda nos experimentos (inclusive nos finais de semana) e pelo convívio agradável durante todos estes anos.

Ao amigo Éder Magalhães Silva Fialho, por ter contribuído com as análises histológicas e delineamentos experimentais deste trabalho e por ser um amigo para todas as horas.

À amiga que o doutorado me deu de presente Izabel Bogéa, pela agradável convivência nas aulas teóricas, viagens e seminários e também pelo apoio espiritual e psicológico nos momentos mais difíceis.

Aos amigos André Vale e Larissa Franco, pela contribuição na execução de vários experimentos e pela amizade construída nos últimos anos.

À Ana Karlla e Alvaro Bezerra pela ajuda no traslado da tese e também, por serem apoiadores deste trabalho bem como pela amizade construída nos últimos anos.

À todos os amigos do Laboratório de Imunofisiologia, em especial à D. Joana e à Carlene pela preocupação, carinho e ajuda constantes e ao Johnny Ramos pelo suporte nas análises no citômetro de fluxo.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia oferecido, pela oportunidade a mim concedida e pelos valorosos eventos científicos ofertados.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos que levaremos para toda a vida.

À UFMA, por sediar o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e por oferecer sua infraestrutura para a execução deste trabalho.

À FAPEMA, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudos.

À todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

"A sabedoria superior tolera, a inferior julga, a superior alivia, a inferior culpa, a superior perdoa, a inferior condena. Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar."

Chico Xavier

RESUMO

A espécie vegetal *Anacardium occidentale*, conhecida, no Brasil, como cajueiro é uma árvore que apresenta grande relevância econômica, social e medicinal. Este trabalho teve como objetivos: realizar a síntese de formulação do tipo emulsão com extrato das flores de *A. occidentale* L e avaliar seu efeito cicatrizante (CAPÍTULO I); avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* do extrato e formulação a base das flores de *A. occidentale* L. (CAPÍTULO II); desenvolver e testar um produto biotecnológico com atividade biológica, tendo como base o extrato das flores de *A. occidentale* (CAPÍTULO III). Após o desenvolvimento do produto biotecnológico, uma formulação do tipo emulsão a base do extrato de flores de *A. occidentale*, foram realizados testes de estabilidade físico-química. Constatou-se que a formulação demonstrou maior estabilidade na temperatura ambiente não apresentando separação de fases, perda de viscosidade ou de qualquer uma das suas características ideais durante todo o estudo. Em adição, mostrou-se que a formulação possui importante atividade cicatrizante, possivelmente associada ao aumento de IL-6. Ademais, foram realizados ensaios anti-*Leishmania in vitro*, utilizando macrófagos Raw infectados, bem como formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e *in vivo* utilizando-se camundongos Balb/c infectados com este protozoário. Os resultados obtidos mostram que o extrato das flores de *A. occidentale* inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, *in vitro* e *in vivo*, pois reduz a viabilidade de promastigotas, bem como a infecção em macrófagos, além de diminuir a carga parasitária na infecção *in vivo*, possivelmente por ação direta do extrato sobre os protozoários. Compostos isolados presentes na espécie vegetal, por outro lado, não apresentam efeito leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Do mesmo modo, a formulação do tipo emulsão contendo extrato de *A. occidentale* não apresenta efeito leishmanicida embora reduza o tamanho da lesão, quando comparado ao tratamento com droga padrão. Em conjunto os resultados indicam que *Anacardium occidentale* apresenta potencial farmacológico para prospecção de produtos a serem utilizados no tratamento das leishmanioses e cicatrização.

Palavras chave: *Anacardium occidentale* L, emulsões, cicatrização, flores, *Leishmania amazonensis* e Leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

The plant species *Anacardium Occidentale* known in Brazil as cashew tree represents a great economic, social and medical relevance. This study aims to perform the synthesis of the emulsion-type formulation with extract of flowers from *A. occidentale* L. and evaluates its cicatrizant effect (Chapter I); evaluates the leishmanicidal activity in vitro and in vivo from the extract and base formulation of the flowers from *A. occidentale* L. (Chapter II); develops and testes a biotech product with biological activity, based on the extract from the flowers of *A. occidentale* (Chapter III). After developing the biotechnological product, a formulation of emulsion-type based extract of *A. occidentale* flowers, physicochemical stability tests were performed. It was found, that the formulation showed more stability at room temperature showing no phase separation, loss of viscosity or any of its desirable characteristics throughout the study. In addition, it was shown that the formulation has important cicatrizing activity, possibly related to the IL-6 increase. Furthermore, in vitro anti-Leishmania tests were performed using infected macrophages Raw and promastigotes of *Leishmania amazonensis*, and in vivo using BALB / c mice infected with this protozoan. The results show that the extract of *A. occidentale* flowers inhibits the growth of promastigotes of *L. amazonensis*, in vitro and in vivo, as it reduces the viability of promastigotes and infection in macrophages, and reduce the parasitic load of the infection in vivo, possibly by direct action of the extract on the protozoa. Isolated compounds present in plant species, on the other hand, do not exhibit Leishmanicidal effect against *L. amazonensis* promastigotes. In the same manner, the formulation emulsion-type containing *A. occidentale* extract has no Leishmanicidal effect while reducing the size of the lesion, when compared to treatment with standard drugs. In conjunction, the results indicate that *Anacardium occidentale* has pharmacological potential for mining products to be used in the treatment of leishmaniasis and scarring.

Keywords: *Anacardium occidentale* L, emulsion, wound healing, flores, *Leishmania amazonensis* and Cutaneous Leishmaniasis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
<i>Anacardium occidentale</i>	16
Aspectos Epidemiológicos das Leishmanioses	21
Manifestações clínicas das Leishmanioses	24
Agentes etiológicos das leishmanioses.....	25
Vetores e ciclo biológico	27
Aspectos imunológicos da infecção por <i>Leishmania</i>	28
Tratamento farmacológico das leishmanioses.....	36
O processo de cicatrização	39
Uso de bioproduto para o tratamento da leishmaniose e cicatrização	42
OBJETIVOS.....	46
CAPÍTULO I – Artigo à ser submetido: Delineamento físico-químico e efeito cicatrizante de creme tipo emulsão contendo extrato de <i>Anacardium occidentale</i>	47
CAPÍTULO II – Efeito do extrato, substâncias isoladas e formulações de <i>Anacardium occidentale</i> sobre a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	77
CAPÍTULO III – Patente depositada: “Composições e usos de emulsões à base de <i>Anacardium occidentale</i> para uso como bioproduto cicatrizante”.....	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Anacardium occidentale* L., família Anacardiaceae, é conhecida popularmente no Brasil como cajueiro. Esta árvore apresenta ampla dispersão na faixa litorânea de regiões tropicais e subtropicais do país, possuindo relevante papel econômico e social, além de suas propriedades medicinais.

As diversas partes de *A. occidentale* apresentam ampla variedade de propriedades farmacológicas, entre elas a atividade antimicrobiana de amplo espectro encontrada nas flores e folhas (SILVA et al 2016), atividade anti-diabetes também observada em extratos produzidos com as folhas (TEDONG, 2006) e flores (SILVA et al, 2015), bem como atividade antiinflamatória. A população relata várias indicações de uso para as diferentes partes do cajueiro, dentre elas retenção urinária, edema, inflamações em geral, constipação e reumatismo (FRANÇA, 1993).

Muitas das propriedades medicinais atribuídas ao cajueiro a partir de dados etnobotânicos já foram comprovadas farmacologicamente em estudos pré-clínicos utilizando folhas, casca do caule e outras partes desta árvore. Porém, não há estudos que avaliem/validem as propriedades medicinais de extratos ou formulações obtidas a partir das flores quanto à sua atividade leishmanicida e cicatrizante.

Dependendo da espécie de *Leishmania* inoculada no hospedeiro e das características imunológicas deste, a leishmaniose pode apresentar quadros clínicos distintos. Assim, a doença se apresenta sob duas formas principais, a Leishmaniose Tegumentar e a Leishmaniose Visceral.

Durante o processo de cura nos pacientes com leishmaniose tegumentar, de forma inerente, também é fundamental a cicatrização das lesões. Este processo é bastante dinâmico e envolve uma cascata de processos inflamatórios

acompanhados de proliferação celular com remodelamento de tecido. Portanto, tratamentos que tenham eficácia em ambos os processos apresentam relevante aceitação na indústria farmacêutica.

O atual tratamento farmacológico para a leishmaniose preconizado pela Organização Mundial da Saúde, embora seja o que se tem de mais eficaz até o presente momento, ainda apresenta muitos efeitos tóxicos e colaterais. Isto tem dificultado a adesão dos pacientes, bem como aumentado os casos de resistência frente à várias cepas de *Leishmania*. Por este motivo, diversas alternativas farmacológicas tem sido buscadas, incluindo o uso de produtos naturais como é o caso de *A. occidentale*.

Ainda são bastante escassas as investigações científicas relacionadas à atividade biológica das flores de *A. occidentale* e devido à suas importantes propriedades farmacológicas, investigamos neste estudo a atividade anti-*Leishmania* das flores desta espécie vegetal, bem como seu efeito cicatrizante em lesões.

Um trabalho preliminar realizado durante a dissertação de mestrado deste demonstrou que o extrato bruto da espécie vegetal *A. occidentale*, possui efeito leishmanicida direcionado contra a espécie *L. amazonensis* em estudo in vitro e in vivo. Confirmada esta ação biológica e na tentativa de investigar e esclarecer o potencial biológico da espécie vegetal elaboramos este trabalho.

O mesmo foi organizado em três capítulos como forma de contemplar a ação anti-*Leishmania* e o efeito cicatrizante das flores de *A. occidentale* L. O primeiro capítulo trata da ação cicatrizante de formulação tipo emulsão obtida a partir do extrato das flores de *A. occidentale* bem como avaliação da sua estabilidade físico-química. Este trabalho gerou um manuscrito que será submetido ao *Journal BMC Biotechnology*. No segundo capítulo investigou-se a ação leishmanicida do extrato

bruto, substâncias isoladas e formulação tipo emulsão em modelos *in vitro* e *in vivo*. Do mesmo modo, este capítulo gerou um manuscrito que será submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*; e no terceiro capítulo constam algumas informações sobre o pedido de patente do bioproduto elaborado, o qual foi depositado e está sob análise e julgamento do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Anacardium occidentale* L.

Do ponto de vista botânico a espécie vegetal *Anacardium occidentale* pertence:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Sapindales

Família: Anacardiaceae

Genero: *Anacardium*

Espécie: *Anacardium occidentale*

A família Anacardiaceae é abundante nos trópicos e regiões adjacentes, especialmente na América tropical e na África, onde possui importância por sua ampla variedade de espécies com propriedades medicinais (PIO CORRÊA, 1984).

As árvores de *A. occidentale* são perenes e podem atingir até 10 metros de altura (Figura 1A). Apresentam copa larga e galhos que atingem o solo. O caule pode ser reto ou tortuoso, dependendo do tipo de terreno, com ramificações. As folhas são alternas, simples, inteiras, oblongas (Figura 1B). As flores são pequenas, dispostas em panículas terminais, de coloração que varia do branco ao rosa, como mostra a Figura 1C. O fruto é riniforme (Figura 1D) e apresenta no seu interior uma amêndoa, que quando seca e torrada, é popularmente conhecida como castanha-de-caju (ELAINE *et al.*, 2009). Prolongando-se ao fruto, existe o pedúnculo, ou

pseudofruto (Figura 1E), geralmente confundido com o fruto, com consistência macia, e aspecto piriforme, também comestível, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho (LORENZI; MATOS, 2002).

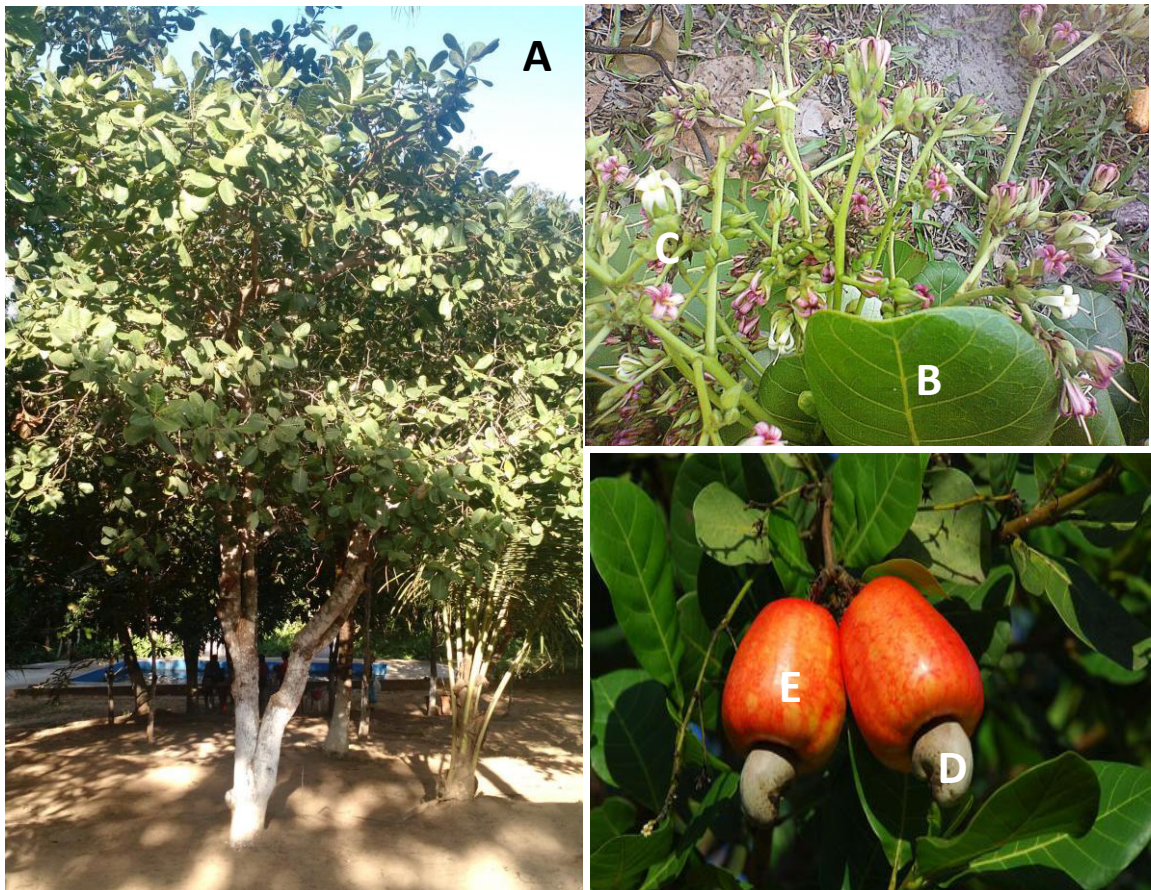


Figura 1: Aspecto geral da árvore de *A. occidentale* (A) (Fonte: Arquivo Pessoal). Aspectos das Folhas (B), Flores (C), (Fonte: Silva et al, 2012) Fruto (D) e Pseudofruto (E) (Fonte: Disponível em: cerratinga.org.br).

A. occidentale tem importância na alimentação, e relevância industrial, biológica, econômica e social. Essa espécie tenha ampla distribuição no território brasileiro, entretanto sua maior importância econômica e social está na região nordeste, com destaque para os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande Norte e Bahia por terem parte da economia voltada para a produção de produtos obtidos do cajueiro, como por exemplo, a castanha de caju, o suco e a cajuína. A importância

biológica advêm das inúmeras propriedades que apresenta como alimento e como remédio, de ampla utilização pela população (AGOSTINI-COSTA et al., 2003; SANCHO et al., 2007).

Dados etnobotânicos identificaram que a casca do caule é utilizada para o tratamento de doenças gástricas e inflamatórias e as folhas são utilizadas para tratar hipertensão, asma, diabetes, bronquites e distúrbios intestinais. Outros autores relatam também o uso popular para tratamento das leishmanioses, em regiões endêmicas (DARE et al., 2011; FRANÇA; LAGO; PHILIP, 1996; RODRIGUES, 2007; SOKENG et al., 2007).

Alguns dos usos etnobotânicos também foram comprovados cientificamente, bem como foi observado que as propriedades biológicas estão relacionadas às mais diversas partes da espécie. A atividade anti - diabetes foi detectada em ensaios pré-clínicos para o extrato das folhas para diabetes tipo II em ratos (FOURNET et al., 1996; TEDONG et al., 2006) e das flores para diabetes tipo I em camundongos diabéticos não obesos (NOD)(GUERRA; SILVA, 2010) e tipo II, em camundongos nos quais a diabetes foi induzida por estreptozotocina (SILVA, 2015).

A ação antimicrobiana foi comprovada no extrato da casca do caule de *A. occidentale*, frente a várias cepas de bactérias, indicando amplo espectro da atividade antibacteriana. Importante ressaltar que o extrato foi, inclusive, efetivo contra *Klebsiela pneumoniae* resistente à estreptomomicina. Essa atividade microbicida, muitas vezes atribuída à presença de compostos fenólicos, foi também detectada com uso do extrato das folhas, principalmente contra *Streptococcus mutans* (AKINPELU, 2001). Foi comprovado, ainda, que os constituintes de *A. occidentale* possuem importante atividade microbicida contra *Streptococcus mutans*,

Brevibacterium ammoniagenes, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium acnes* (SILVA et al, 2016; KUBO et al., 2006).

O extrato metanólico da casca do caule é capaz de neutralizar o LPS, inibindo o choque séptico em camundongos, sendo que, a maior dose do extrato (200 mg /kg) protegeu 100% dos animais da sepse. Além disso, o extrato reduziu os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), atividade associada à hepatoproteção, tendo em vista que estas enzimas são importantes marcadores da função metabólica do fígado (OLAJIDE et al., 2004).

Além destas atividades biológicas, há algumas décadas o extrato hidroalcoólico da casca do caule, em diferentes concentrações, tem sido utilizado para avaliar a atividade leishmanicida. Foi observado que os extratos obtidos de *A. occidentale* reduzem a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*, devido à citotoxicidade direta (FRANÇA et al., 1993; FRANÇA; LAGO; PHILIP, 1996). Luize e colaboradores mostraram em 2005, que a atividade leishmanicida do extrato etanólico das folhas de *A. occidentale* (100 µg/mL) afetou a viabilidade dos protozoários, sendo mais efetivo sobre formas amastigotas do que promastigotas de *L. amazonensis*, em culturas axênicas (LUIZE et al., 2005).

Vários compostos químicos já foram identificados nas diversas partes de *A. occidentale*. Na casca foi detectada a presença de taninos, alcalóides, triterpenos, flavonoides e antraquinonas, (LIMA et al., 2006). Nas folhas, Santos et al. (2011), detectaram além dos compostos presentes na casca, fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, catequinas (SANTOS et al., 2011). No pseudofruto e fruto foram isolados compostos fenólicos, mais especificamente, ácidos anacárdicos, cardanóis, cardóis além de fitosteróis (PARAMASHIVAPPA et al., 2001). No pedúnculo foi detectada a presença de antocianidinas, taninos

condensados e ácidos anacárdicos (AGOSTINI-COSTA et al., 2004). Segundo Kubo e colaboradores (2006) há elevada concentração de ácidos anacárdicos nas folhas. Estes ácidos têm atividade antioxidante, mas têm também ação tóxica e irritante (KUBO et al., 2006).

Recentemente, Silva et al (2016) analisando a composição química de diversos extratos obtidos das partes aéreas e casca do caule de *A. occidentale* identificou que todos os extratos apresentam compostos comuns como os compostos fenólicos, esteróides, triterpenos, saponinas, flavonóides e taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis, entretanto, o extrato da flor apresentou quantitativamente maior presença dos compostos e não apresenta ácidos anacárdicos detectados nos demais extratos (SILVA et al 2016).

Como as flores são órgãos que contribuem para a polinização nos vegetais é provável que a presença dos compostos identificados esteja relacionada à esta relevante atividade biológica da planta. É sabido que muitos destes compostos promovem atração de animais polinizadores, visto que a planta não possui habilidade de se locomover. A forma, o aroma, o sabor e a coloração são decorrentes de compostos químicos que têm a finalidade de atrair mamíferos, insetos e aves, mas também podem ser utilizada para fins biológicos (COUTO; RAMOS; CAVALHEIRO, 1998; SILVA, 2012).

O trabalho de dissertação de mestrado de Silva et al 2012, demonstrou que o extrato bruto da espécie vegetal *A. occidentale*, possui efeito leishmanicida direcionado contra a espécie *L. amazonensis* em estudo *in vitro* e *in vivo*. O extrato bruto mostrou-se efetivo em inibir o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Além disto, promoveu diminuição da carga

parasitária de macumndogos infectados com o protcoário, não sendo tóxico para os mesmos.

Este conjunto de dados mostra um importante conjunto de efeitos biológicos de extratos e compostos isolados das partes aéreas de *A. Occidentale* no tratamento de doenças infecciosas, indicando que há nas partes aéreas do cajueiro compostos passíveis de utilização na geração de bioprodutos com ação leishmanicida e, possivelmente cicatrizante, razão pela qual propusemos o presente estudo.

2.2 Aspectos epidemiológicos das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por diversos protozoários do gênero *Leishmania* com ocorrência em diversas regiões do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Leishmania* apresenta pelo menos 30 espécies diferentes. Destas, pelo menos 20 espécies têm sido encontradas parasitando seres humanos (ASHFORD, 2000; PACE, 2014). Atualmente, a doença pode ser classificada sob a forma cutânea ou tegumentar (LT), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (STEBUT, 2015).

A ampla distribuição da doença permite que sejam encontrados casos na América do Sul, America Central, África, Ásia e Europa. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que haja 14 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo, sendo que mais de 98 países são atingidos pela doença (Figura 2). As estimativas do número de casos variam de aproximadamente 700 mil para 1,3 milhão no ano de 2015. Para a leishmaniose visceral, acredita-se que os números de casos variam de aproximadamente 200.000 a 400.000 novos

casos. Estima-se ainda que pelo menos 310 milhões de indivíduos estejam em risco de desenvolver a doença (WHO, 2015).

Epidemias de Leishmaniose são recorrentes no mundo inteiro tanto em relação à Leishmaniose Visceral quanto à Tegumentar. Na África, por exemplo, Etiópia, Quênia e Sudão tem sido bastante acometidos com altas taxas de morbimortalidade nas comunidades afetadas pela leishmaniose. Enquanto isto, Síria e Afeganistão são grandemente acometidos por leishmaniose tegumentar. Têm sido mostrado que 90% dos casos de Leishmaniose visceral ocorre em seis países chaves: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Para a leishmaniose tegumentar tem-se que países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria são os mais acometidos pela doença (ALVAR et al., 2012; MANSUETO et al., 2014; WHO, 2015).

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar é considerada endêmica em 18 países. Em 2013, por exemplo, foi mostrado que do total de indivíduos infectados, 38% estão no Brasil, correspondendo a 18.226 casos. Enquanto isto, os casos de leishmaniose visceral foram reportados em 12 países do continente americano com um total de 45.490 casos em 2013. Deste total, 96% dos indivíduos acometidos estão no Brasil com um total de 3.253 casos distribuídos em 781 municípios. (PAHO, 2015).

No Brasil, todos os estados da Unidade Federativa apresentam casos registrados de Leishmaniose Tegumentar (LT). Na região nordeste há maior destaque para o estado da Bahia, seguido do estado do Maranhão que apresentou entre os anos de 2009 e 2012 um total de 9.734 casos notificados. Uma maior prevalência da doença na forma visceral também ocorre nestes estados. Entre os anos de 1984 e 2002, um número de 48.455 casos foi notificado na região, com 66%

dos casos nos estados da Bahia, Maranhão, Ceará e Piauí. Todas estas informações demonstram o relevante papel da doença no cenário regional e nacional (BRASIL, 2014).

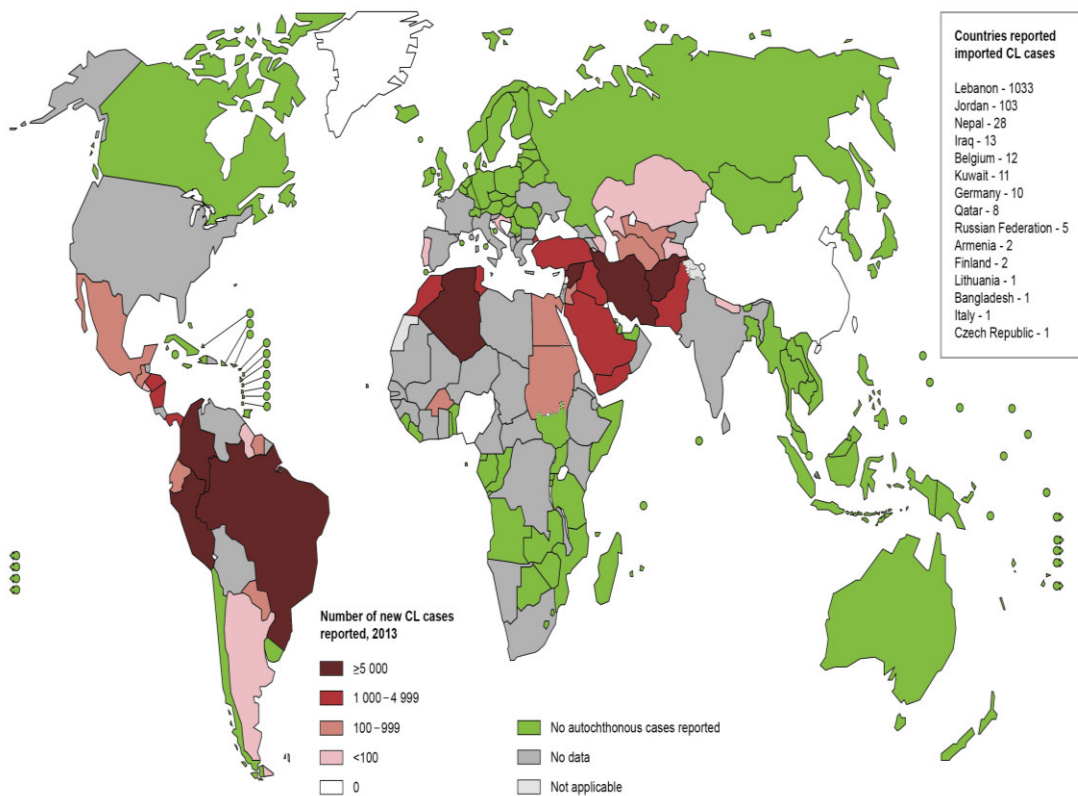
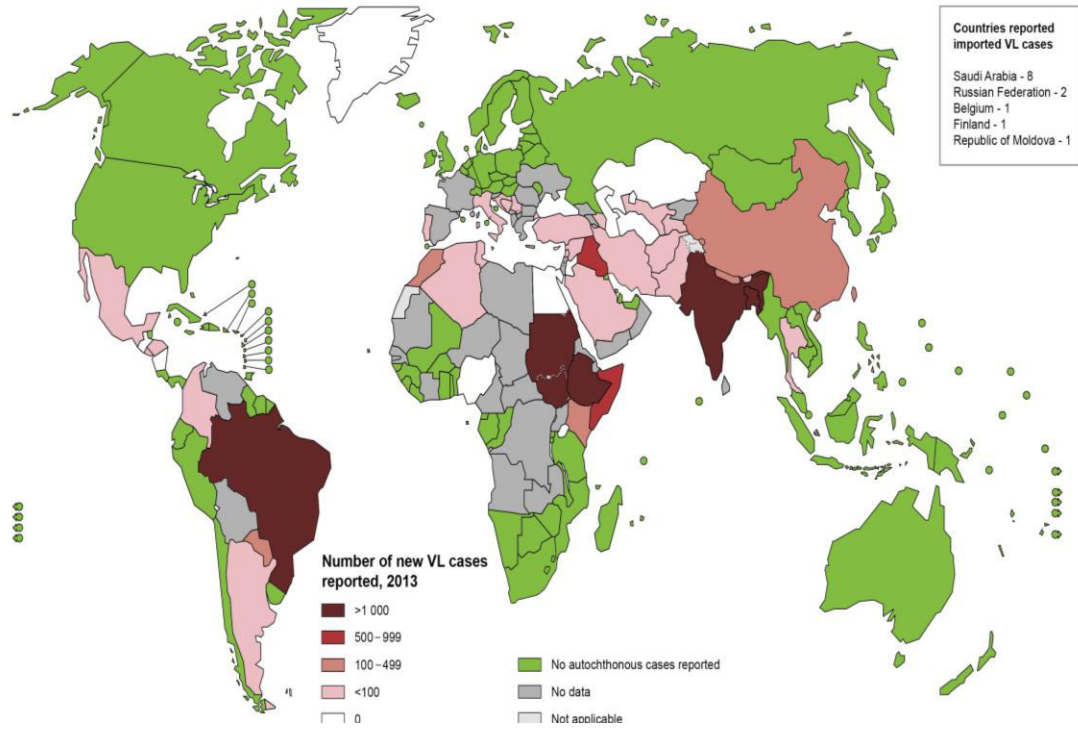


Figura 2: Distribuição das Leishmanioses no mundo em 2013. A: Leishmaniose visceral e B: Leishmaniose Tegumentar. Fonte: WHO, 2015.

No Brasil são encontradas todas as formas clínicas da doença, com maior destaque para a LT (COURRET et al., 2003; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010) que causa grande preocupação devido ao comprometimento da pele e mucosas. Ela produz geralmente úlceras nas partes expostas do corpo como face, braços e pernas. Quando as úlceras curam, podem deixar cicatrizes permanentes. Isto gera, não somente transtornos biológicos como também psicológicos, sociais e econômicos, pois trata-se de uma infecção dermatológica de grande magnitude (COUTO et al., 2014; MONTENEGRO-IDROGO et al., 2014; VELEZ et al., 2015).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

A depender da espécie de *Leishmania* inoculada no hospedeiro e das características imunológicas deste, a leishmaniose pode apresentar quadros clínicos distintos. Assim, a doença se apresenta sob três diferentes formas: a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LM) e a Leishmaniose Visceral (LV) (NOZZI et al., 2014).

A LC apresenta lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas, com borda circulares elevada e fundo granuloso, conforme mostra a Figura 3. Esta forma da doença pode se apresentar sob a forma localizada ou disseminada. Na forma localizada as lesões apresentam cura espontânea com controle da infecção em alguns meses. Já a forma disseminada pode apresentar ulcerações múltiplas papulares ou acneiformes decorrente da disseminação hematogênica (WHEELER; GLUENZ & GULL, 2011).

Na LM, as lesões podem conduzir à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e cavidades tecidos circundantes. Esta forma da doença apresenta um número de parasitos bem pequeno nas lesões, porém evolui com intenso infiltrado inflamatório, que resulta nas lesões desfigurantes na região do lábio superior e nariz. A lesão pode causar danos permanentes como a perfuração do septo nasal que pode vir acompanhada de perfuração do esôfago e mucosa traqueobrônquica. Esta forma apresenta alta morbidade (PALUMBO, 2010).

Por outro lado, a LV acomete órgãos viscerais, principalmente o baço e o fígado e também a medula óssea. Esta forma da doença é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso substancial, edema do baço e fígado e anemia. Em alguns casos, ocorre imunossupressão generalizada. Quando a LV não é tratada, a taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento pode ser elevada a 100%, no prazo de 2 anos (DAHER et al., 2008; LIBEROPOULOS et al., 2013).



Figura 3: Aspectos clínicos da lesão cutânea de Leishmaniose. Fonte: WHO, 2015.

2.4 Agentes etiológicos das leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) apresentam ciclo de vida heteroxênico, com duas formas principais, promastigotas e amastigotas (Figura 4). As formas promastigotas são alongadas, flageladas, extracelulares e medem entre 16 – 40 μm de comprimento e 1,5 – 3,0 μm de largura. Já as formas amastigotas são esféricas, com flagelo rudimentar internalizado e medem entre 1,5 – 3,0 μm de comprimento e 3,0 – 6,0 μm de largura e habitam principalmente o sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados. (BRASIL, 2007; UL BARI; RAHMAN, 2008).

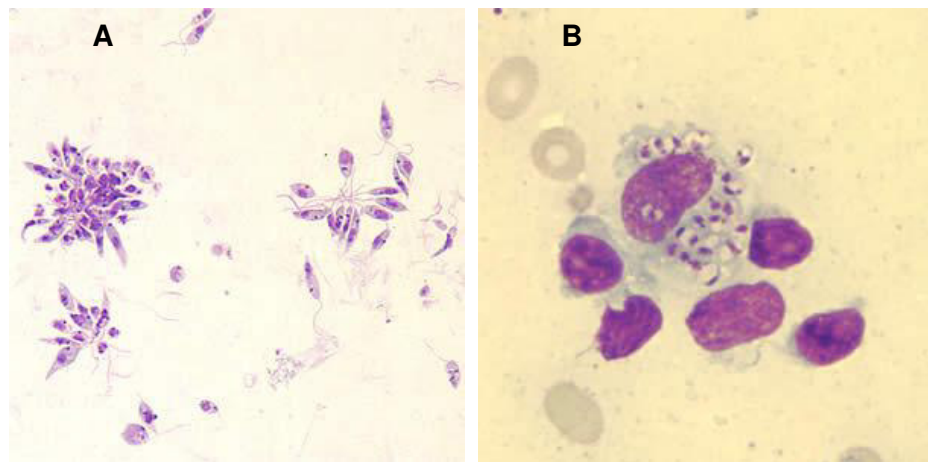


Figura 4: Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania sp.* Fonte: Adaptado de CDC, 2013.

Pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania* são causadoras da doença tanto na forma visceral quanto tegumentar em todo o mundo. No entanto, no Brasil foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* como causadoras da Leishmaniose Tegumentar. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. No estado do Maranhão, a LT é ocasionada com mais frequência pela *L. (V.)*

braziliensis e *L.(L.) amazonensis*. Para a Leishmaniose Visceral, porém, é comum que a infecção ocorra por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (BRASIL, 2007, 2014).

2.5 Vetores e ciclo biológico

Os vetores das Leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos (ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*). Estas espécies são conhecidas popularmente no Brasil, como mosquito palha, tatuquira ou birigui. Até o presente momento, foram descritas algumas espécies relacionadas com a transmissão do protozoário *L. chagasi* na LV, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi identificada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul. Para a transmissão de LT, *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* foram descritas (BRASIL, 2007, 2014).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. As fêmeas alojam as formas promastigotas dos protozoários no interior do seu tubo digestivo. Na porção anterior do órgão ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Ocorrerá em seguida, reprodução por divisão binária e diferenciação em promastigotas flageladas, que também se reproduzem por sucessivas divisões binárias. As formas promastigotas transformam-se nas formas paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2007; WHEELER; GLUENZ E GULL, 2011).

As fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto na epiderme do hospedeiro. Estas formas do protozoário são fagocitadas por macrófagos. No interior dos macrófagos, no fagolisossoma, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento das células, o que ocasiona, liberação destas formas que serão, novamente, fagocitadas por outros macrófagos em um processo contínuo (TEIXEIRA et al., 2013).

Enquanto os roedores, canídeos, marsupiais e primatas estão entre os principais reservatórios vertebrados, acidentalmente o homem pode ser acometido pela infecção, apresentando as supramencionadas manifestações clínicas distintas da doença (BRASIL, 2007). O ciclo de vida de parasitos de *Leishmania* está sumarizado na Figura 5.

2.6 Aspectos imunológicos da infecção por *Leishmania* sp.

Após a picada da fêmea do flebótomo, formas promastigotas presentes na glândula salivar são inoculadas na derme do hospedeiro. Com o início da infecção no homem, células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são recrutadas para a pele infectada na tentativa de eliminar o parasita. Deste modo, as promastigotas metacíclicas penetram nestas células dando início a uma série de eventos que determinarão o sucesso ou não, da infecção (HERMIDA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013).

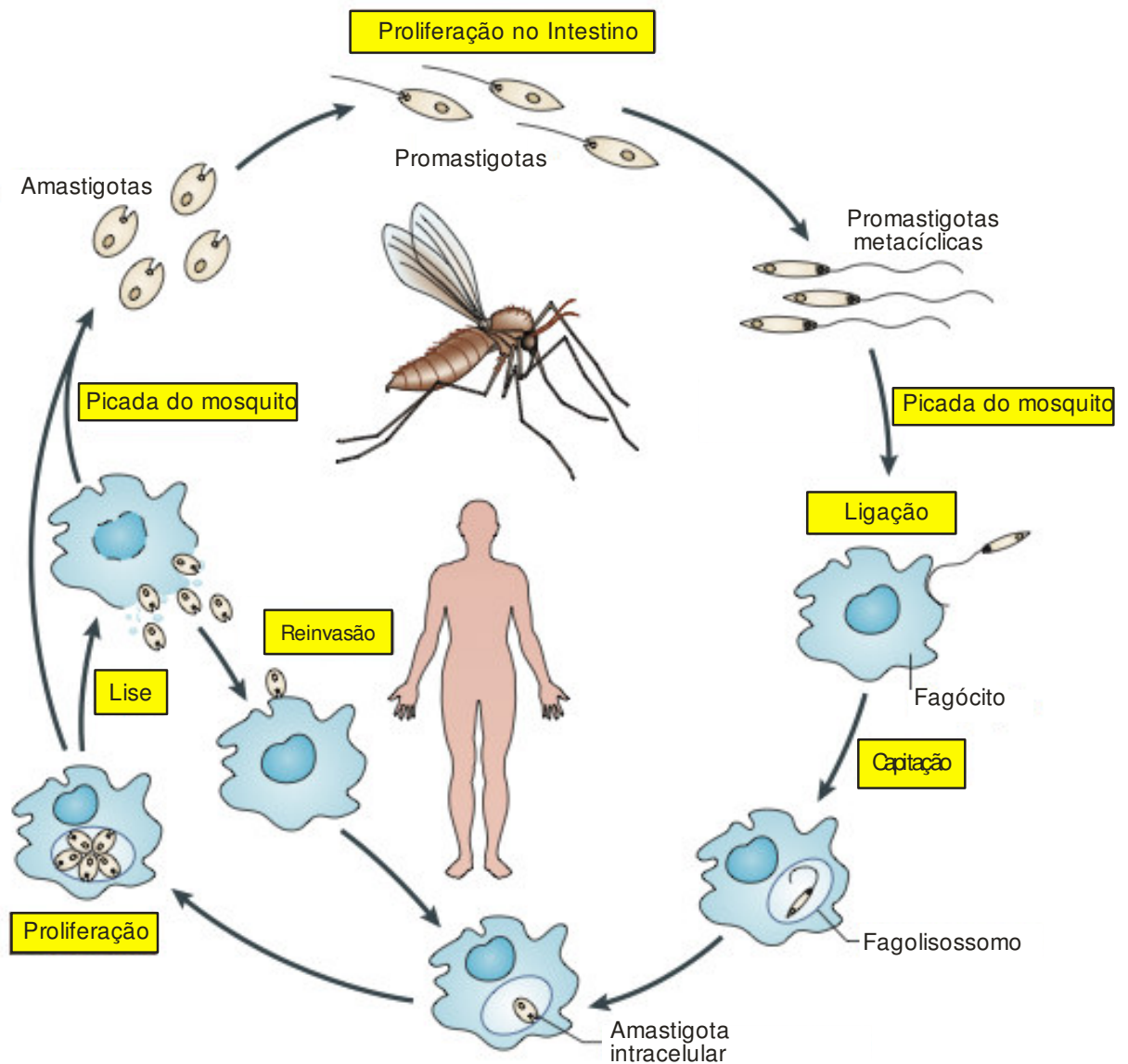


Figura 5. Ciclo de Vida de *Leishmania* (Adaptado de Kaye Scott, 2011).

Para penetrar nos macrófagos, complexos mecanismos moleculares estão envolvidos entre patógeno e hospedeiro. Uma proteína bastante relevante para esse processo é a metaloproteinase de zinco GP63, que está amplamente distribuída na superfície do protozoário e funciona como um agente de clivagem de proteínas do hospedeiro. A GP63 é responsável pelo processo de transcrição e tradução, pois altera no hospedeiro as vias de sinalização celular responsáveis pela morte do parasito dentro do fagolisossoma, contribuindo para a proliferação parasitária. Como

os protozoários *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, a presença dos macrófagos é indispensável para a sobrevivência parasitária bem como para sua multiplicação (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; SHIO et al, 2012).

Em resposta à estimulação promovida pelos protozoários, os macrófagos podem apresentar padrões distintos de diferenciação em fenótipos M1 e M2. Quando há produção de IFN- γ há classicamente ativação de células M1 que produzem óxido nítrico (NO) e possuem atividade leishmanicida, e por isso desempenham papel importante no controle da infecção por *Leishmania*. Esses macrófagos são naturalmente encontrados em camundongos C57BL/6. Em contraste, macrófagos do tipo M2, naturalmente presentes em camundongos DBA/2 e BALB/C, são induzidos por IL-4, expressam arginase – o que aumenta o metabolismo da arginina para ornitina – produzem poliaminas e estimulam a proliferação parasitária (MILLS et al., 2000; MILLS; LEY, 2014).

Os radicais derivados de nitrogênio (RNI) apresentam papel relevante no controle parasitário por atuarem no espaço intracelular, com mais eficácia do que os radicais derivados de oxigênio (ROI). O óxido nítrico (NO), por exemplo, é sintetizado por uma óxido nítrico sintase indutível (iNOS), presente na maioria das células, mas principalmente em macrófagos e neutrófilos. Enquanto a NADPH oxidase é um eficiente mecanismo de destruição dos microrganismos extracelulares fagocitados e aprisionados dentro do vacúolo fagocítico, o NO é mais efetivo contra os microrganismo que invadem o citosol, pois atua na decomposição dos grupos prostéticos de ferro-enxofre (Fe-S) de enzimas transportadoras de elétrons, na depleção do ferro e na formação de radicais tóxicos de peroxinitrito ($\cdot\text{ONOO}^-$).

A passagem de NO através das membranas dos lisossomos, permitindo sua ação citotóxica para *Leishmania*, é realizado por uma proteína transmembrana

codificada pelo gene *N-ramp*. (HORTA *et al.*, 2012; LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; MUKBEL *et al.*, 2007). Nramp1 é uma proteína transmembrana expressa exclusivamente no compartimento lisossomal de monócitos e macrófagos. Após a fagocitose, Nramp1 é direcionada para a membrana do fagossomo, onde pode afetar o microambiente dentro do fagossomo e impedir a replicação microbiana. Enquanto isso, Nramp2 pode captar íons bivalente, como o ferro 2^+ , do espaço do fagossoma, alterando o metabolismo do protozoário (SINGH, *et al* 2013).

Os neutrófilos, assim como macrófagos, também são rapidamente atraídos para o local da infecção e às vezes sua concentração é até maior que a dos macrófagos. Eles produzem mieloperoxidase (MPO), que reage com peróxido de hidrogênio levando a formação de ácido hipocloroso que destrói a membrana do protozoário. Também produzem perforinas que formam poros na membrana dos protozoários deixando-os sensíveis (MOLLINEDO *et al.*, 2010).

Contudo, a ativação de macrófagos e neutrófilos nem sempre é suficiente para eliminar definitivamente o protozoário, porque, em algumas ocasiões estes subvertem a ordem, criando mecanismos de evasão que permitem a proliferação dentro da célula até provocar sua ruptura. Assim, os protozoários liberados serão fagocitados por novas células ampliando o número de parasitos e o número de células infectadas (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; KAYE; SCOTT, 2011; ZAND; NARASU, 2014).

Por serem células com vida média curta, neutrófilos infectados por protozoários de *Leishmania* servem como um mecanismo de penetração nos macrófagos, evitando sua ativação e tornando estas células relevantes para a replicação parasitária. Esta teoria é conhecida como “cavalo de Tróia” (LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

Segundo a teoria do Cavalo de Tróia, as formas promastigotas metacíclicas, depositadas na pele, são rapidamente fagocitadas por neutrófilos circulantes ao local da picada. Os neutrófilos infectados aceleram a expressão de marcadores de apoptose. Com a morte destas células no local da infecção, parasitos viáveis são liberados, e se tornam melhor adaptados à sobrevivência intracelular e ao crescimento nesse ambiente, após serem fagocitados por macrófagos. Os macrófagos em geral são silenciados, ou tem a ativação inibida pela fagocitose dos corpos apoptóticos (RIBEIRO-GOMES & SACKS, 2012).

A infecção de células dendríticas da pele também parece ocorrer a partir da captura de neutrófilos infectados. A ligação da célula dendrítica ao neutrófilo infectado atrasa a montagem de uma resposta imune efetiva, direcionada contra o parasito, como mostra a resumidamente a Figura 6 (RIBEIRO-GOMES & SACKS, 2012).

Os neutrófilos, macrófagos e as células dendríticas contribuem também na resposta imune adaptativa. Neutrófilos liberam quimiocinas que recrutam linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) e monócitos para o local da infecção. A migração desse conjunto de células amplifica a resposta inflamatória necessária ao controle da infecção (BHATTACHARYA; ALI, 2013; NOVAIS; SCOTT, 2015).

Macrófagos, quando ativados, além de apresentarem mecanismos leishmanicidas supramencionados, também atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos T *naive*, via proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que uma vez ativados sofrem expansão clonal e completam sua diferenciação em célula T efetora, secretando citocinas com ação sobre a ativação de macrófagos e linfócitos (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; KAYE; SCOTT, 2011).

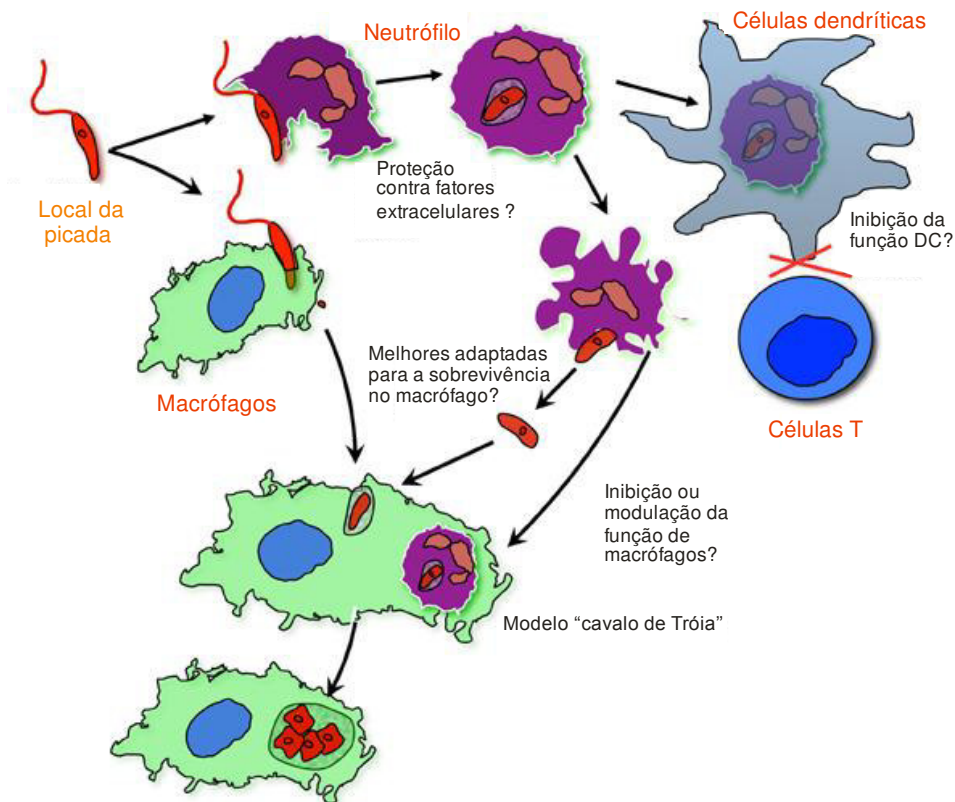


Figura 6: Papel imunomodulador dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* (Adaptado de RIBEIRO-GOMES & SACKS, 2012).

As citocinas secretadas pelos linfócitos T ativados estimulam a produção dos anticorpos pelos linfócitos B. Porém, estas células bem como os anticorpos que produzem – parecem desempenhar papéis duais na infecção por *Leishmania sp.* Estudos mostram que a resolução da infecção por *L. amazonensis* está relacionada tanto à ativação de macrófagos e produção de ROI, como também à produção de anticorpos anti-*Leishmania*. Por outro lado, há trabalhos que relatam que a presença de Linfócitos B e anticorpos estão envolvidos na patogênese da doença (MUKBEL *et al.*, 2007). Anticorpos anti-leishmania promovem a lise das promastigotas na presença do sistema complemento, o que facilita a fagocitose e subsequente eliminação desses parasitas, porém o papel destas moléculas ainda vem sendo alvo de muitos estudos.

Citocinas como IFN- γ e TNF- α , bem como seus receptores, possuem papel determinante nos momentos iniciais da infecção e são relevantes para prevenir e controlar o crescimento microbiano, pois sua presença é fator crucial para recrutamento de células efetoras, bem como para o estabelecimento da resposta imune inata e adaptativa direcionada à eliminação parasitária (SOUZA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014) (Figura 7).

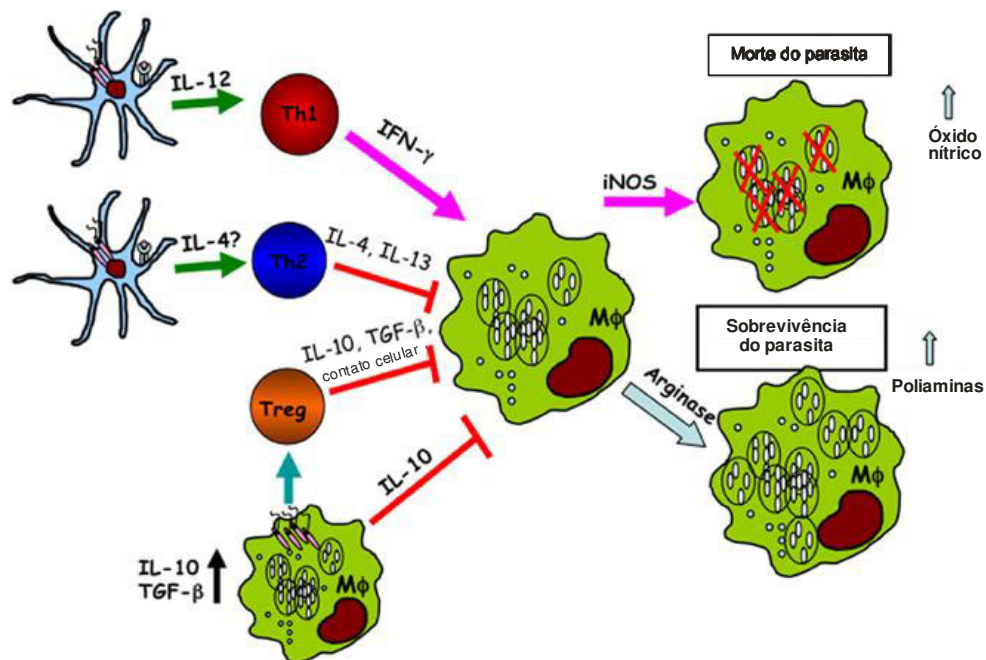


Figura 7: Células dendríticas e Macrófagos regulam a infecção por Leishmania (Adaptado de LIU & UZONNA, 2012).

As quimiocinas produzidas no local de uma infecção são pontos críticos para definir a composição de células que se infiltram e a seqüência de eventos que levam à resolução ou manutenção da doença. Na leishmaniose cutânea, por exemplo, a produção das quimiocinas CCL2, CXCL10 e CXCL9 está associada à presença do infiltrado dérmico de macrófagos e Linfócitos CD4⁺ (MELO *et al.*, 2015). Por outro lado, o perfil de quimiocinas liberadas em lesões de leishmaniose cutânea difusa é dominado por Linfócitos T que secretam citocinas do padrão Th2 de resposta (IL-4, IL-10 e IL-13) com elevada expressão de CCL3. Nesse caso, o

infiltrado dérmico é mais difuso e com poucos linfócitos CD4⁺ (DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2013).

Os Linfócitos T auxiliares (Th – T *helper*) também podem sintetizar e excretar citocinas que determinarão o resultado da infecção. A presença de IFN- γ e IL-12, por exemplo, estão, na maioria das vezes, associadas ao controle da infecção, devido ao papel dessas citocinas na ativação de macrófagos, o que pode resultar num eficiente mecanismo de eliminação do parasito. Por outro lado, em indivíduos com a infecção não controlada observa-se expansão de linfócitos Th2, cuja expressão de citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 está exacerbada. Porém, nem todas as manifestações da doença obedecem a um padrão de polarização de resposta imunológica. Na leishmaniose visceral, por exemplo, a resposta não é estritamente do tipo Th2. Estudos de determinação de mRNA tem mostrado, simultaneamente, informação codificante de citocinas IL-10 e IFN- γ em células do baço e medula óssea (KHOSHDEL *et al.*, 2009; NYLÉN *et al.*, 2007; SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011):

A regulação do sistema imune é considerada fator relevante para a resolutividade da infecção, pois em infecções murinas causadas por *L. amazonensis*, a susceptibilidade em linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c está relacionada com a ativação da resposta Th1 e Th2, respectivamente, com baixa produção de IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-4 (SOONG, 2012). Em outros casos, foi observado que há aumento na produção de IL-10, IL-12 e IFN- γ circulante durante a infecção por *Leishmania*. Como a resposta inicial pode ser considerada mista Th1/Th2, a resolução da doença está associada à uma diminuição simultânea de IL-10 e IFN- γ , indicando que tanto linfócitos Th1 quanto Th2, durante a doença ativa regridem seu metabolismo se o tratamento for eficaz. As citocinas IL-10 e TGF- β

indiscutivelmente atuam como citocinas reguladoras e inibem a atividade de linfócitos Th1 (KHOSHDEL *et al.*, 2009; SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

2.7 Tratamento farmacológico das leishmanioses

O atual tratamento das leishmanioses inclui o uso de antimoniais pentavalentes, antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) (Figura 8) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) como medicamentos de primeira escolha para o tratamento. Estes fármacos têm sido indicados para tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea por várias décadas (CROFT; YARDLEY, 2002; TORRES *et al.*, 2010). Porém, apresentam elevada toxicidade e sua eficácia tem diminuído ao longo dos anos, devido à resistência decorrente do tratamento de longa duração e, muitas vezes, de forma descontinuada (TUON *et al.*, 2008).

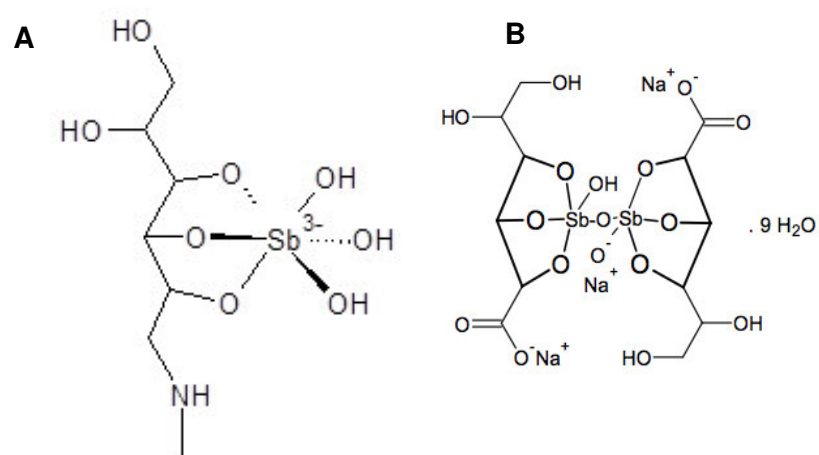


Figura 8: Fórmula estrutural proposta para o Glucantime (A) e Estibogluconato de sódio de Sódio (B).
(Adaptado de FRÉZARD *et al.*, 2008)

Diferentes regimes de dosagens têm sido propostos progressivamente na tentativa de estabelecer a dose terapêutica mais efetiva, com menos efeitos

colaterais possíveis, levando-se em conta ainda a responsividade do indivíduo em relação à terapia. Para a leishmaniose cutânea é preconizado, como eficaz, a dose de 20mg/kg/dia de Glucantime® , por via parenteral, durante três a quatro semanas (ANDERSEN *et al.*, 2005).

Indivíduos que são intolerantes aos antimoniais pentavalentes ou ainda, que apresentam resistência podem fazer uso de Pentamidinas como o isotionato de Pentamidina. O fármaco é um derivado sintético da amidina utilizado para o tratamento de outras infecções, mas que também apresenta efeito leishmanicida, por mecanismos ainda pouco compreendidos. A principal vantagem deste medicamento está relacionada ao curto tempo de administração. Porém, seu uso promove alta taxa de morbidade, devido ao aparecimento de doenças correlacionadas à sua administração, como hiperglicemia, alterações cardiovasculares e doença pancreática (MINODIER; PAROLA, 2007).

Os antimoniais pentavalentes interferem na produção de energia das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo o metabolismo dos carboidratos e lipídeos. De modo que tanto a via glicolítica como a β -oxidação de ácidos graxos são alteradas impedindo a produção de energia. Além disso, aumentam a produção de TNF- α , ROI e NO. Os carboidratos, como o ácido glicônico (presente no Pentostan® e no Glucantime®), são capazes de formar complexos com o átomo de antimônio, solúveis em água, possibilitando a distribuição dos agentes antimoniais em macrófagos infectados (SERENO *et al.*, 2001; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Quando o indivíduo torna-se não responsivo aos antimoniais pentavalentes, inclui-se na terapia medicamentosa a Anfotericina B (Figura 9). Tanto a leishmaniose cutâneo-mucosa quanto a leishmaniose visceral têm sido tratadas com

seu uso. Entretanto, este fármaco só tem sido indicado para tratamento da leishmaniose cutânea quando o paciente não responde ao tratamento com os antimoniais. A anfotericina B potencializa a atividade microbicida de macrófagos, estimula a produção de TNF- α e IL-1 β , e a explosão respiratória (CUNA *et al.*, 2007). Assim como ocorre com os antimoniais pentavalentes a administração é feita por via endovenosa de forma lenta e gradual.

A anfotericina B apresenta entre os efeitos colaterais a nefrotoxicidade acentuada. Novas preparações têm sido elaboradas a exemplo da forma lipossomal. Considerando a toxicidade, esta forma é bem mais segura do que a terapia convencional. Embora o tratamento com a forma lipossomal seja mais efetivo, pois pode ser utilizado em pequenas doses e possui maior efeito contra as formas amastigotas, apresenta elevado custo, o que resulta em baixa adesão ao tratamento e inviabiliza a sua inclusão no tratamento de rotina (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2015; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

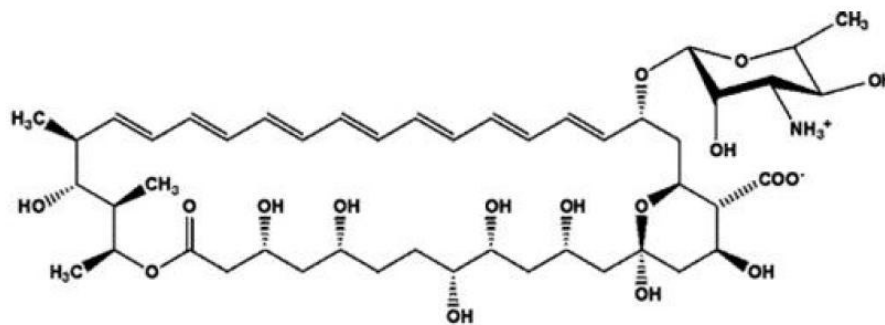
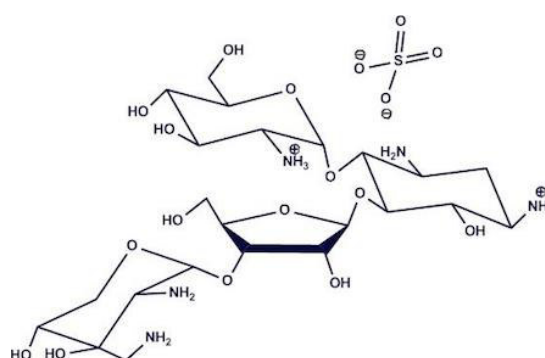


Figura 9: Fórmula estrutural proposta para a Anfotericina B (GIL *et al.*, 2007).

Outra
da leishmaniose
paranomicina



opção de tratamento
cutânea é a
(Figura 10) (ASILIAN *et*

al., 2003) que é mais conhecida por seu efeito contra *Giardia*, *Entamoeba* e *Criptosporidiu*. Comumente, é utilizada por via oral, mas para o tratamento da leishmaniose é utilizada por via tópica. Embora seu efeito por via endovenosa também tenha sido mostrado. Algumas espécies de *Leishmania*, como *L. mexicana*, são bastante sensíveis ao tratamento com paromomicina (DAVIS; KEDZIERSKI, 2005).

Figura 10: Fórmula estrutural proposta para a Paromomicina.

Em diversos momentos da sua utilização, a paromomicina tem sido associada com outras drogas. As associações com metilbenzetonio (12%) e uréia (10%) têm sido relatadas. A primeira associação tem mostrado eficácia, mas em relação à ureia, pouco ou nenhum benefício com as associações foram detectados (DOS SANTOS, ALINE MARQUES *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2005).

2.8 O processo de cicatrização

O processo de cicatrização é bastante dinâmico e envolve uma série de processos inflamatórios acompanhados de proliferação celular com remodelamento tissular. Para que ocorra adequadamente, deve ocorrer de forma concatenada, tanto do ponto de vista celular, como do ponto de vista molecular. Atualmente, divide-se o

processo de cicatrização nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento (ARNOLD et al, 2014).

Em tecidos normais, a fase inflamatória geralmente dura entre 1 a 3 dias e apresenta os sinais clássicos da inflamação, como dor, calor, rubor e edema. Ela ocorre juntamente com a liberação de substâncias vasoconstritoras, como prostaglandinas e tromboxana A₂, pelas membranas celulares. Além disso, há formação do tampão de coagulação devido à presença das plaquetas que liberam fator beta de crescimento e transformação (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanas (ISAAC et al, 2010). Os neutrófilos, devido a presença das substâncias supramencionadas, são massivamente atraídos para o local das lesões, após as primeiras 24 horas. Eles aderem à parede do endotélio e produzem substâncias microbidas que contribuem para destruição bacteriana, quando for o caso. Posteriormente os neutrófilos são eliminados e há então um infiltrado de macrófagos, nas próximas 48 horas, bem como aos linfócitos (WILGUS et al, 2013).

O infiltrado de leucócitos desempenha relevante papel na secreção de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas que estimulam a proliferação de células progenitoras, bem como recrutamento de queratinócitos e células endoteliais durante a fase proliferativa e de reparo celular.

Macrófagos, por exemplo, estabilizam a ferida por atuarem na fagocitose de bactérias e tecido necrosado, bem como na degradação do colágeno e elastina. Este processo é relevante porque prepara a área lesionada para a fase proliferativa além de contribuir para o desenvolvimento do tecido de granulação (KOH; DIPIETRO, 2011).

Na fase proliferativa ou fibroblástica, que dura entre o quarto e o décimo quarto dia, ocorre epitelização gradual da ferida para regenerar o tecido. Nesta fase ocorrem processos de epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (GUO; DIPIETRO, 2010).

As células epiteliais contribuem para o processo de re-epitelização migrando para a borda da ferida no tecido danificado. Após este estágio, forma-se tecido de granulação com angiogênese e, conseqüente formação de nova matriz extracelular. Concomitante a isto, há proliferação de fibroblastos que compõe tecido conjuntivo responsável por sintetizar proteínas relevantes na constituição da pele, a exemplo do colágeno. Os fibroblastos também produzem TGF- β , inibidores de metaloproteinase, e fator de crescimento dos queratinócitos que tem ação mais efetiva na re-epitelização (SHAD et al, 2012).

A angiogênese é estimulada principalmente por TNF- α e VEGF. Nesta etapa, observa-se migração de células endoteliais e formação de capilares, que são relevantes para formação do novo tecido e cicatrização adequada. Em seguida, ainda na fase proliferativa, há formação de tecido de granulação. Além dos fibroblastos, as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF12. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos (BAO et al, 2009; EMING, et al 2007).

No final da fase de reparo ou remodelamento, tem-se a fase de maturação com contração da ferida e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, estimulados por TGF- β e PDGF. Enquanto isto, os miofibroblastos expressam α -

actina e α -miosina, com relevante capacidade para expandir e movimentar-se ao longo da lesão. Nesta movimentação, há ainda depósito de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina. Daí começa a deposição das moléculas de colágeno de maneira organizada na ferida que contribuirá na formação do tecido cicatricial, com conseqüente degradação da matriz antiga. O sucesso deste processo consiste no equilíbrio entre a degradação da matriz extracelular antiga e a síntese da matriz nova (LI et al, 2007).

2.9 Uso de bioprodutos para o tratamento da leishmaniose

A busca por novos produtos que tenham maior eficácia, baixo custo e menos efeitos colaterais para o tratamento da leishmaniose é alvo de muitos grupos no mundo todo, considerando que todos os tratamentos disponíveis no mercado farmacêutico apresentam elevada toxicidade e, em alguns casos, custos elevados. (GONZALEZ *et al.*, 2009).

No Brasil, tem-se ainda como fator agravante que os tratamentos de primeira escolha são importados e apresentam elevado custo para aquisição. O governo inclusive já tentou estimular a indústria brasileira a produzir fármacos anti-leishmania, como tentativa de abastecer o programa de controle e tratamento da leishmaniose, porém o produto lançado no mercado foi suspenso devido aos efeitos adversos causados pela presença de arsênico e chumbo na sua composição (OLIVEIRA; GILBERT; VILLAS BOAS, 2013).

Nesse contexto, torna-se clara, a necessidade de buscar alternativas terapêuticas ao tratamento da leishmaniose. Para auxiliar nesta busca, estudos etnobotânicos têm sido realizados em comunidades endêmicas para a leishmaniose.

Eles contribuem para determinação das principais espécies vegetais relatadas pela população no tratamento da doença e adquirem relevante destaque quanto à sua utilização pela população.

Diversas espécies vegetais têm sido investigadas quanto à sua ação no tratamento da leishmaniose. A atividade biológica tem sido atribuída tanto aos compostos isolados, quanto à atuação sinérgica de diversas substâncias. A espécie vegetal *Kalanchoe pinnata*, família Crassulaceae, conhecida popularmente como saião roxo, é popularmente utilizada para cicatrização da pele. Porém, nos últimos anos tem sido relatado que a espécie apresenta relevante efeito leishmanicida, o qual tem sido atribuído ao flavonóide 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1->2)- α -L-rhamnopyranoside (GOMES et al., 2010; MUZITANO, et al 2011).

Alguns autores têm atribuído atividade leishmanicida das espécies vegetais a presença de flavonoides (WONG et al, 2014). Os flavonoides do tipo catequinas formam complexos com a parede celular do parasito e influenciam o processo de divisão celular, inibindo o crescimento parasitário. Outras vias de ação dos parasitos podem também ser alteradas por flavonóides, pois esses compostos inibem a enzima arginase, responsável pela síntese de poliaminas que protegem o parasito contra stress oxidativo e ROI (OGETO et al, 2013).

Adicionalmente, a atividade leishmanicida tem sido atribuída à outros tipos de compostos químicos no tratamento da leishmaniose tegumentar. O extrato de *Plumbago capensis*, rico em saponinas apresentou efeito leishmanicida. Sua terapia combinada com acridina reduziu a carga parasitária em animais infectados com *Leishmania major* (MAKWALI et al, 2012).

Não raro, também se observa grandes estudos de triagem para avaliação do potencial de leishmanicida de extratos vegetais brutos.

Segundo França et al (1996), *A. occidentale* está relacionada entre as espécies vegetais, para uso medicinal na leishmaniose, no estado da Bahia, área endêmica para a doença. No Maranhão, Moreira et al (2002) mostraram que além de *A. occidentale* (caju), outras espécies, tais como: *Stachytarpheta cayennensis* (gervão); *Allium sativum* (alho); *Copaifera spp.* (copaíba) e *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), são comumente utilizadas pela população para o tratamento da leishmaniose.

Para *A. occidentale* as cascas do caule, folhas e raízes entre outras partes foram os farmacógenos mais relatados quanto à sua utilização no tratamento das leishmanioses (FRANÇA; LAGO; PHILIP, 1996; MOREIRA *et al.*, 2002). RIBEIRO et al, 2014, realizaram experimentos para avaliar os efeitos anti-*L. amazonensis* de 44 espécies vegetais, sendo 16 delas eram nativas do Brasil. A maior atividade leishmanicida identificada foi atribuída a *Dipterix alata* e *Jatropha cuspidifolia*, principalmente pelo potencial dessas espécies em estimular a produção de NO.

Patrício et al, 2008 mostraram o efeito leishmanicida de extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* em camundongos C3H/Hepas infectados com *L. amazonensis*. Neste trabalho, foi mostrado ainda que o tratamento mais efetivo ocorreu por via intralésional, quando comparado à via oral. O efeito leishmanicida do tratamento com *C. ambrosioides* foi atribuído ao expressivo aumento da produção de NO por macrófagos ativados (PATRÍCIO et al, 2008). As frações hexânica e clorofórmica foram as que apresentaram maior efeito leishmanicida, contra *L. amazonensis*, *in vitro*, em detrimento das frações acetato de etila e da fração hidroalcoólica (REIS et al, 2012).

Para a espécie *A. occidentale*, são escassos os estudos que avaliam sua atividade leishmanicida. O extrato hidroalcoólico da casca do caule (7,5 e 15

mg/mL) reduziu a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*, devido a citotoxicidade direta (Franca et al., 1993, FRANCA, LAGO, MARSDEN, 1996). Atividade leishmanicida semelhante foi descrita por Luize et al. (2005) em relação aos efeitos do extrato etanólico das folhas de *A. occidentale* (100 µg/mL) sobre a redução da viabilidade dos protozoários, porém o extrato foi mais efetivo sobre as formas amastigotas do que sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* em culturas axênicas.

Até o presente momento, o único trabalho que investigou o potencial leishmanicida das flores de *A. occidentale* refere-se aos estudos de SILVA, 2012. Neste trabalho foi observado que o extrato hidroalcoólico apresentava efeito leishmanicida tanto *in vitro*, como *in vivo* quando administrado por via intralésional. A atividade biológica do extrato foi atribuída tanto ao seu efeito direto contra os protozoários de *L. amazonensis*, quanto a seu efeito imunológico, pois o tratamento foi efetivo em montar uma resposta para eliminar o protozoário.

Como são escassas as investigações científicas relacionadas à atividade biológica das flores de *Anacardium occidentale* e devido à suas importantes propriedades farmacológicas e ao seu efeito microbicida, investigamos no presente estudo a atividade anti-*Leishmania* das flores desta espécie vegetal, bem como seu efeito cicatrizante em lesões de pele considerando inclusive a ação de um bioproduto elaborado a partir do extrato.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial anti-leishmania e cicatrizante do extrato bruto e de uma formulação obtida do extrato das flores *Anacardium occidentale* L.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar a síntese de formulação do tipo emulsão com extrato das flores de *Anacardium occidentale* L. e avaliar seu efeito cicatrizante - CAPÍTULO I.
- Avaliar o potencial leishmanicida de extratos das flores de *Anacardium occidentale* L., compostos isolados e formulação do tipo emulsão - CAPÍTULO II;
- Desenvolver e testar um produto biotecnológico tendo como base compostos bioativos presentes nas flores de *A. occidentale* – CAPÍTULO III.

4. CAPÍTULO I

Artigo à ser submetido ao Journal BMC Biotechnology

Delineamento físico-químico e efeito cicatrizante de creme tipo emulsão contendo extrato de *Anacardium occidentale* L.

Luecya A. C. Silva e Rosane N. M. Guerra

**Delineamento físico-químico e efeito cicatrizante de creme tipo emulsão
contendo extrato de *Anacardium occidentale*.**

Lucyia Alves de Carvalho Silva¹, Rosane Nassar Meireles Guerra^{1#}

¹Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
Brasil.

#Autor para correspondência: Rosane N. M. Guerra rnmguerra.pq@cnpq.br

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, CEP: 65085-580 São Luís, Maranhão – Brasil.

Telefone: +55-98-3272-8548

*E-mail: rnmguerra@pq.cnpq.br

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade cicatrizante de formulações farmacêuticas à base do extrato das flores de *Anacardium occidentale* L., bem como avaliou a estabilidade dessas formulações. Após a formulação de uma emulsão foram realizados testes de estabilidade considerando-se o pH, espalhabilidade e viscosidade dos bioprodutos obtidos. Em seguida foi avaliado o potencial cicatrizante de formulação farmacêutica tipo Lanette à base de *A. occidentale* (FAo). Durante os estudos de pré formulação observou-se que a acidez do extrato ocasionou incompatibilidades físico-químicas nas formulações do tipo gel e creme não-iônico, limitando o estudo de estabilidade acelerada no creme aniônico. Os resultados mostraram que havia necessidade de correção do pH para aplicação na pele. Já a formulação FAo apresentou relevante estabilidade, especialmente na temperatura ambiente e também apresentou atividade cicatrizante semelhante ao grupo controle positivo, tratado com DexPantenol. A avaliação da produção de citocinas por CBA (Cytometric beads assay), mostrou que a atividade cicatrizante de FAo, pode estar associada ao aumento de IL-6, citocina envolvida no processo de reepitelização, provavelmente por ativação celular no local da ferida. A efetividade da preparação contendo o extrato das flores de *A. occidentale* na atividade cicatrizante mostrou-se promissora e a limitação do presente estudo refere-se à utilização do produto somente em modelo experimental, abrindo assim novas perspectivas de avaliação de sua potência e eficácia em outros modelos de lesões.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L, emulsões, cicatrização, estabilidade, formulação, IL-6.

Abstract

This research aimed to evaluate the healing effect of pharmaceutical formulations prepared with *Anacardium occidentale* L. flowers, as well as to investigate the stability of this product. After the emulsion preparation, stability tests were performed considering the pH, spreadability and viscosity from the bioprodutos obtained. The acidity of the extract resulted in physico-chemical incompatibilities in gel-like and

non-ionic cream formulations , limiting the accelerated stability study of the anionic cream, based on the results it was possible to conclude that it will be necessary to correct the pH for human skin applications. The lanette type formulation (FAo) already showed higher stability, especially at room temperature, and a wound healing activity similar to the positive control group, treated with DexPanthenol. The evaluation of cytokine production by CBA assay showed an increased production of IL-6. As IL-6 increase, has been associated to the re-epithelialization process it is reasonable to propose a participation of this cytokine on the cellular activation at the wound site. The effectiveness of the preparation containing the extract of flowers of *A. occidentale* in wound healing activities proved to be promising. The limitation of the present study is related to their evaluation in only on model of wound healing, but at the same time our results open a new field of investigation concerning the efficacy of our product in other models of wound.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L, emulsion, wound healing, stability, formulation, IL-6.

Introdução

Anacardium occidentale L., popularmente conhecida como cajueiro, é uma espécie vegetal nativa do Brasil com ampla distribuição na região tropical [1]. No Estado do Maranhão, a espécie é principalmente encontrada nas regiões dos chapadões, cocais, baixada, pré-amazônia maranhense e litoral [2].

A atividade hipoglicemiante das folhas [3] e flores [4], antimicrobiana da casca, flores e folhas [5, 6], antioxidante do pseudofruto e das flores (4; 5) e cicatrizante do polissacarídeo da goma foram relacionadas à espécie vegetal.

A análise química dos constituintes do extrato da flor identificou a presença de ácidos orgânicos, alcalóides, compostos fenólicos, saponinas, taninos triterpenos, flavonas, flavonóis, flavononas, esteróides e xantonas (1,7–9). Conseqüentemente,

os estudos realizados atribuem às atividades biológicas de *A. occidentale*, a seus componentes químicos identificados (10–12).

Compostos de origem natural, que possuem atividade antimicrobiana como é o caso de *A. occidentale* apresentam futuro promissor na síntese de substâncias destinadas ao tratamento de lesões de pele, pois na fase inflamatória do processo cicatricial as lesões podem ser acometidas por patógenos da pele e/ou externos prejudicando o processo de reepitelização [13, 14].

Considerando as importantes propriedades biológicas já descritas, uma emulsão contendo extrato das flores de *A. occidentale* (FAo) foi sintetizada e analisada quanto às suas características físico-químicas, bem como em relação ao seu potencial terapêutico no processo de cicatrização.

Material e Métodos

Obtenção do extrato

As flores de *A. occidentale* (Anacardiaceae) foram coletadas na Cidade Universitária Dom Delgado, da Universidade Federal do Maranhão (São Luis, MA, Brasil), entre agosto e setembro de 2013, sempre pela manhã. Os exemplares foram identificados, a partir de exsiccatas, no Herbário Ático Seabra da mesma Universidade (Voucher espécime nº 1050).

Para obtenção dos extratos as flores foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por 24 horas, seguida de estufa a 37 °C, durante sete dias. O material seco foi triturado em moinho elétrico (TENAL TE 340) e extraído por maceração em etanol (MERCK), repetindo o processo a cada semana, por três semanas. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida, liofilizado e

estocado em frascos estéreis a 4°C, até a realização dos ensaios. O extrato das flores de *A. occidentale* apresentou rendimento médio de 15% [4].

Obtenção das formulações

Inicialmente foram sintetizados vários tipos de formulações para avaliar a compatibilidade destas com o extrato das flores de *A. occidentale*. Os cremes aniônicos e não iônicos, e o gel hidrofílico produzidos no presente estudo, foram as formulações escolhidas, em função da boa espalhabilidade, boa permeação de princípios ativos, baixa oleosidade e garantia de boa aceitação pelo mercado consumidor [15].

A emulsão foi preparada segundo método tradicional de inversão de fases a partir da seguinte metodologia, resumidamente: as fases oleosa e aquosa foram aquecidas separadamente a $77^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Após fusão dos componentes foi feita a mistura das fases, com agitação constante, em agitador mecânico (modelo 713 - Fisatom) até resfriamento (ANSEL, 2000). Posteriormente, o extrato liofilizado das flores de *A. occidentale* foi incorporado à formulação, na proporção de 5%. Todo o procedimento ocorreu à temperatura ambiente. Para as preparações foram utilizadas as ceras auto-emulsificantes Lanette N[®] e Polawax, nas concentrações de 9 e 12% respectivamente. Na Tabela 1 estão descritas as matérias primas utilizadas na preparação das bases e suas respectivas concentrações. A formulação do tipo Lanette foi denominada (LC) e a formulação do tipo Lanette acrescida do extrato liofilizado das flores de *A. occidentale* na concentração 5% foi denominada (FAo).

Para o desenvolvimento do gel, o agente geleificante foi disperso em metade do volume de água e a mistura foi aquecida até 70°C, em seguida foram adicionadas as demais matérias-primas, com exceção do composto alcalinizante. A preparação

foi misturada até obtenção do gel, quando o pH foi corrigido pela adição de AMP 95. Exclusivamente nesta formulação, foram acrescentados 0,025% do extrato das flores de *A. occidentale*, previamente solubilizado com glicerina.

Estudo da estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade foram realizados de acordo com o proposto no Guia de Estabilidade sugerido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [16]. Todas as amostras foram armazenadas em condições que pudessem acelerar as mudanças passíveis de ocorrer, permitindo, assim, obter informações sobre a estabilidade do produto em menor tempo possível.

Amostras das formulações LC e FAo foram acondicionadas em frascos, adequados para as condições de temperaturas utilizadas, com tampa e sob abrigo de luz. O volume total do frasco não foi completado para permitir possíveis trocas gasosas. As formulações foram avaliadas quanto à estabilidade nas temperaturas de estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), refrigerador ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas nos intervalos de 24h (T0), 7 dias (T7), 15 dias (T15), 30 dias (T30), 60 dias (T60) e 90 dias (T90), após o início do acondicionamento. Foram consideradas na avaliação as características organolépticas (aspecto, cor e odor), separação de fase por centrifugação, espalhabilidade, viscosidade e pH

Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada tanto no extrato bruto de *A. occidentale*, quanto nas formulações FAo e CL, utilizando o potenciômetro (T100 -Tekna). Para a determinação do pH no extrato, foi feita a dispersão a 10% (p/p) do extrato liofilizado

em água destilada. Para a determinação do pH das emulsões não houve diluição, sendo utilizado como material a formulação preparada, segundo descrito anteriormente [17].

Viscosidade

Para avaliação da viscosidade foi utilizado um viscosímetro (Q860 M21 - Quimis), spindle nº 4, 30 rpm, por 5 minutos. Os resultados foram expressos em milipascal (mPa.S) [16].

Espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada como descrito previamente [18]. Uma placa molde circular, de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20cm x 20cm) posicionada sobre escala milimetrada e fonte luminosa, onde foram aplicados 0,3 mL de cada formulação. A espalhabilidade foi calculada através da equação abaixo, onde: E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2) e d = diâmetro médio (mm) [18].

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Ensaio Biológicos

Foram utilizados 45 camundongos Swiss machos com idade de 2 meses pesando em média 25g. Os animais, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão, foram mantidos durante os ensaios, no Biotério de experimentação do Laboratório de Imunofisiologia, sob condições de umidade e

temperatura padronizadas, com ciclo de claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram oferecidos *ad libitum*, durante todo o estudo.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão sob número de protocolo 23115.003585/2015-12.

Indução da Lesão

Os animais (n=45) foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina/ cloridrato de ketamina [(xilazina a 2% (20 mg/kg) e ketamina a 5% (25 mg/kg)], via intramuscular. Em seguida, os animais foram tricotomizados no dorso, para a excisão do retalho dermatológico, com auxílio de um *punch*, até a exposição da fáscia muscular dorsal, com área de 1cm de diâmetro, utilizando-se tesoura e pinça de dissecação anatômica. A hemostasia das feridas foi feita com uma leve compressão com gaze estéril embebida em solução salina (NaCl 0,9%). Todos os animais foram mantidos aquecidos e com os olhos hidratados com soro fisiológico, até a recuperação do efeito da anestesia.

Avaliação do Efeito Cicatrizante

Após indução das lesões os animais foram divididos em 3 grupos de 15 camundongos e tratados, por via tópica, diariamente por 14 dias, com 100 µL do creme lanette (grupo LC) ou com o mesmo volume do creme das flores de *A. occidentale* 5% (grupo FAo) e comparados ao controle positivo tratado com dexpanthenol (grupo DexP)

Toda a manipulação do creme foi feita em ambiente estéril e sempre antes do tratamento as lesões foram limpas com gaze estéreis embebidas em soro

fisiológico .

Avaliação Macroscópica

Nos dias 0, 3, 7 e 14 foram mensurados o diâmetro maior (D) e diâmetro menor (d) da lesão, com auxílio de um paquímetro digital. A área da lesão foi calculada através da fórmula da circunferência:

$$A = MD^2 \cdot \pi,$$

onde MD é a média aritmética do “D e d”.

As lesões foram examinadas diariamente com auxílio de lupa para verificação da formação de crostas, ocorrência de sangramentos, formação do tecido de granulação, hiperemia e crescimento de pelos ao redor da lesão, necrose e tumefação.

Análise Histológica

A análise histológica foi realizada em 5 animais/grupo nos dias 3, 7 e 14. Os animais foram mortos com excesso de solução anestésica cloridrato de xilazina/ cloridrato de ketamina (xilazinaa 2% e ketamina a 5%), via intramuscular, e em seguida, foi retirado de cada animal, a área da lesão com margem de 0,5 cm² da borda da ferida. Os cortes foram estendidos sobre um papel de filtro de 2 cm² para evitar dobramento e conservados em formalina tamponada (10%). Posteriormente, o tecido foi desidratado em soluções com concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina histológica. Secções de 5µm de diâmetro foram obtidas e coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40. Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio, com aumento de 100X e 400X.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: infiltrado inflamatório, edema, angiogênese, reepitelização, tecido de granulação, proliferação fibroblástica e fibras colágenas. Alterações teciduais foram analisadas e caracterizadas como ausente (0), fraco (1), moderado (2) e intenso (3).

Dosagem de citocinas

Para a quantificação das citocinas interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), Interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 12 (IL-12) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) foi utilizada a técnica de CBA (Citometria de esferas ordenadas). Todos os reagentes utilizados foram provenientes do “Mouse inflammatory cytokine Kit” obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

As citocinas foram dosadas no soro dos animais com lesão e tratados com FAo, CL ou DexP. O ensaio consistiu resumidamente em: adicionar a placas de 96 poços, fundo U, 25 μ L por poço da amostra padrão fornecida pelo fabricante e dos soros a serem testados. Em seguida cada um dos poços recebeu 25 μ L das esferas de captura e 25 μ L de anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE). Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente, por 3 horas, protegidos da luz. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 300 μ L de solução tampão e as placas foram centrifugadas a 1500 RPM, por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150 μ L de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os valores expressos em pg/mL para cada uma das citocinas avaliadas.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software GraphPadPrism 7.0. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo e comparadas por ANOVA Two-way, sendo o nível de significância, considerado quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Desenvolvimento das Formulações

Durante o desenvolvimento das formulações farmacêuticas ocorreram incompatibilidades físico-químicas, entre as formas gel e creme tipo Polawax, com o extrato das flores de *A. occidentale* L, causando a separação das fases da emulsão e perda da viscosidade do gel. A emulsão do tipo Lanette® manteve-se estável, conforme mostra a figura 1.

A formulação base do tipo Lanette (LC) e a formulação com extrato bruto das flores de *A. occidentale* (FAo), por se manterem estáveis, não apresentando alteração das suas características organolépticas, separação de fases, perda de viscosidade ou de qualquer uma das suas características ideais, foram escolhidas para continuidade do estudo de estabilidade, em diferentes condições de temperatura e, também, para o ensaio biológico de cicatrização.

Análise do pH

O pH do extrato bruto das flores de *A. occidentale* apresentou valor ácido com pH = 2,67. Enquanto isto, as formulações FAo e CL apresentaram pH variável

ao longo dos diferentes períodos de análise, conforme pode ser observado na figura 2.

Durante o período de avaliação, houve a redução do pH em todas as amostras analisadas, sendo que FAo na temperatura de 45º (Figura 2) apresentou o menor valor ao final do estudo.

Viscosidade

Durante o estudo foram observados aumento da viscosidade das amostras em relação aos valores iniciais, sendo que a FAo, na temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentou menor alteração em relação às demais formulações, ao longo do estudo (Figura 3).

Espalhabilidade

A Figura 4 mostra que a formulação FAo, na temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentou, na maior parte do estudo, melhores valores de espalhabilidade com maior coeficiente de espalhamento.

Avaliação macroscópica do processo de cicatrização

Nos animais do grupo FAo ocorreu redução da lesão no 3º dia de avaliação, quando comparado aos grupos DexP e CL. As medidas no 7º dia mostraram que no grupo FAo o tamanho da lesão permaneceu semelhante ao 3º dia, portanto maior do que os grupos DexP e Controle (CL). Ao final do tratamento (14º Dia), foi o Grupo FAo apresentou a maior diminuição da lesão, tanto em relação ao grupo CL, quanto em relação ao grupo DexP.

Imediatamente após a indução da lesão houve pequena quantidade de sangramento em 100% dos animais, conforme esperado, devido à grande vascularização da região onde foi feita a lesão. As lesões dos três grupos apresentaram uniformidade inicial quanto ao tamanho, sem sinais de inflamação e hiperemia.

No 3º dia de tratamento não foi observado necrose, epitelização, sangramento ou hiperemia, nem crescimento de pelos ao redor da lesão em nenhum dos grupos. Porém, 93% dos animais do grupo DexP e 67% do grupo FAo apresentaram tumefação, ao passo que no grupo controle esse parâmetro foi observado somente em 47% dos animais. Em contrapartida, 100% dos animais tratados com FAo, apresentaram crosta (Tabela 2 e Figuras 5A, 5B e 5C).

No 7º dia de tratamento foi observado crescimento dos pelos ao redor da lesão, em 80% do grupo CL e em 100% do DexP, bem como formação de crosta e hiperemia em todos os grupos. Todos os animais do grupo FAo apresentaram tumefação (Figuras 5D, 5E e 5F).

Finalmente, no 14º dia os animais do Grupo FAo ainda apresentavam crosta, diferentemente dos demais grupos. Com a regressão da lesão foi observado também, em todos os grupos, crescimento de pelos ao redor da lesão e epitelização em todos os animais tratados com FAo e DexP o que não ocorreu no grupo controle negativo, no qual somente 60% dos animais apresentaram essas características (Figura 5G, 5H e 5I).

Análise Histopatológica das lesões

A análise histopatológica foi realizada para avaliação de infiltrado de células mono e polimorfonucleares, edema, angiogênese, presença de fibroblastos, fibras de colágeno, tecido de granulação e epitelização.

A análise histopatológica do 3º dia de tratamento mostrou que o tratamento com FAo resultou em maior recrutamento de células mononucleares quando comparado aos demais grupos (DexP e CL). No grupo DexP foi observado uma maior quantidade de células polimorfonucleares. Tanto no grupo FAo como no DexP o tratamento reduziu o edema e o tecido de granulação só foi fracamente identificado no grupo FAo, nesse intervalo (Tabela 3).

Animais tratados com FAo apresentaram maior extensão de tecido de granulação e maior quantidade de fibras de colágeno no 7º dia de avaliação (Tabela 3), quando comparados aos demais.

Ao final do processo de cicatrização (14º dia), observamos no grupo FAo moderada angiogênese e reepitelização o que não ocorreu nos demais grupos. Foram detectadas também persistência das fibras de colágeno no grupo FAo e aparecimentos dessas fibras no grupo DexP, com intensidades variáveis, como mostra a Tabela 3.

Quantificação das citocinas e quimiocinas séricas

O tratamento com FAo aumentou a produção de IL-6 entre os dias 3 e 7, e reduziu e MCP-1 no 3º dia em comparação ao controle negativo. Nenhuma das outras citocinas foi detectada pelo ensaio no soro dos animais.

Discussão

Nesse estudo foi avaliada a estabilidade de vários produtos obtidos a partir do extrato das flores de *A. occidentale*. A formulação do tipo Lanette acrescida do extrato etanólico das flores de *A. occidentale* na concentração 5% foi (FAo) foi a única que apresentou as melhores e mais estáveis características físico-químicas e organolépticas. Por este motivo foi também a escolhida para avaliação do efeito cicatrizante.

Em nosso estudo foram avaliadas as características de estabilidade ao longo de 90 dias, para diferentes tipos de formulações usando o extrato das flores de *A. occidentale*. A análise da estabilidade dos bioprodutos deve ser realizada na fase inicial de desenvolvimento. Os estudos de estabilidade preliminar são realizados com duração de até 15 dias, enquanto os estudos de estabilidade acelerada possuem duração de 90 dias, podendo se estender por períodos que variam de seis meses a um ano [16]. Estes dados podem determinar o tempo de vida útil e a compatibilidade dos produtos, bem como a melhor forma para o seu acondicionamento.

O extrato apresentou pH ácido justificando a incompatibilidade físico-química observada na elaboração do creme tipo Polawax e gel hidrofílico, considerando que os valores de pH podem acelerar ou causar instabilidade nas formulações, o que efetivamente não ocorreu com a formulação FAo.

Para ser considerado como adequado, o pH de uma formulação deve garantir a estabilidade de seus componentes, bem como manter a eficácia e segurança do produto, sendo compatível com os fluidos biológicos presentes na via de administração pretendida [19]. A emulsão FAo apresentou aspecto estável e características adequadas, mesmo quando acrescida do extrato de *A. occidentale*, revertendo a acidez detectada no extrato, possivelmente devido à presença agentes

com ação tampão que mantiveram o pH da formulação estável, mesmo na temperatura ambiente.

Substâncias com valores de pH demasiadamente baixos ou altos são inadequadas para aplicação na pele, que possui pH entre 5,0 e 6,0, em condições fisiológicas. Assim, é necessário garantir que o pH da formulação permaneça na faixa mais aproximada do pH da superfície da pele [20], conforme ocorreu com a preparação FAo, que ao ser incorporado ao creme lanete atingiu o pH na faixa ideal para aplicação tópica em humanos. Resultados semelhantes foram obtidos com outras formulações utilizando espécies vegetais, quanto a pouca variação de pH, na temperatura ambiente, justificando a crescente utilização destas matérias em formulações para uso em lesões da pele [21] e indicando que a formulação aqui utilizada preencheu os requisitos necessários quanto ao pH para utilização clínica.

Ao longo do estudo, as preparações com creme Lanette em presença do extrato (FAo) ou não (LC) apresentaram maiores alterações de pH quando submetidas à temperatura de estufa. Este efeito pode ter sido acelerado pelo aquecimento, em função do tempo de exposição. Em conjunto, os dados indicam que há instabilidade dessa preparação em elevadas temperaturas ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), sugerindo que poderá ocorrer oxidação do produto na fase oleosa da emulsão, com formação de hidroperóxidos ou mesmo a hidrólise de triglicerídeos, levando à formação de ácidos graxos[22].

Os valores de viscosidade do creme das flores de *A. occidentale* (FAo) não foram diferentes do creme lanette sozinho (CL), em todas as temperaturas testadas, o que pode representar uma vantagem para esse produto, indicando menor perda dos componentes hidrofílicos, em relação às demais formulações. Adicionalmente, não ocorreram formações de estruturas cristalinas, nem aumento da viscosidade nas

amostras mantidas nas temperaturas de refrigerador, mesmo sendo esta uma característica comum a vários tipos de creme quando submetidos às baixas temperaturas[23].

Os valores de espalhabilidade para FAo apresentaram, na maior parte do estudo, melhores valores do que a formulação LC. O grau de espalhabilidade das formulações está relacionado à força necessária para aplicar o produto na pele, até que ocorra a total penetração e serve para caracterizar positivamente o produto.

A formulação FAo apresentou menor viscosidade e maior fluidez e conseqüentemente, maior coeficiente de espalhamento. As pequenas variações de espalhabilidade podem ser justificadas pela característica ácida do extrato, o que resultou em vantagem para a formulação FAo, já que implicou na maior facilidade de aplicação, sem descaracterizá-la. Resultados de espalhabilidade relevantes e adequados à aplicação na pele também foram identificados em outros cremes à base de espécie vegetais, validando a utilização de extratos vegetais na formulação de bioprodutos para uso tópico na pele, como demonstrado por Di Mambro e Fonseca (2005) [24] e Silva, et al (2013)[25].

Como a avaliação das características físico-químicas não alteraram a estabilidade do bioproduto gerado, investigamos a utilização desta formulação quanto ao seu efeito na cicatrização. Agentes que contribuem para melhorar a cicatrização tem sido amplamente estudados, porém até o presente momento não há relatos da utilização de nenhum bioproduto contendo extrato obtido a partir das flores *Anacardium occidentale*.

A formulação FAo apresentou importante efeito na cicatrização de feridas induzidas na pele de camundongos, com eficácia semelhante a observada no controle positivo DexPantenol. A ação da formulação FAo na cicatrização está

possivelmente associada ao aumento na produção de IL-6, também observada no grupo DexP, nos intervalos de 3 e 7 dias após a indução da lesão

No 7º dia observamos o aumento da lesão no grupo FAo, efeito que pode estar relacionado a atividade pró-inflamatória da IL-6. Considerando as propriedades dessa citocina é razoável supor que o aumento de IL-6 resultou em maior recrutamento de células para o local. Células polimorfonucleares ativadas, por exemplo, liberam vários fatores de crescimento e citocinas, incluindo a IL-6 que amplifica a resposta inflamatória e auxilia na fase proliferativa do processo de cicatrização. Além disto, a IL-6 quando liberada por macrófagos, estimula as células polimorfonucleares a fagocitarem fragmentos de tecido em degradação, favorecem a regeneração do tecido e atuam na angiogênese e na fibroplasia. Em humanos, a produção de IL-6 por fibroblastos diminui com a idade, o que acaba por se refletir em dificuldade e/ou retardo do processo de cicatrização em idosos [26].

Importante notar que, embora o aumento de IL-6 não tenha sido observado no 14º dia, os efeitos do aumento ocorrido no 3º e no 7º dia, foram suficientes para manter crescente o infiltrado inflamatório mononuclear, detectado no grupo FAo, ao longo do processo de cicatrização.

Com base nos resultados obtidos é razoável propor que o tratamento com FAO estimula o aumento de IL-6 e o processo de cicatrização, tendo em vista a importância dessa citocina na regulação e produção de mediadores da inflamação, fatores de crescimento e diferenciação celular, o que resultou em um processo de re-epitelização mais rápido e mais intenso no grupo FAo em relação ao grupo controle, no 14º dia.

Componentes químicos como flavonóides e taninos são conhecidos por promover a cicatrização de feridas, especialmente quando utilizados topicamente

[27, 28]. No extrato bruto das flores de *A. occidentale* também foram encontrados compostos desta classe. Segundo Silva et al (2016) o extrato das flores apresenta além destas substâncias, potente efeito microbicida, o que também pode estar relacionado a efetividade do produto aqui avaliado, considerando que produtos com ação cicatrizante que também apresentem ação antimicrobiana são sempre mais vantajosos no mercado[6].

Bueno e colaboradores (2014) [29] estudando a atividade cicatrizante de taninos hidrolisáveis direcionada à proliferação de queratinócitos e fibroblastos também identificaram a presença de ácido gálico e ácido elágico, entre outros compostos, nos extratos de *Poincianella pluviosa*. Como o extrato vegetal de *A. occidentale*, utilizado para síntese de FAo, também apresenta estas substâncias [6], pode-se inferir que a atividade biológica descrita pode estar relacionada à presença desses compostos, o que lança novas perspectivas para o estudo desses compostos no processo cicatricial.

Conclusões

Neste trabalho foi demonstrado que a formulação FAo apresentou maior estabilidade, especialmente na temperatura ambiente. Além disto, foi observado relevante atividade cicatrizante da formulação FAo, sendo inclusive equiparada ao grupo tratado com DexPantenol, agente cicatricial amplamente utilizado na clínica médica. Com base nos resultados obtidos concluímos que a atividade cicatrizante de FAo, está relacionada ao seu potencial imunomodulador que resultou no aumento de IL-6, proporcionando aceleração da reepitelização, possivelmente por promover ativação celular no local da ferida. A efetividade da preparação contendo o extrato

das flores de *A. occidentale* na atividade cicatrizante mostrou-se promissora, abrindo novas perspectivas para utilização dessa preparação em outros modelos de lesão.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de produtividade a RNMG. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado LACS.

Referências

1. Chaves MH, Maria A, Citó L, Arimatéia J, Lopes D, Albuquerque D, Oliveira CAA De, Flávia A, Júnior EMB: Fenóis totais , atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L. Anacardiaceae. Rev. bras. farmacogn.2010, 20(November 2008):106–112.
2. Pinheiro CUB., Araújo NA., Arouche GC: *Plantas Úteis Do Maranhão (baixada Maranhense)*. EDUFMA/FAP. São Luis; 2010. 262p.
3. Tedong L. Dimo T., Dzeufiet P. D. D., Asongalem A. E., Sokeng D. S., Callard P., Flejou J.F. and Kamtchouing P. (2006). Antihyperglycemic and renal protective activities of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) leaves in streptozotocin induced diabetic rats. Afr. J. Trad. CAM 3 (1): 23 – 35.
4. Guerra RNM, Silva TA: Processo para obtenção de Flores de *Anacardium occidentale* L. (Cajueiro), Extrato hidroalcoólico, Liofilizado, Seco por Atomização, Chá, suas composições farmacêuticas e uso terapêutico. 2010:8 PI 0903172-3 A2.
5. Akinpelu DA: Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia 2001, 72:286–287.

6. Guerra RNM, Silva RA, Neto VMN: Composições Farmacêuticas e odontológicas à base de flores ou extrato de partes aéreas de *Anacardium occidentale* e uso dessas composições. 2012:6. PI 1002268-6 A2.
7. Kongkachuichai R, Charoensiri R, Yakoh K, Kringkasemsee A, Insung P: Nutrients value and antioxidant content of indigenous vegetables from Southern Thailand. *Food Chem* 2015, 173:838–46.
8. Santos GHF, Silva EB, Silva BL, Sena KXFR, Lima CS a.: Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, rich in tannins. *Braz J Farmacogn* 2011, 21:444–449.
9. Fournet A, Ferreira ME, Arias AR de, Ortiz ST de, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R, Schinini A, Hocquemiller R: In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1996, 40(11):2447–2451.
10. Abulude FO, Ogunkoya MO, Adebote VT: Phytochemical and antibacterial investigations of crude extracts of leaves and stem barks of *Anacardium occidentale*. *Cont J Biol Sci* 2009, 2:12–16.
11. Vanderlinde FA, Landim HF, Costa EA, Moreira P, Aparecida M, Maciel M, Conceição G, Carmo D, Côrtes S, Fagundes F: Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. *Braz J Pharm Sci* 2009, 45(3):437-442.
12. Luiz-Ferreira A, Almeida ACA De, Cola M, Barbastefano V, Almeida ABA De, Batista LM, Farias-Silva E, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Santos LC, Vilegas W, Brito ARMS: Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Molecules* 2010, 15:7153–66.
13. Broughton G, Janis JE, Attinger CE: Wound Healing: An Overview. *Plast Reconstr Surg* 2006, 117:1–32.
14. Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, Neal JMO, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B: Plants and human health in the twenty-first century. *nome da revista* 2002, 20:522–531.

15. Casteli VC, Mendonça CC, Silva ICL Da, Rodrigues KA, Campos MAL De, Machado SRP: Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. *Acta Sci Heal Sci* 2008, 30:121–128.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA: Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 2004:52. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acesso em 10 de Janeiro de 2016.
17. Terra RS, Minin MM, Chorilli M: físico-química de formulação anticelulítica acrescida. *Rev Bras Farm* 2009, 90:303–308.
18. Borghetti GS, Knorst MT: Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O / A contendo filtros solares. *Basic Applied Pharm Sci* 2006, 42:531–537.
19. Frange RCC, Garcia MTJ: Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. *J Basic Applied Pharm Sci* 2010:263–271.
20. Yorgancioglu A, Bayramoglu EE: Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. *Ind Crops Prod* 2013, 44:378–382.
21. Sousa VB, Ferreira JRN: Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva. *J Basic Applied Pharm Sci* 2010, 31:217–222.
22. Masmoudi H, Dréau Y Le, Piccerelle P, Kister J: The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm* 2005, 289:117–131.
23. Milan ALK, Milão D, Souto AA, Corte TWF: Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia *Basic Applied Pharm Sci*. 2007, 43:649–657.
24. Di Mambro VM, Fonseca MJ V: Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 37:287–295.

25. Silva S, Valarini M, Chorilli M, Venturini A, Leonardi G: Atividade Antioxidante do Extrato Seco de Cacau Orgânico (*Theobroma cacao*) - Estudo de Estabilidade e Teste de Aceitação de Cremes Acrescidos Deste Extrato. *Basic Applied Pharm Sci* 2013, 34:493–501.
26. Eming SA, Brachvogel B, Odoriio T, Koch M: Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*. 2007, 42:115–170.
27. Hironori Tsuchia, Masaru Sato TM: Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 1996, 50:27–34.
28. Rane MM, Mengi SA: Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark on incision and excision wounds in rats. *Fitoterapia* 2003, 74:553–558.
29. Bueno FG, Panizzon GP, Mello EVSDL, Lechtenberg M, Petereit F, Mello JCP De, Hensel A: Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* 2014, 99:252–260.

Tabela 1 - Matérias-primas empregadas para o desenvolvimento das formulações

Formulação	Fases	Matéria-prima	Quantidade (%)	Função
Emulsão	Oleosa	Cera auto-emulsificante	9,0 ^a ou 12,0 ^b	Agente emulsionante
		Vaselina	5,0	Emoliente
		Propilparabeno	0,05	Conservante
		Miristrato de isopropila	2,0	Emoliente
	Aquosa	Glicerina	5,0	Umectante
		Metilparabeno	0,18	Conservante
		Silicone	2,0	Emoliente
		Água destilada q.s.p	100,0	Veículo
Gel	Ativo	0,025	Princípio ativo	
	Carbopol®	0,5	Agente geleificante	
	AMP 95	q.s	Alcalinizante	
	Glicerina	2	Umectante	
	Água destilada q.s.p	100	Veículo	

a – Lanette N[®]b – Polawax[®]Tabela 2: Avaliação macroscópica das lesões dos camundongos Swiss que receberam tratamento tópico durante 15 dias, com os cremes associados ao extrato de *A. occidentale* (FAo) , dexpanthenol (DexP) ou Lanette (CL) após 3, 7 e 14 dias da indução da lesão.

	3° Dia			7° Dia			14° Dia		
	CL	DexP	FAo	CL	DexP	FAo	CL	DexP	FAo
Hiperemia ao redor	0/15	0/15	2/15	8/10	8/10	10/10	0/5	0/5	0/5
Sangramento	0/15	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5
Crosta	1/15	3/15	15/15	10/10	10/10	10/10	0/5	0/5	5/5
Tumefação	7/15	14/15	10/15	0/10	1/10	10/10	0/5	0/5	0/5
Crescimento de pelos ao redor da lesão	0/15	0/15	0/15	8/10	10/10	0/10	5/5	5/5	4/5
Epitelização	0/15	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	3/5	5/5	5/5
Necrose	0/15	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5

Tabela 3: Avaliação histopatológica de lesões de camundongos Swiss que receberam tratamento tópico durante 14 dias com os cremes CL, DexP e FAo. Os grupos foram avaliados nos dias 3, 7 e 14. Os valores expressam a mediana±máx/min de 5 animais por grupo, respectivamente.

Parametros Analisados	Dia 3			Dia 7			Dia 14		
	CL	DexP	FAo	CL	DexP	FAo	CL	DexP	FAo
Infiltrado Inflamatório									
<i>Mononucleares</i>	1,0 (1-1)	1,0 (0-1)	2,0 (2-2) *#	3,0 (3-3)	3,0 (3-3)	2,5 (2-3)	3,0 (3-3)	1,0 (0-3)	3,0 (2-3)
<i>Polimorfonucleares</i>	1,0 (1-1)	2,0 (2-2) *	1,0 (1-1)#	0,0 (0-1)	1,0 (1-1)	0,0 (0-0)#	1,0 (0-2)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
Edema	3,0 (0-3)	1,5 (0-2)	0,0 (0-2) *	0,0 (0-0)	1,0 (0-1)	1,0 (0-2)	0,5 (0-2)	0,0 (0-0)	0,0 (0-1)
Angiogenese	0,0 (0-1)	1,0 (1-2) *	1,0 (1-2) *	1,0 (0-0)	2,0 (2-2) *	1,0 (1-2)	0,0 (0-1)	0,0 (0-0)	2,0 (2-2) *#
Fibroblastos	0,0 (0-0)	0,0 (0-1)	0,0 (0-0)	3,0 (2-3)	3,0 (3-3)	2,0 (2-2)#	3,0 (2-3)	2,5 (2-3)	3,0 (3-3)
Repitelização	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	1,0 (1-1)	0,0 (0-0)#	0,0 (0-0)	3,0 (3-3) *	1,5 (0-2) *
Tecido de Granulação	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	1,0 (0-1) *#	1,0 (0-1)	0,0 (0-0)	2,0 (1-2)#	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
Fibras de Colágenos	0,0 (0-0)	0,5 (0-2)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	1,0 (0-1)	1,0 (1-1)	2,0 (2-2) *	1,0 (1-1)#

(*)p ≤ 0,05 quando comparado ao grupo controle negativo (CL) no mesmo dia.

(#) p ≤ 0,05 quando comparado ao grupo positivo (DexP).

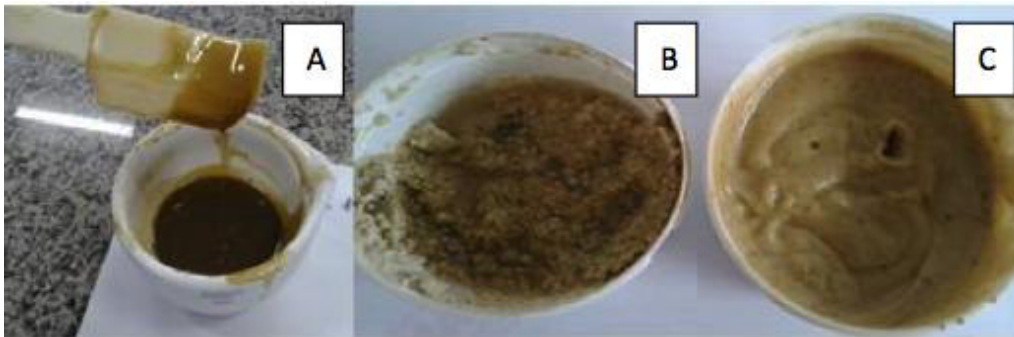


Figura 1 – Aspecto das formulações com adição de extrato. A: Gel Carbopol[®]. B: Creme do tipo Polawax. C: Creme Lanette.

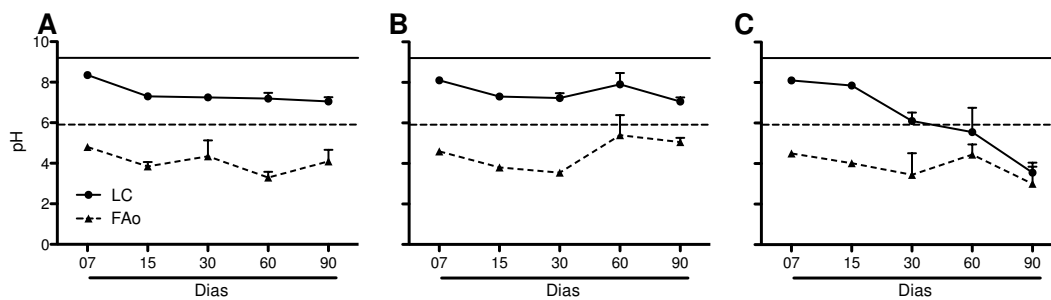


Figura 2 - Determinação de pH das amostras analisadas durante 90 dias. O pH das formulações foi avaliado ao longo de 90 dias de estudo de estabilidade nas temperaturas ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (A), de refrigerador ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) (B) e de estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$) (C).

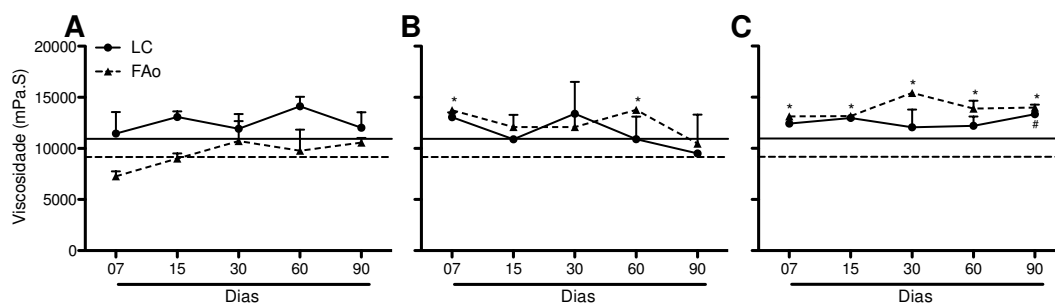


Figura 3 - Determinação da Viscosidade (mPa.S) das amostras analisadas durante 90 dias. A viscosidade das formulações foi avaliada ao longo de 90 dias de estudo de estabilidade nas temperaturas ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (A), de refrigerador ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) (B) e de estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$) (C).

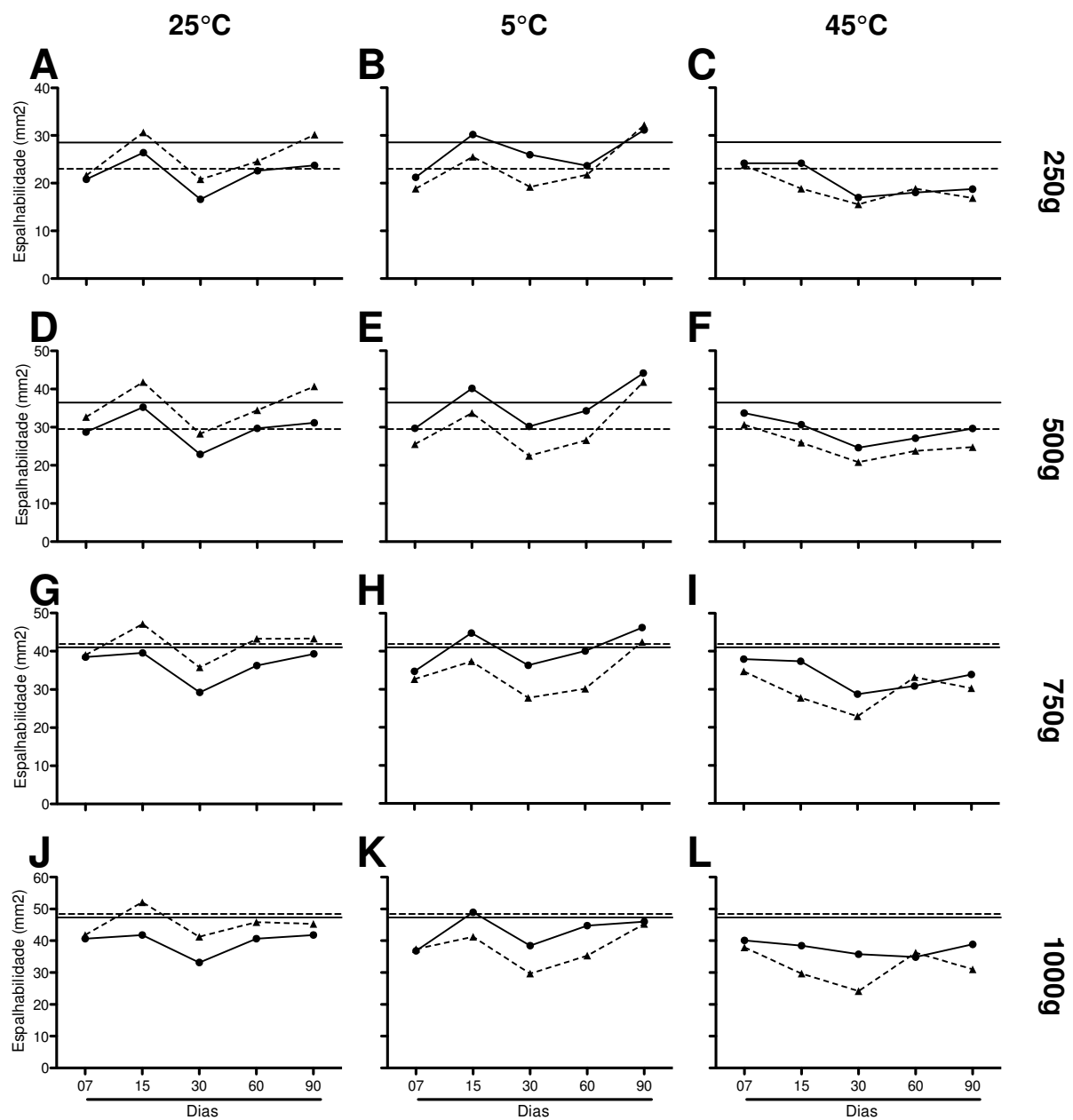


Figura 4 - Determinação da espalhabilidade (mm^2) das amostras analisadas no período de 90 dias. A espalhabilidade das formulações foi avaliada ao longo de 90 dias de estudo de estabilidade nas temperaturas ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (A), de refrigerador ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) (B) e de estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$) (C).

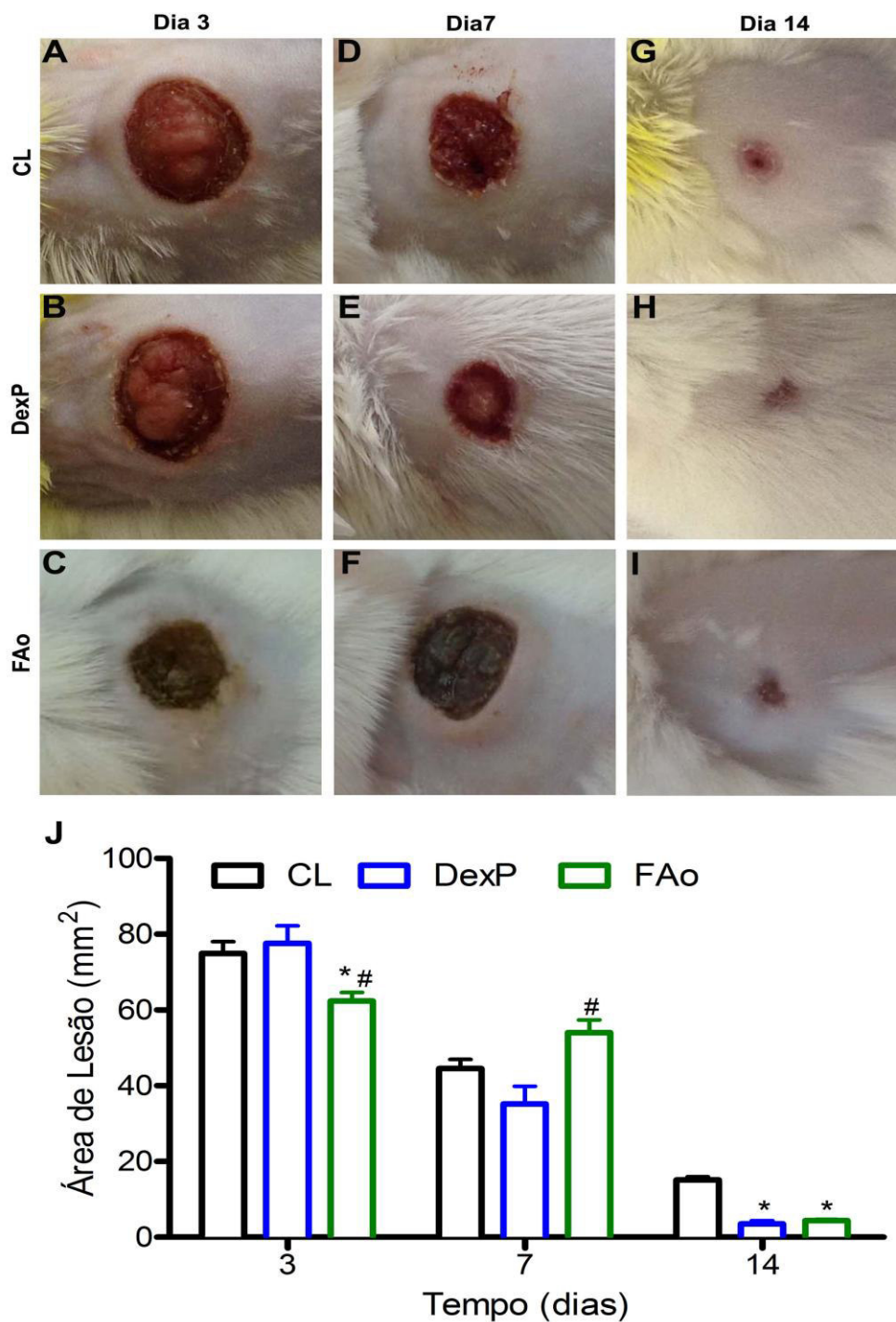


Figura 5: Área da Lesão dos grupos tratados com CL (A, D e G), DexP (B, E, H) e FAo (C, F, I), ao longo de 14 dias de tratamento. A área a lesão foi medida (J) logo após a indução da lesão e no 3º, 7º e 14º dia subsequente. Os valores expressam a média \pm DP de 15, 10 e 5 animais por grupo, respectivamente. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo (CL) no mesmo dia. (#) $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo (DexP).

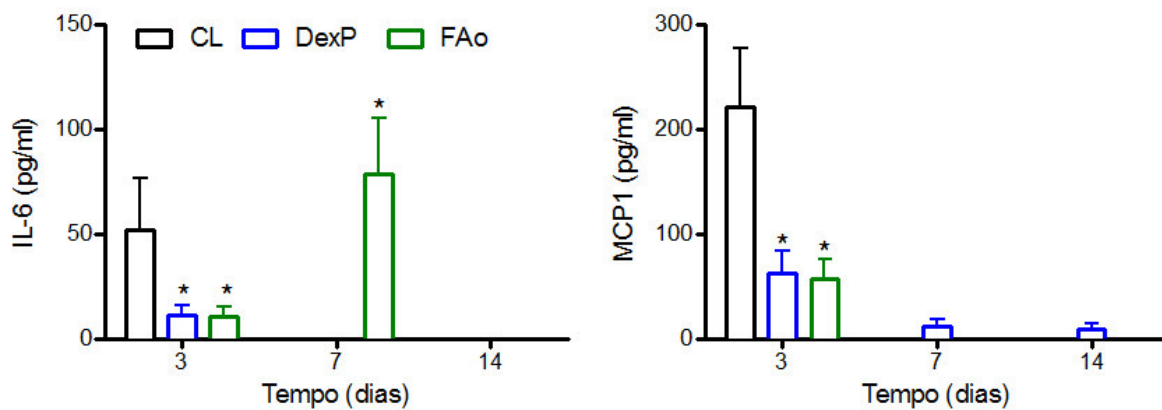


Figura 6: Dosagem de citocinas IL-6 e MCP-1 dos grupos tratados com CL, DexP e FAo ao longo de 14 dias de tratamento. A quantificação foi realizada no soro dos animais após a eutanásia no 3º, 7º e 14º dia subsequente. Os valores expressam a média \pm DP de 5 animais por grupo, respectivamente. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo (CL) no mesmo dia.

5. CAPÍTULO II

AÇÃO LEISHMANICIDA DO TRATAMENTO INTRALESIONAL COM EXTRATO DAS FLORES DE *Anacardium occidentale* L.

Artigo à ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Lucy A. C. Silva e Rosane N. M. Guerra

**AÇÃO LEISHMANICIDA DO TRATAMENTO INTRALESIONAL COM
EXTRATO DAS FLORES DE *Anacardium occidentale***

Lucy A.C. Silva^a, Rosane N. M. Guerra^a

^a*Laboratório de Imunofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

Autor para correspondência: Rosane Nassar Meireles Guerra

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A,
Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Cidade
Universitária Dom Delgado, CEP: 65085-580 São Luís, Maranhão – Brasil.

Telefone: +55-98-3272-8548

*E-mail: rnmguerra@pq.cnpq.br

Resumo

A leishmaniose constitui um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Diversas espécies vegetais são utilizadas empiricamente para o tratamento desta doença, entre elas, *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial leishmanicida do extrato etanólico das flores de *A. occidentale* (EAo) e substâncias isoladas bem como de formulação tipo Lanette contendo *A. occidentale*. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* do extrato etanólico de *A. occidentale* (EAo) sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A efetividade sobre formas amastigotas foi avaliada em culturas de macrófagos RAW infectados por *L. amazonensis*, *in vitro*. Posteriormente, foram realizados ensaios *in vivo* utilizando camundongos Balb/c, infectados no coxim plantar com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Quatro semanas depois da infecção, as patas foram tratadas por via intralesional com extrato ou por via tópica com a formulação. O tratamento intralesional ocorreu com 4 aplicações de EAo, em intervalos 3 dias, nas doses de 5 mg/Kg ou com formulação contendo *A. occidentale* 5% (FAo). O EAo apresentou atividade citotóxica sobre as formas promastigotas com IC₅₀ 26,9µg/mL. O tratamento com EAo reduziu o número de parasitos por 100 macrófagos, de forma semelhante a ação da anfotericina B (Controle= 733 ± 34 ; Amb= 178 ± 63 ; EAo25= 339 ± 62 ; EAo50= 458 ± 141 e EAo100= 251 ± 151). A carga parasitária foi sempre menor nos animais tratados com o EAo, tanto no baço como nos linfonodos proximais. Por outro lado, FAo não apresentou efeito leishmanicida. O tratamento intralesional com EAo, mas não com FAo, foi eficaz em reduzir a carga parasitária local e sistêmica, frequentemente associadas a um melhor prognóstico da infecção por *L. amazonensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar, *L. amazonensis*, Cajueiro, *Anacardium occidentale*.

Abstract

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoa of the *Leishmania* genus, which affects millions of people worldwide. Several species are used empirically to treat this disease, including, *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae). The objective of this study was to investigate the potential anti-leishmania of *A. occidentale* ethanol extract flowers (EAO) and isolated substances and formulation type Lanette containing *A. occidentale*. We assessed the *in vitro* cytotoxicity of the ethanol extract of *A. occidentale* (EAO) on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. The effectiveness of amastigotes was evaluated in RAW infected macrophage cultures. Later, *in vivo* assays were performed using BALB/c mice infected in the footpad with 10^5 promastigotes of *L. amazonensis*. Four weeks after infection, the treated paws were Intralesional or topically using 4 doses at intervals of 3 days at the 5mg/kg concentrations (EAO) or formulation containing *A. occidentale* (FAO), daily. EAO showed cytotoxic activity on promastigotes with IC_{50} 26,9 μ g / mL. The treatment with EAO reduced the number of parasites per 100 macrophages, similarly to the action of amphotericin B (control = 733 ± 34 ; Amb = 178 ± 63 ; EAO25 = 339 ± 62 ; EAO50 = 458 ± 141 and EAO100 = 251 ± 151). The parasite load was always lower in the animals treated with the EAO, both in spleen and in the proximal lymph nodes. On the other hand, FAO showed no leishmanicidal effect. Intralesional treatment with EAO, but not FAO, was effective in reducing local and systemic parasite load, often associated with a better prognosis of infection by *L. amazonensis*.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *L. amazonensis*, Cashew tree, *Anacardium occidentale*.

1 Introdução

A leishmaniose é uma doença de amplo espectro clínico e um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade, sendo endêmica em 98 países e territórios e acometendo cerca de 14 milhões de indivíduos em todo o mundo (Who, 2015). Esta infecção é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos pela fêmea de flebotomídeos durante o repasto sanguíneo (Sacks and Kamhawi, 2001). As formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro e rapidamente são internalizadas por células mononucleares fagocíticas, onde se diferenciam nas formas amastigotas (Kaye and Scott, 2011). Fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto à espécie do parasita determinam os diversos aspectos clínicos da doença, apresentando desde alterações cutâneas e mucocutâneas (Leishmaniose Tegumentar), a graves alterações viscerais e sistêmicas (Leishmaniose Visceral) (Nozzi et al., 2014).

Introduzidos na terapêutica da leishmaniose há mais de 70 anos, os antimoniais pentavalentes ainda são a primeira escolha no tratamento desta doença (Croft & Yardley, 2002; Torres et al., 2010). Entretanto, a elevada toxicidade, principalmente hepática e cardíaca, diminuição da eficácia ao longo dos anos, devido à resistência de algumas espécies de parasito (Tuon et al., 2008), e o grande desconforto durante a administração, diária e exclusivamente por via parenteral, do fármaco, têm contribuído para falhas no tratamento (Monge-Maillo & López-Vélez, 2013). Fármacos de segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina, também possuem os inconvenientes

semelhantes. Diante desse cenário torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos e formulações menos invasivas para o tratamento da leishmaniose. Nessa perspectiva, o estudo de plantas medicinais como potenciais fontes de novas drogas leishmanicidas, tem se mostrado muito promissor (Sen and Chatterjee, 2011), até porque podem aumentar a adesão ao tratamento.

O uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica para o tratamento de leishmaniose é bastante comum em áreas endêmicas. Em um levantamento etnobotânico realizado no nordeste brasileiro, foram identificadas quarenta e nove espécies vegetais usadas para o tratamento tópico de ulcerações de pele causadas por espécies do gênero *Leishmania*. Reportada por 65% dos entrevistados, a espécie *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) foi a mais citada no inquérito realizado (França et al., 1996).

A espécie *A. occidentale* L., conhecida popularmente no Brasil como cajueiro é uma árvore com ampla dispersão na faixa litorânea de regiões tropicais e subtropicais do país, possuindo relevante papel biológico, econômico e social, além de suas propriedades medicinais. É comum o uso tradicional de folhas, casca e frutos desta espécie vegetal como antimicrobiano, cicatrizante, no tratamento de doenças gastrintestinais, inflamatórias e como agente leishmanicida (França et al., 1996; Lorenzi and Matos, 2002; Pio Corrêa, 1984; Ribeiro et al., 2014). As flores possuem propriedades tônicas e afrodisíacas e as raízes são purgativas (Pio Corrêa, 1984).

Estudo preliminar mostrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. occidentale* inibe o crescimento das formas amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Luize et al., 2005), apesar de não ter sido mostrado sua atividade

in vivo. Além disso, recentemente, nosso grupo mostrou que o extrato etanólico das flores de *A. occidentale* apresenta importante atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* e sobre a levedura *Candida albicans* (Guerra et al., 2012; Silva et al 2016).

Considerando as relevantes propriedades biológicas, bem como a importância de investigar novas formas de tratamento para a leishmaniose, nesse trabalho foi analisada a atividade antileishmania do extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale* (EAo) e de uma formulação obtida a partir do extrato (FAo), bem como de substâncias isoladas presentes no extrato.

2 Material e Métodos

2.1 Preparação do extrato vegetal e formulação para uso tópico

Flores de *A. occidentale* (Anacardiaceae) foram coletadas na Cidade Universitária Dom Delgado, da Universidade Federal do Maranhão (São Luis, MA, Brasil), entre agosto e setembro de 2013, sempre pela manhã. Os exemplares foram identificados no Herbário Ático Seabra da mesma universidade (voucher espécime nº 1050).

Para preparação dos extratos, as flores foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por 24 horas, seguida de secagem em estufa a 37 °C durante sete dias. O material seco foi triturado em moinho elétrico (TENAL TE 340) e extraído por maceração em etanol absoluto P.A. (MERCK), repetindo o processo a cada semana, por 3 semanas segundo Melo et al., (2006). O extrato resultante foi concentrado sob pressão reduzida,

liofilizado e estocado em frascos estéreis a 4 °C, até a realização dos ensaios ou utilização para produção das formulações. O extrato das flores de *A. occidentale* (EAo) apresentou rendimento médio de 15%.

Para obtenção da formulação, inicialmente foi preparada uma emulsão segundo método tradicional de inversão de fases (ANSEL, 2000). Posteriormente, o extrato liofilizado das flores de *A. occidentale* foi incorporado à formulação, na proporção de 5%, sendo denominado FAo. Todo o procedimento ocorreu à temperatura ambiente. Para a preparação foi utilizada a cera auto-emulsificante Lanette N® na concentração de 9%.

2.2 Parasitos

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/1987/BA-125) foram mantidas por passagens sucessivas em camundongos Balb/c, para manutenção da virulência. Antes da utilização em experimentos, os parasitos foram isolados dos linfonodos poplíteos dos animais infectados e mantidos, em culturas axênicas, por até sete passagens, em meio de cultura Schneider (SIGMA, ChemicalCo, ST Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e gentamicina (50µg/mL) (SIGMA, St. Louis, MO, EUA). O cultivo axênico foi realizado em estufa BOD a 24° C. O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente e a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Somente formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária foram utilizadas para os ensaios.

2.3 Camundongos

Foram utilizados camundongos Balb/c machos, com 8 a 12 semanas de idade. A utilização dos animais obedeceu aos princípios técnicos e éticos preconizados pelo Conselho Nacional para Controle de Experimentação em Animais (CONCEA) e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso dos Animais da UFMA com protocolo de 23115.003585/2015-12.

2.4 Atividade anti-promastigota in vitro

Para os ensaios foi adicionado meio Schneider em placas de 96 poços de fundo chato contendo ou não EAo e substâncias isoladas (ácidos gálico, anacárdico e chiquímico) em concentrações seriadas de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Em cada poço foram adicionados 5×10^6 /mL promastigotas de *L. amazonensis*. Após 24h de incubação, a 26°C, em estufa BOD, foram determinados os números de promastigotas viáveis, levando-se em consideração a mobilidade flagelar, em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio ótico de luz comum. Foi então calculado o percentual de inibição do crescimento das promastigotas tomando-se como referência o número de promastigotas viáveis nos poços sem extrato (Bezerra et al., 2006) para posterior cálculo das concentrações que inibiram 50% (CI50) e 100% (CIM) do crescimento celular (Bezerra et al., 2006; Monzote et al., 2007), obtidas pela curva dose-resposta, a partir da equação do modelo sigmoidal (Bodley et al., 1995). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 Efeito do extrato de A. occidentale na infecção in vitro e sobre formas amastigotas

Células Raw 264.7 (5×10^5 /mL), linhagem celular de macrófagos murinos, foram transferidas para placas com 24 poços e incubadas 3h, a 37°C, em presença de CO₂ (5%). Em seguida, os poços foram lavados três vezes com meio RPMI para retirada das células não aderentes. Macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigostas de *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitos por macrófago (5:1) e incubados durante 4 horas, a 37° C em presença de 5% de CO₂. Após a lavagem dos poços para retiradas das promastigotas que não foram internalizadas, os macrófagos infectados foram tratados ou não com EAo nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL. Anfotericina B (1 µg/mL), foi utilizada como droga controle. Depois de 24h do tratamento, todas as células foram fixadas com metanol absoluto e coradas por hematoxilina e eosina (H&E). Os índices de infecção foram determinados com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

As lâminas foram randomizadas e a contagem realizada por teste duplo cego, analisando-se 100 células/lamínula, aumento de 1000 vezes (González et al., 2005). Os sobrenadantes foram armazenados a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.6 Atividade leishmanicida in vivo.

Camundongos Balb/c (n=30) foram infectados no coxim plantar com promastigotas de *L. amazonensis* (10^5 em 25µL), na fase estacionária. Quatro semanas após a infecção, o tamanho das patas foi auferido com auxílio de paquímetro digital e os animais distribuídos em três grupos. O tratamento intralesional foi iniciado no 31º dia pós-infecção como descrito anteriormente com adaptações (Patrício et al., 2008). As patas infectadas receberam quatro

administrações de 25µL de PBS (Grupo Controle) ou extrato *de A. occidentale* na dose de 5,g/Kg (Grupo EAo), com um intervalo de três dias entre as administrações. O antimoniato de meglumina (28mg/Kg/dia) (Grupo Glucantime) foi administrado por via intraperitoneal, no grupo controle positivo.

Para o tratamento tópico com a formulação (FAo 5%) 100uL do produto foram aplicados na lesão diariamente, após limpeza da área com salina 0,9% estéril. Como tratamento placebo foi utilizado a Creme Lanette (Grupo CL).

Durante os tratamentos, o tamanho das patas infectadas foi avaliado periodicamente usando um paquímetro digital. Três dias após o ultimo tratamento os animais foram mortos para determinação da carga parasitária nos linfonodos adjacentes e no baço e coleta do soro. As células do linfonodo foram colocadas em cultura para dosagem de citocinas.

O ensaio de diluição limitante foi feito como descrito anteriormente (Buffet et al., 1995). As suspensões celulares do baço e do linfonodo foram diluídas seriadamente, em meio Schneider completo e suplementado, em placas de 96 poços e fundo chato. Após sete dias de incubação a 37°C, cada poço da placa foi analisado para detecção e contagem de parasitas, com auxilio de um microscópio invertido e aumento de 320x. Foi considerado como resultado positivo a última diluição contendo pelo menos um protozoário viável.

A carga parasitária foi calculada da seguinte forma:

$$X = \text{Mrd}/\text{pT}$$

Onde Mrd é a média da recíproca da última diluição contendo pelo menos um parasito e pT é o peso total do linfonodo ou do baço.

2.9 Cultura celular

Células obtidas do linfonodo poplíteo drenante ($5 \times 10^6/\text{mL}$) dos camundongos infectados foram ressuspensas em meio RPMI (Gibco) suplementado como descrito acima (item 2.5). Mil microlitros destas suspensões celulares foram adicionadas em cada poço da placa de 24 poços e incubadas por 24h, a 37°C , em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Ao final do período de incubação os sobrenadantes das culturas foram armazenados a -70°C , para posterior dosagem de citocinas. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

2.10 Dosagem de citocinas

As concentrações de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, $\text{TGF-}\beta$ e IL-10 e IL-12 foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, EUA), no soro, sobrenadante de culturas de macrófagos infectados ou de linfonodos poplíteos. Para a dosagem foram utilizados $100\mu\text{L}$ dos sobrenadantes. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Costar, Corning, Lowell, MA, EUA). A conversão dos valores de absorbância em concentração foi feita por regressão linear a partir de curva padrão obtida com concentrações conhecidas de citocinas recombinantes.

2.11 Imunofenotipagem

Células dos linfonodos drenantes ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram isoladas e ressuspensas em solução diluente (NaCl , Na_2S , NaN_3 e H_2O deionizada). As células foram transferidas para uma placa de fundo em U, marcadas com os anticorpos monoclonais específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos ao

abrigo da luz: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD4 conjugado com PE e anti-CD8 conjugado com PerCP. Após incubação, as células foram fixadas com solução diluente acrescida com formaldeído 2%. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur – BD Biosciences) e os dados analisados com o programa FlowJo (TreeStar).

2.1.2 Análise Hematológica

Para determinar os parâmetros hematológicos dos camundongos, 100 µl de sangue foi coletado dos animais. O sangue foi armazenado em tubos de 1,5 mL com ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. Um analisador hematológico automático (Poch-100iV Diff, Sysmex Corp), foi utilizado para análise dos seguintes parâmetros: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas.

2.12 Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do Software GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA), two-way ou one-way, seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Para todas as análises foi considerado como nível de significância $p \leq 0,05$.

3 Resultados

3.1 Efeito de EAo, Ácido Chiquímico, Ácido Gálico e Ácido anacárdico sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

O extrato das flores de *A. occidentale* (EAo) reduziu o número de promastigotas de *L. amazonensis* viáveis, de forma dose dependente, com CI_{50} de 26,9 $\mu\text{g/mL}$ e CIM de 104,7 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, os compostos fenólicos identificados nas flores, ácido gálico, chiquímico e anacárdico não foram tóxicos para as formas promastigotas, nem na maior dose testada (Tabela 1).

3.2 Efeito do EAo sobre a infecção *in vitro* de *Leishmania amazonensis* em macrófagos.

Foi investigada a ação do EAo sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em modelo de infecção de células Raw. O tratamento com EAo reduziu o número de parasitos por 100 macrófagos, de forma semelhante à anfotericina B (Controle= 733 \pm 34; Amb=178 \pm 63; EAo25= 339 \pm 62; EAo50= 458 \pm 141 e EAo100= 251 \pm 151).

A Tabela 2 mostra que nos grupos tratados com as três diferentes doses do extrato (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), ocorreram sempre os maiores percentuais de macrófagos não infectados ou infectados com um a três protozoários, quando comparados aos grupos não tratados.

3.3 Efeito do EAo sobre a produção de citocinas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

A produção de TNF- α e TGF- β não foi modificada pelo tratamento com o extrato ou com anfotericina B como mostra a Figura 1. Por outro lado, a

produção de IL-10 aumentou progressivamente nos grupos tratados com EAo25 e EAo50 quando comparado aos grupos tratados com anfotericina B (AmB) (Figura 1C), ou nos grupos tratados com a maior dose do extrato (EAo100). Distribuição semelhante foi observada em relação a produção de IFN- γ (Figura 1A) que aumentou no grupo tratado com EAo50, mas não foi alterada no grupo tratado com a maior dose do extrato (EAo100).

3.4 Efeito do tratamento com EAo e FAo sobre peso, tamanho e carga parasitária de camundongos infectados com L. amazonensis.

A infecção com promastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar induziu aumento progressivo no peso da pata dos animais tratados de forma intralesional com EAo, Glucantime via intraperitoneal ou nos grupos tratados com salina (Figura 2A e 2C). Porém, ao final do tratamento foi observado que nos animais do grupo tratado com Glucantime as patas tinham maior tamanho do que nos demais grupos.

O tratamento intralesional com EAo reduziu a carga parasitária tanto no baço como no linfonodo poplíteo adjacente à lesão. No baço, a redução de carga parasitária em EAo ocorreu de forma semelhante ao controle positivo como mostra a Figura 2E e no linfonodo drenante à lesão esta redução foi ainda maior (Figura 2G). Quando este mesmo efeito foi investigado nos grupos tratados por via tópica observamos que o tratamento não alterou a carga parasitária (Figura 2F e 2H).

Em relação ao tratamento tópico as patas do grupo glucantime foram maiores do que a dos demais grupos e as patas dos animais do grupo FAo,

ficaram menores do que a do controle, tanto em tamanho como no peso (Figura 2B e 2D).

3.5 Efeito do tratamento com EAo e FAo sobre a produção de citocinas em camundongos infectados com L. amazonensis.

A concentração de citocinas foi determinada no soro e sobrenadantes das culturas de células obtidas nos linfonodos oriundos de animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com EAo e FAo. A Tabela 3 mostra que o tratamento intralesional aumentou a produção de IL-10 apenas no grupo controle não afetando a produção das demais citocinas. Já no grupo que recebeu tratamento tópico com FAo ou com Glucantime ocorreu aumento da produção de IFN- γ na cultura de células do linfonodo (Tabela 4).

Enquanto isto, no soro não foi detectada a presença de TNF- α , IL-12 e IL-10 no tratamento tópico ou intralesional e as concentrações de IFN- γ e TGF- β não apresentaram diferença entre os grupos.

3.6 Efeito do tratamento com EAo e FAo sobre o perfil de linfócitos T em linfonodos drenantes de camundongos infectados com L. amazonensis.

Para melhor compreender os efeitos do extrato e formulação sobre o sistema imunológico, foi avaliado o efeito do tratamento com EAo sobre o perfil de linfócitos presentes no linfonodo drenante. Como observado na Tabela 5, o tratamento intraslesional com EAo diminuiu o número absoluto de células CD8+ quando comparado ao grupo tratado com Glucantime. Por outro lado, o tratamento tópico com FAo aumentou o número de células CD3+, CD4+ e CD8+ em relação ao grupo controle. Em relação ao glucantime, o grupo

tratado com FAo apresentou redução no número absoluto de células (Tabela 5).

3.7 Efeito do tratamento com EAo e FAo sobre o eritrograma e leucograma de camundongos infectados com L. amazonensis.

O perfil de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas foi avaliado no sangue dos animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com EAo e FAo. Como pode-se observar na Tabela 6 os diferentes tratamentos não alteraram nenhum dos parâmetros analisados.

4 Discussão

O uso de espécies vegetais para o tratamento de úlceras causadas por *Leishmania* sp é bastante comum em regiões endêmicas do Brasil. Inquérito realizado em uma área endêmica do nordeste brasileiro mostrou que *A. occidentale* é a espécie mais utilizada para o tratamento destas ulcerações (França et al., 1996). Comumente o tratamento é realizado a partir da aplicação tópica do pó ou o banho com o decocto da casca do caule ou o extrato da amêndoa (fruto). Entretanto, há controvérsias quanto a eficácia desses tratamentos, pois apesar de já ter sido demonstrada atividade *in vitro* do extrato da casca do caule de *A. occidentale* sobre promastigotas de *L. brasiliensis*, os mesmos extratos não foram eficazes em tratar as lesões *in vivo* (França et al., 1993).

Outras partes da planta têm demonstrado atividade anti-leishmania. Em 2005, Luize et al., mostraram que o extrato etanólico das folhas de *A. occidentale* apresentava efeito *in vitro* sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*. Logo, é indubitável que, apesar dos comprovados efeitos *in vitro*, não está clara a eficácia das diferentes partes de *A. occidentale* sobre cura das lesões *in vivo*. Ademais, considerando que diferentes farmacógenos da mesma espécie vegetal podem apresentar diferentes perfis químicos, é bastante válido estudo que avaliem a eficácia de outras partes dessa espécie, no desenvolvimento da leishmaniose.

Nosso grupo mostrou recentemente que o extrato das flores de *A. occidentale* (EAo) tem uma maior concentração de princípios ativos, quando comparado às folhas e à casca do caule. Em adição, o EAo é rico em compostos fenólicos, substâncias conhecidas por suas propriedades antimicrobianas com potente ação de largo espectro para as espécies *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans* (Silva et al, 2016).

Para investigar esta ação, testamos o efeito leishmanicida *in vitro* do EAo e de substâncias isoladas na infecção por *L. amazonensis*. Essa espécie, juntamente com *L. braziliensis* são os principais agentes da leishmaniose cutânea nas Américas (Reithinger et al., 2007). Para tanto, infectamos camundongos Balb/c, os quais são suscetíveis a infecção, para avaliar o efeito do EAo e de uma formulação tópica a base do mesmo extrato (FAo), sobre o desenvolvimento da lesão. Inicialmente mostramos que o EAo inibe o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*, de forma dose dependente, com IC50 de 26,9ug/mL, indicando uma potente atividade anti-leishmania

direta (Amaral et al., 2006), sobretudo se considerarmos a IC50 de outros extratos sobre o parasita descritas anteriormente por Bezerra et al., (2006).

Importante ressaltar que o EAo não foi tóxico para macrófagos peritoneais e nem para células esplênicas não infectadas (dados não mostrados), indicando que a atividade citotóxica observada é específica para os parasitas. Esses achados são bastante relevantes, visto que um dos principais problemas dos fármacos leishmanicidas é a alta toxicidade tanto para os parasitas como para as células saudáveis do hospedeiro (Croft and Yardley, 2002).

Alem de atuar sobre as formas promastigotas o EAo também foi efetivo em inibir o crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis*, quando avaliamos seu efeito na infecção de células RAW. Considerando o EAo apresentou efeito sobre as duas formas parasitárias do protozoário, é razoável supor que a atividade citotóxica do extrato está relacionada a moléculas, ou vias metabólicas presentes tanto nas formas promastigotas, quanto nas formas amastigotas do parasito (Monzote et al., 2007). Considerando ainda a elevada concentrações de compostos fenólicos presentes no EAo (Silva et al, 2016) e a comprovada ação microbicida desses compostos (Kolodziej et al., 2001), é razoável supor que moléculas pertencentes a essa classe, estejam relacionadas aos efeitos demonstrados.

Os compostos fenólicos incluindo os ácidos chiquímico e gálico estão presentes em altas concentrações no EAo (Silva et al., 2016), porém quando avaliamos a atividade destes compostos *in vitro*, não foi detectado efeito leishmanicida. A exemplo do antimoniato de meglumina, fármaco de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose, pode ser que os compostos só

tenham efeito sobre a forma amastigota intracelular de *Leishmania sp* (Ephros et al., 1999). Pois, enquanto estudos têm evidenciado que o ácido gálico possuem potente efeito sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* (Ribeiro et al., 2015), ainda não está claro a eficácia deste sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* (Kayser et al., 2001; Kiderlen et al., 2001).

O ácido chiquímico também tem se mostrado ineficaz contra as formas amastigotas de *L. donovani* (Kiderlen et al., 2001). Já o ácido anacárdico, apesar de não ter estudo que busquem avaliar seu efeito anti-leishmania, possui importante atividade contra *Trypanosoma cruzi*, protozoário da mesma família do gênero *Leishmania* (Pereira et al., 2008). Por outro lado, é razoável supor que os compostos isolados sejam menos efetivos do que sua associação presente no extrato bruto. A associação entre as substâncias pode ter efeito sinérgico com outros compostos ainda não identificados, visto que o extrato bruto apresentou significativo efeito. Uma das metas futuras do nosso grupo é identificar outros compostos presentes no extrato e avaliar se a associação entre os vários compostos tem ação sobre as formas promastigotas e as amastigotas intracelulares.

Em nosso trabalho, apesar do aumento de IFN- γ após tratamento das células Raw infectadas com a concentração de EAo intermediária, não foi evidenciada correlação entre a produção dessa citocina e a taxa de infecção. Estes dados podem justificar os resultados nulos quanto a produção de óxido nítrico (NO) após o tratamento *in vitro* (*dados não mostrados*).

Com esses dados é possível inferir que o extrato tem ação exclusiva e direta sobre o parasito. Por outro lado, tem sido mostrado que o ácido gálico e ácido chiquímico induzem a produção de NO em células RAW infectadas com

L. donovani (Kolodziej et al., 2008), podendo esse efeito estar relacionado à capacidade de ácido gálico em induzir a expressão de iNOS e IFN- γ (Radtke et al., 2004). Essas evidências reforçam a necessidade de investigar o efeito anti-leishmania e imunomodulador de todos os ácidos fenólicos presente no EAO sobre a infecção *in vitro*.

Protozoários do gênero *Leishmania* têm a capacidade de subverter a resposta imune, o que permite sua diferenciação e proliferação dentro de células da resposta imune inata, a exemplo dos macrófagos (Gregory and Olivier, 2005). Contudo, os macrófagos também são as principais células efetoras responsáveis pela eliminação do parasita, sendo sua ativação essencial para esse processo (Podinovskaia & Descoteaux, 2015). Tem sido mostrado que o IFN- γ somente ou em ação sinérgica com TNF- α estimula a expressão de iNOS e produção de radicais derivados de oxigênio e nitrogênio, moléculas com potente ação antiparasitária (Muñoz-Fernández et al., 1992). Em contraste, a presença de IL-10 e TGF- β tem sido relacionada a um efeito inverso (Ji et al., 2005).

O efeito leishmanicida EAO foi confirmado em modelo murino de infecção de camundongos Balb/c com *L. amazonensis*, tanto no tratamento intralesional como no tópico. Embora o tratamento com EAO não tenha alterado o tamanho e o peso da lesão, o mesmo foi bastante efetivo em reduzir a carga parasitária no baço e linfonodos drenantes de forma similar a droga controle (Glucantime), mesmo que no caso do Glucantime tenha ocorrido aumento do tamanho e peso da pata. Apesar de contraditório, esses resultados são similares aos descritos anteriormente por Patrício et al.(2008), que mostraram que o efeito de *Chenopodium ambrosioides*, em camundongos C3H/HePas

infectados com *L. amazonensis* estava relacionado a redução da carga parasitária nos linfonodos adjacentes e no baço, quando comparadas às controle, associado a um efeito anti-inflamatório local. Como base nesses achados é razoável propor que tanto o EAo como o glucantime estejam estimulando o influxo de leucócitos no local da lesão e ao aumento na produção de citocinas e quimiocinas, só que enquanto o glucantime induz inflamação no local da aplicação (Saha et al., 2011) o tratamento com *A. occidentale* tem efeito inverso, e por isso o tamanho e o peso das patas é diferente. Por outro lado, o tratamento tópico com a formulação FAo, apesar de ter promovido uma redução do tamanho das patas infectadas não diminuiu a carga parasitária. Considerando a efetividade do tratamento intralesional, isso pode indicar uma incompatibilidade entre os princípios ativos leishmanicida e a base da formulação e/ou uma baixa capacidade de absorção desta. Entretanto, a mesma formulação apresentou uma importante atividade cicatrizante em lesões abertas (Silva et al, (*manuscrito em preparação*)), o que pode contribuir para o tratamento das ulcerações.

Corroborando com o perfil de citocinas evidenciado na infecção *in vitro*, o tratamento intralesional não alterou significativamente o perfil de citocinas no soro e cultura *ex vivo* dos linfonodos adjacentes, bem como o perfil de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Por outro lado, o aumento de IFN- γ e linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos tratados topicamente com FAo, indicam que substâncias imunomoduladoras presentes no EAo são compatíveis com formulação, possuindo uma boa absorção. Porém, os dados sugerem que essa atividade a FAo não contribui para o controle da infecção.

A presença de taninos e compostos fenólicos, presente no EAo (Silva, 2016), podem estar relacionados à atividade imunológica do FAo. Tanto os taninos como os compostos fenólicos são compostos com ação imunomoduladora, sobretudo no que se refere a ativação de linfócitos Th1, estratégia relevante no controle da infecção por *L. amazonensis* (Kolodziej et al., 2001; Kolodziej H, 2001; Radtke et al., 2003).

Esses resultados fortalecem a hipótese que a ação anti-Leishmania do extrato das flores é preferencialmente por ação direta sobre o protozoário, contudo substâncias que promovam ativação do sistema podem estar presentes.

5 Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que o extrato das flores de *A. occidentale* (EAo) inibe o crescimento de *L. amazonensis*, *in vitro* e *in vivo*. Além de inibir os crescimentos das formas promastigotas e amastigotas, o EAo reduz a carga parasitária na infecção, possivelmente por ação direta do EAo sobre os protozoários, quando administrado por via intralesional. Por outro lado, apesar do seu efeito imunológico, a formulação à base de EAo, não apresentou efeito leishmanicida. Em conjunto os resultados indicam que *Anacardium occidentale* apresenta potencial farmacológico para prospecção de produtos a serem utilizados no tratamento das leishmanioses. Também é de fundamental importância investigar a ação leishmanicida e imunomoduladora de princípios ativos presentes nas flores dessa espécie, a exemplo dos compostos fenólicos, ácido anacárdico, ácido chiquimico e ácido gálico.

6 Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de produtividade a RNMG. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado LACS.

Referências

- Amaral, F.M.M., Ribeiro, M.N.S., Barbosa-Filho, J.M., Reis, A.S., Nascimento, F.R.F., Macedo, R.O., 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 696–720.
- Bezerra, J.L., Costa, G.C., Lopes, T.C., Carvalho, I.C.D.S., Patrício, F.J., Souza, S.M., Amaral, F.M.M., Rebelo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2006. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Brazilian J. Pharmacogn.* 16, 631–637.
- Bodley, A.L., McGarry, M.W., Shapiro, T.A., 1995. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J. Infect. Dis.* 172, 1157–9.
- Buffet, P.A., Sulahian, A., Garin, Y.J., Nassar, N., Derouin, F., 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2167–8.
- Croft, S.L., Yardley, V., 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* 8, 319–42.
- Ephros, M., Bitnun, A., Shaked, P., Waldman, E., Zilberstein, D., 1999. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 278–82.
- França, F., Cuba, C.A.C., Moreira, E.A., Miguel, O., Almeida, M., Virgens, M. de L., Marsden, P.D., 1993. Avaliação do efeito do extrato de casca cajueiro-branco (*Anacardium occidentale* L.) sobre a infecção por *Leishmania (viannia) brasiliensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26, 151–155.
- França, F., Lago, E.I., Philip, D.M., 1996. 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.* 29, 229–232.
- González, P., Marín, C., Rodríguez-González, I., Hitos, A.B., Rosales, M.J., Reina, M., Díaz, J.G., González-Coloma, A., Sánchez-Moreno, M., 2005. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 136–41. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.08.010
- Gregory, D.J., Olivier, M., 2005. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 130 Suppl, S27–35.
- Guerra, R.N.M., Silva, R.A., Neto, V.M.N., 2012. Composições Farmacêuticas e odontológicas à base de flores ou extrato de partes aéreas de *Anacardium occidentale* e uso dessas composições. PI100268-6 A2.

- Ji, J., Masterson, J., Sun, J., Soong, L., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 174, 7147–7153. doi:174/11/7147 [pii]
- Kaye, P., Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–15.
- Kayser, O., Kolodziej, H., Kiderlen, A.F., 2001. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytother. Res.* 15, 122–6.
- Kiderlen, A.F., Kayser, O., Ferreira, D., Kolodziej, H., 2001. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *Zeitschrift für Naturforschung. C, J. Biosci.* 56, 444–54.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, a F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Foo, L.Y., 2001. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages in vitro. *Planta Med.* 67, 825–32. doi:10.1055/s-2001-18850
- Kolodziej, H., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., 2008. Stimulus (polyphenol, IFN-gamma, LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. *Phytochemistry* 69, 3103–10. doi:10.1016/j.phytochem.2007.11.012
- Lorenzi, H., Matos, F.J. de A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas, Instituto. ed.
- Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 41, 85–94.
- Melo, A.F.M. de, Santos, E.J.V., Souza, L.F.C. de, Carvalho, A. de A.T., Pereira, M. do S. V., Higino, J.S., 2006. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 202–205. doi:10.1590/S0102-695X2006000200012
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2013. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs* 73, 1889–1920. doi:10.1007/s40265-013-0132-1
- Monzote, L., García, M., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. In Vitro Activity of an Essential Oil against *Leishmania donovani*. *Phyther. Res.* 21, 1055–1058. doi:10.1002/ptr
- Muñoz-Fernández, M.A., Fernández, M.A., Fresno, M., 1992. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-

dependent mechanism. Eur. J. Immunol. 22, 301–7. doi:10.1002/eji.1830220203

Nozzi, M., Del Torto, M., Chiarelli, F., Breda, L., 2014. Leishmaniasis and autoimmune diseases in pediatric age. Cell. Immunol. 292, 9–13. doi:10.1016/j.cellimm.2014.08.004

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*. J. Ethnopharmacol. 115, 313–9.

Pereira, J.M., Severino, R.P., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., da Silva, M.F.G.F., Zottis, A., Andricopulo, A.D., Oliva, G., Corrêa, A.G., 2008. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. Bioorg. Med. Chem. 16, 8889–95. doi:10.1016/j.bmc.2008.08.057

Pio Corrêa, M., 1984. Dicionário de plantas Úteis do Brasil., Edição Min. ed. Brasília.

Podinovskaia, M., Descoteaux, A., 2015. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. Future Microbiol. 10, 111–29. doi:10.2217/fmb.14.103

Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Kayser, O., Kolodziej, H., 2004. Gene expression profiles of inducible nitric oxide synthase and cytokines in Leishmania major-infected macrophage-like RAW 264.7 cells treated with gallic acid. Planta Med. 70, 924–8.

Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., Washington, G., Leopold, P., 2007. Cutaneous leishmaniasis.

Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.A., Menezes, I.R.A., 2014. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. Rev. Bras. Plantas Med. 16, 912–930.

Ribeiro, T.G., Nascimento, A.M., Henriques, B.O., Chávez-Fumagalli, M.A., Franca, J.R., Duarte, M.C., Lage, P.S., Andrade, P.H.R., Lage, D.P., Rodrigues, L.B., Costa, L.E., Martins, V.T., Faraco, A.A.G., Coelho, E.A.F., Castilho, R.O., 2015. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. J. Ethnopharmacol. 165, 238–42.

Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. 55, 453–483.

Saha, P., Mukhopadhyay, D., Chatterjee, M., 2011. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1668–79.

Sen, R., Chatterjee, M., 2011. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* 18, 1056–69.

Silva, R.A., 2012. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. Universidade Federal do Maranhão.

SILVA, Rubenice Amaral et al, 2016. Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Anacardium occidentale* L. Flowers in Comparison to Bark and Leaves Extracts. *J of Biosc and Medic.* 4, 87-99,.

Torres, D.C., Adai, V., Ribeiro-Alves, M., Romero, G. a. S., Arévalo, J., Cupolillo, E., Dujardin, J.-C., 2010. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect. Genet. Evol.* 10, 727–733.

Tuon, F.F., Amato, V.S., Graf, M.E., Siqueira, a M., Nicodemo, a C., Neto, V. a, 2008. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.* 47, 109–124.

Who, 2015. Media centre Leishmaniasis. Leishmaniasis Fact sheet N°375 1–5.

Tabela 1: Efeito de Extrato das flores de *Anacardium occidentale* (EAO), Ácido Chiquímico, Ácido Gálico e Ácido Anacárdico sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

	IC₅₀	CIM
EAO	26,9	104,7
Ácido Anacárdico	> 500	> 500
Ácido Chiquímico	> 500	> 500
Ácido Gálico	> 500	> 500

IC₅₀: Concentração inibitória 50%.

CIM: Concentração inibitória 100%

Tabela 2: Efeito do Extrato das flores de *Anacardium occidentale* (EAo) na infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* em macrófagos.

Nº de Amastigotas/ Macrófago	Taxa de Infecção (%)				
	Controle	Anfotericina B	EAo 25ug/mL	EAo 50ug/mL	EAo 100 ug/mL
0 ^a	7,6 ± 0,6	48,3 ± 7,6*	36,3 ± 5,1*	25,0 ± 13,2	38,3 ± 18,8*
1 – 3	17,3 ± 5,5	33,3 ± 5,0*	23,3 ± 4,0	23,3 ± 8,1	37,0 ± 5,0*
4 – 6	21,0 ± 5,5	12,7 ± 3,2	24,3 ± 2,0	20,0 ± 7,2	16,6 ± 8,0
7 – 9	24,0 ± 2,6	3,3 ± 3,2	8,6 ± 2,5	45,3 ± 51,7	2,6 ± 3,7
10 – 12	17,3 ± 3,2	1,0 ± 0,0*	3,6 ± 1,5*	9,6 ± 5,8*	3,3 ± 2,5*
>13	12,7 ± 1,1	1,3 ± 1,5*	3,6 ± 4,0*	3,7 ± 1,1*	2,0 ± 3,4*

Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 amostras por grupo. (*) p≤0,05, quando comparado ao grupo Controle.

^a: Número de amastigotas de *L. amazonensis*

(*) p<0,05 em comparação ao controle

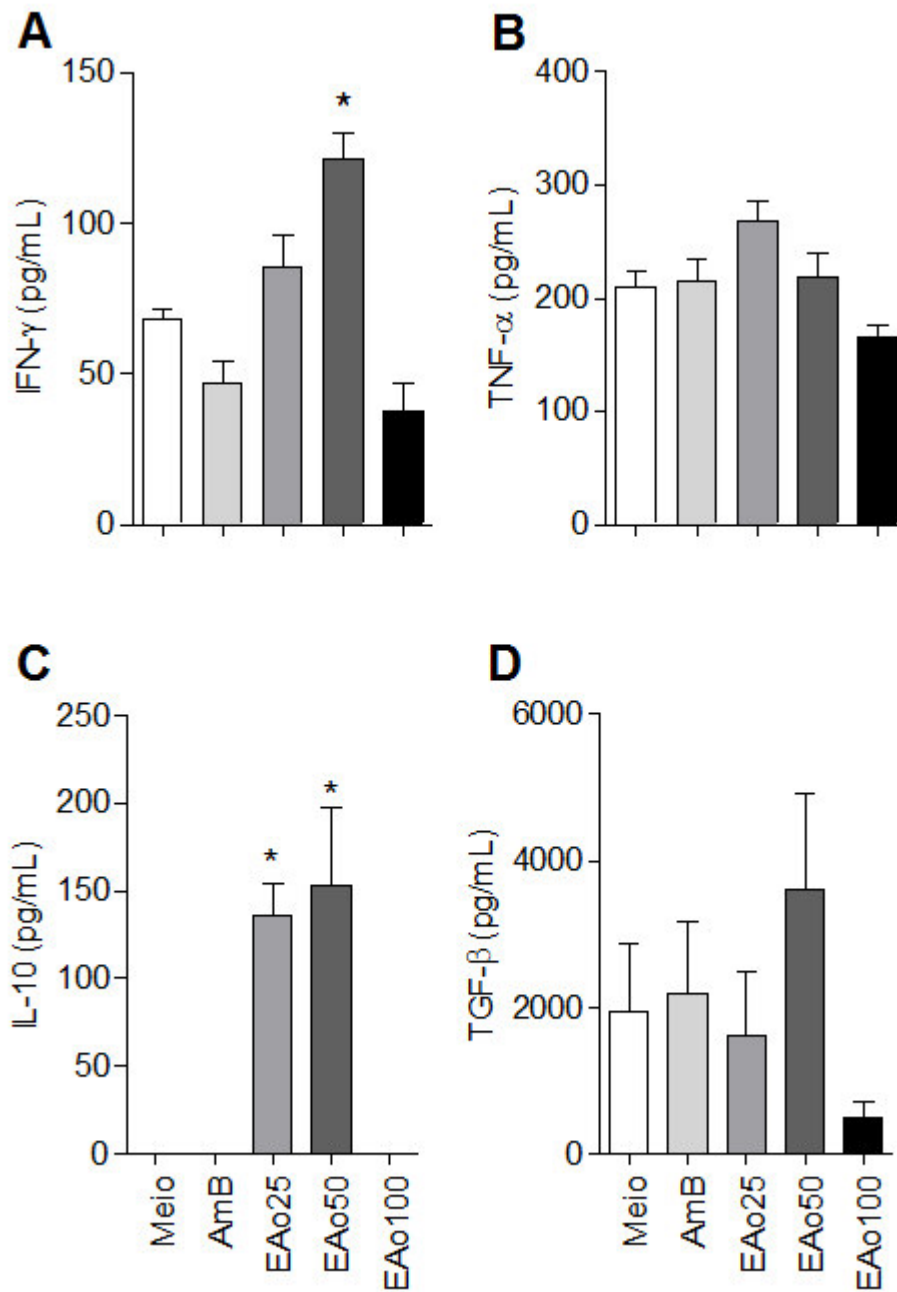


Figura 1: Produção de INF- γ (A); TNF- α (B), IL-10 (C) e TGF- β (D) no sobrenadante de culturas de macrófagos raw infectados, *in vitro*, com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As células infectadas foram tratadas com Anfotericina B ou 25, 50 e 100 μ g/mL de EAo, durante 24 horas, quando os sobrenadantes foram coletados. A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 amostras por grupo. (*) $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo Controle.

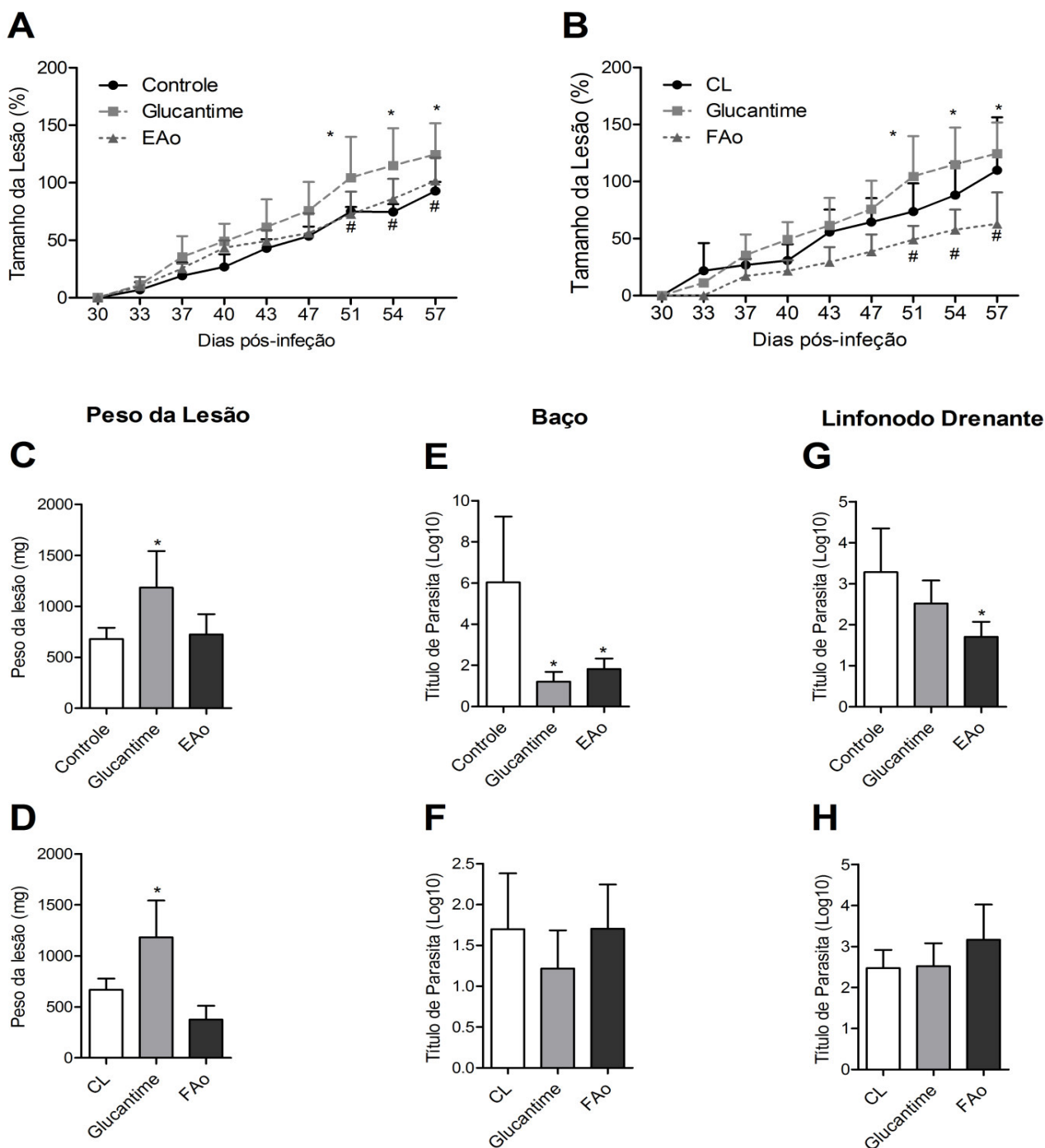


Figura 2: Efeito do tratamento com EAO e FAo sobre tamanho da lesão (A e B), peso da lesão (C e D) e carga parasitária no baço (E e F) e linfonodo (G e H) de camundongos infectados com *L. amazonensis*. Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar e depois de 4 semanas foram tratados por via tópica ou intralésional com EAO 5mg/Kg (EAO5), FAo ou Glucantime via intraperitoneal. Estes grupos foram comparados aos controles que receberam solução fisiológica intralésional ou Creme Lanette tópico. Após o tratamento as patas foram mensuradas da cada 3 dias. A determinação da carga parasitária foi feita no baço e no linfonodo poplíteo adjacente. Os dados representam a média \pm SD de 5 animais por grupo. (*) $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo Controle.

Tabela 3: Efeito do tratamento intralesional com Extrato das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) sobre a produção de citocinas em cultura de linfonodos drenantes e soro de camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*.

	Soro			Cultura Linfonodo		
	Controle	Glucantime	EAO	Controle	Glucantime	EAO
<i>IFN-γ</i>	154,7 \pm 29,8	197,7 \pm 47,2	168,7 \pm 54,8	264,1 \pm 44,8	263,2 \pm 21,9	280,0 \pm 51,5
<i>TNF-α</i>	ND ^A	ND	ND	ND	ND	ND
<i>IL-12</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>IL-10</i>	ND	ND	ND	4,8 \pm 8,7	118,7 \pm 47,9*	109,0 \pm 51,2
<i>TGF-β</i>	4578,7 \pm 4305,9	2516,8 \pm 2067,1	4798,1 \pm 4287,2	3569,7 \pm 1047,4	4578,7 \pm 2595,4	2780,0 \pm 1599,9

(*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (CTRL) \pm SD.

(A) ND= Não detectável

Tabela 4: Efeito do tratamento tópico com formulação contendo Extrato das Flores de *Anacardium occidentale* (FAo) sobre a produção de citocinas em cultura de linfonodos drenantes e soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*.

	Soro			Cultura Linfonodo		
	CL	Glucantime	FAo	CL	Glucantime	FAo
<i>IFN-γ</i>	189,3 \pm 45,6	197,7 \pm 47,2	182,7 \pm 54,1	149,1 \pm 37,5	263,2 \pm 21,9*	291,3 \pm 50,5*
<i>TNF-α</i>	ND ^A	ND	ND	ND	ND	ND
<i>IL-12</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>IL-10</i>	ND	ND	ND	ND	118,7 \pm 47,9	234,8 \pm 210,0
<i>TGF-β</i>	7137,8 \pm 5956,3	2516,8 \pm 2067,1	3152,9 \pm 1310,0	2714,2 \pm 1731,8	4578,7 \pm 2595,4	4030,3 \pm 2331,8

(*) $p < 0,05$ em comparação ao controle (CL) \pm SD.

(A) ND= Não detectável

Tabela 5: Efeito do tratamento com EAo e FAo por via intralesional e tópica, respectivamente, sobre o perfil de linfócitos T em linfonodos drenantes de camundongos infectados com *L. amazonensis*.

	Intralesional			Tópico		
	Controle	Glucantime	EAo	Controle	Glucantime	FAo
CD3+	20,9 ± 9,2	26,7 ± 10,4	14,0 ± 4,7	7,8 ± 2,8	26,7 ± 10,4	16,0 ± 4,0 [#]
CD4+	9,1 ± 4,5	11,9 ± 4,6	5,6 ± 1,9	3,2 ± 0,9	11,9 ± 4,6	6,5 ± 2,0 [#]
CD8+	6,1 ± 2,6	8,5 ± 2,9	3,9 ± 1,4 [#]	2,2 ± ,07	8,5 ± 2,9	4,7 ± 1,3 [#]

(*) p<0,05 em comparação ao controle (CL) ± SD

(#) p<0,05 em comparação ao glucantime ± SD

Tabela 6: Efeito do tratamento com EAo e FAo sobre o parâmetros hematológicos de camundongos infectados com *L. amazonensis*.

	Intralesional			Tópico		
	Controle	Glucantime	EAo	CL	Glucantime	FAo
Eritrócitos ($\times 10^3/uL$)	11,0 \pm 0,8	11,4 \pm 0,4	11,8 \pm 0,5	12,0 \pm 0,5	11,4 \pm 0,4	10,6 \pm 2,0
Hemoglobina (g/dL)	15,0 \pm 1,1	15,5 \pm 0,3	15,4 \pm 1,0	16,3 \pm 0,7	15,5 \pm 0,3	14,8 \pm 2,8
Hematócrito(%)	52,4 \pm 4,3	53,6 \pm 1,0	54,0 \pm 2,4	55,8 \pm 2,2	53,6 \pm 1,0	50,7 \pm 9,6
VCM (fL)	47,3 \pm 0,3	46,8 \pm 1,3	45,9 \pm 2,1	46,5 \pm 1,4	46,8 \pm 1,3	47,9 \pm 0,3
HCM (pg)	13,6 \pm 0,0	13,5 \pm 0,4	13,0 \pm 0,9	13,6 \pm 0,6	13,5 \pm 0,4	14,0 \pm 0,1
CHCM (g/dL)	28,7 \pm 0,2	28,9 \pm 0,2	28,4 \pm 0,8	29,3 \pm 0,4	28,9 \pm 0,2	29,2 \pm 0,2
Leucócitos ($\times 10^3/uL$)	5,3 \pm 1,7	5,2 \pm 1,0	5,4 \pm 3,1	5,0 \pm 0,7	5,2 \pm 1,0	5,4 \pm 2,4
Linfócitos ($\times 10^3/uL$)	3,6 \pm 1,8	4,4 \pm 1,4	3,1 \pm 0,7	3,2 \pm 0,5	4,4 \pm 1,4	3,2 \pm 1,8
Neutrófilos($\times 10^3/uL$)	0,8 \pm 0,3	2,5 \pm 2,6	0,9 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	2,5 \pm 2,6	1,4 \pm 0,4
Plaquetas ($\times 10^3/uL$)	1787 \pm 111,0	1851 \pm 345,4	2150 \pm 313,8	1828,0 \pm 442,7	1851 \pm 345,4	1691,0 \pm 160,2

6. CAPÍTULO III

“COMPOSIÇÕES E USOS DE EMULSÕES À BASE DE *Anacardium occidentale* PARA USO COMO BIOPRODUTO CICATRIZANTE..”

Patente depositada em: 13 de Maio de 2015

Nº de registro: BR 1020150014249

CAMPO DA INVENÇÃO:

A presente invenção descreve a elaboração de formulação farmacêutica do tipo emulsão à base do extrato liofilizado de *Anacardium occidentale*, bem como sua utilização para tratamento de lesões como produto cicatrizante.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos objetivos propostos e resultados apresentados podemos inferir que:

O extrato etanólico à base de *Anacardium occidentale* apresentou atividade anti-*Leishmania* *in vitro* tanto por efeito citotóxico direto, ativando células infectadas a produzirem citocinas que contribuíram para redução do número de parasitas intracelulares, tanto nos ensaios *in vitro* como nos ensaios *in vivo*, usando o extrato, mas não a formulação. A ação leishmanicida está associada ao potencial imunomodulador do extrato em estimular a produção de IFN- γ , mesmo em animais susceptíveis que normalmente respondem a infecção com aumento de IL-10.

Em outro grupo de experimentos observamos que a formulação apresenta efeito na cicatrização de feridas cutâneas devido ao efeito sobre a produção de IL-6 e na re-epitelização. Diante dos resultados obtidos o extrato de flores de *Anacardium occidentale* pode ser uma fonte promissora de compostos bioativos que podem ser utilizados no tratamento de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* bem como na cicatrização das lesões cutâneas decorrentes da infecção.

Os resultados aqui elencados abrem novas perspectivas para avaliação do potencial biotecnológico de *A. occidentale* na indústria farmacêutica e cosmética.

Referências

AGOSTINI-COSTA, Tania da Silveira *et al.* Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural** v. 34, n. 4, p. 1075–1080 , 2004.

AKINPELU, David A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia** v. 72, p. 286–287 , 2001.

AMERICA, Latin. *Global Health Observatory (GHO) data Leishmaniasis*. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>.

ANDERSEN, Ellen M. *et al.* Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 72, n. 2, p. 133–137 , 2005..

ASILIAN, A. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: Double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization** v. 81, n. 5, p. 353–359 , 2003.

BAGNIS, Corinne Isnard; DERAY, Gilbert. Amphotericin B Nephrotoxicity. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation** v. 13, n. 4, p. 481–491 , 2002.

BATES, Paul a. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology** v. 37, n. 10, p. 1097–1106 , 2007.

BHATTACHARYA, Pradyot; ALI, Nahid. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 46, n. 2, p. 128–134 , 2013.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology** v. 2, n. 10, p. 907–16 , 2001.

BRASIL. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília 2. ed.: [s.n.], 2007. 182 p.

BUENO, Fernanda Giacomini *et al.* Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia** v. 99, p. 252–260 , 2014.

CDC. *Biology Life Cycle of Leishmaniasis*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em 01 de Novembro de 2015.

CHARMOY, Mélanie *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** v. 2010, p. 2–9 , 2010.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel *et al.* Review Article New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. v. 48, n. April, p. 235–242 , 2015.

CORRÊA, M Pio. **Dicionário de plantas Úteis do Brasil**. Edição Min ed.Brasília: [s.n.], 1984. 6 volumes p. .

COURRET, Nathalie *et al.* Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology** v. 33, n. 12, p. 1373–1383 , 2003.

COUTO, Andréa Boldarini; RAMOS, Luíz Antonio; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química. **Química Nova** v. 21, n. 2, p. 221–227 , 1998.

COUTO, Daíne Vargas *et al.* American tegumentary leishmaniasis - a case of therapeutic challenge. **Anais brasileiros de dermatologia** v. 89, n. 6, p. 974–86 , 2014.

CROFT, Simon L; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society** v. 19, n. 1, p. 111–126 , 2006.

CROFT, Simon L; YARDLEY, Vanessa. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current pharmaceutical design** v. 8, n. 4, p. 319–42 , jan. 2002.

CUNA, Washington R *et al.* Enhancement of a TH1 immune response in amphotericin B-treated mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of biomedicine & biotechnology** v. 2007, n. 5, p. 96410 , jan. 2007.

DARE, S S *et al.* Effects of Aqueous Extract of *Anacardium occidentale* (Cashew) Leaf on Pregnancy Outcome of Wistar Rats. v. 3, n. 2, p. 77–82 , 2011.

DAVIS, Antony J; KEDZIERSKI, Lukasz. Recent advances in antileishmanial drug development. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)** v. 6, n. 2, p. 163–9 , 2005.

DE ASSIS SOUZA, Marina *et al.* Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial pathogenesis** v. 57, p. 27–32 , 2013.

DÍAZ, Nilka Luisa; ZERPA, Olga; TAPIA, Félix Jacobo. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American

cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 108, n. 4, p. 446–52 , 2013.

DOS SANTOS, Aline Marques *et al.* Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 41, n. 5, p. 444–448 , 2008.

ELAINE, Selma *et al.* Óleo Da Castanha De Caju: Oportunidades E Desafios No Contexto Do Desenvolvimento E Sustentabilidade Industrial. **Quim. Nova** v. 32, n. 3, p. 732–741 , 2009.

FLÁVIO FRANÇA, CÉSAR A. C. CUBA, EDUARDO A.MOREIRA, OBDÚLIO MIGUEL, MARCOS ALMEIDA, Maria de L. das Virgens e Philip D. Marsden. Avaliação do efeito do extrato de casca cajueiro-branco (*Anacardium occidentale* L.) sobre a infecção por *Leishmania (viannia) brasiliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 26, n. 3, p. 151–155 , 1993.

FOURNET, Alain *et al.* In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 40, n. 11, p. 2447–2451 , 1996.

FRANÇA, Flavio; LAGO, Ednaldo I; PHILIP, D Marsden. 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** v. 29, n. 3, p. 229–232 , 1996.

GONÇALVES, Gisele Santos *et al.* Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica** v. 93, n. 2, p. 161–167 , 2005.

GONZALEZ, Urb *et al.* **Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** [S.l: s.n.], 2009. 148 p.

GUERRA, Rosane N M; SILVA, Rubenice Amaral; NETO, Valério Monteiro Neto. *Composições Farmacêuticas e odontológicas à base de flores ou extrato de partes aéreas de Anacardium occidentale e uso dessas composições.* . Brasil: [s.n.]. , 2012

GUERRA, Rosane N M; SILVA, Tonicley Alexandre. *Processo para obtenção de Flores de Anacardium occidentale L. (Cajueiro), Extrato hidroalcoólico, Liofilizado, Seco por Atomização, Chá, suas composições farmacêuticas e uso terapêutico.* . Brasi: [s.n.]. , 2010

GUPTA, Gaurav; OGHUMU, Steve; SATOSKAR, Abhay R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in applied microbiology** v. 82, p. 155–84 , 2013.

HORTA, Maria Fátima *et al.* Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research** v. 2012, p. 1–11 , 2012.

KAMHAWI, Shaden. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in parasitology** v. 22, n. 9, p. 439–45 , 2006.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology** v. 9, n. 8, p. 604–15 , ago. 2011.

KHOSHDEL, A *et al.* Increased Levels of IL-10 , IL-12 , and IFN- γ in Patients with Visceral Leishmaniasis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 13, n. 1, p. 44–46 , 2009.

KIMA, Peter E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology** v. 37, n. 10, p. 1087–96 , 2007.

KOŁODZIEJ, H *et al.* Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha-release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. **Biological & pharmaceutical bulletin** v. 24, n. 9, p. 1016–21 , set. 2001.

KOŁODZIEJ, Herbert; KIDERLEN, Albrecht F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry** v. 66, n. 17, p. 2056–71 , set. 2005.

KUBO, Isao *et al.* Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry** v. 99, n. 3, p. 555–562 , 2006.

LIESE, Jan; SCHLEICHER, Ulrike; BOGDAN, Christian. The innate immune response against Leishmania parasites. **Immunobiology** v. 213, n. 3-4, p. 377–387 , 2008.

LIMA, Carlos Roberto De. Tannin potencial evaluation of six forest species of brazilian semi-arid region. **Cerne Lavras** p. 232–238 , 2006.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto ed.[S.l: s.n.], 2002. 512 p.

LUIZE, Patrícia Shima *et al.* Effects of medicinal plant extracts on growth of Leishmania (L .) amazonensis and Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 41, n. 1, p. 85–94 , 2005.

MCCONVILLE, Malcolm J; NADERER, Thomas. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. **Annual review of microbiology** v. 65, p. 543–61 , jan. 2011.

MCCONVILLE, Malcolm J. *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. **Trends in Parasitology** v. 23, n. 8, p. 368–375 , 2007.

MELO, Guilherme D. *et al.* *Leishmania* infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. **Journal of Neuroimmunology** v. 289, p. 21–29 , 2015.

MINODIER, Philippe; PAROLA, Philippe. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease** v. 5, n. 3, p. 150–158 , 2007.

MITROPOULOS, Panagiotis; KONIDAS, Pete; DURKIN-KONIDAS, Mindy. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 63, n. 2, p. 309–22 , ago. 2010.

MOLLINEDO, Faustino *et al.* Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry** v. 285, n. 45, p. 34528–34536 , 2010.

MONGE-MAILLO, Begoña; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Drugs** v. 73, n. 17, p. 1889–1920 , 2013.

MONTENEGRO-IDROGO, Juan J. *et al.* Leishmaniasis mucocutánea en un paciente con infección por VIH. **Revista Chilena de Infectología** v. 31, n. 5, p. 610–614 , 2014.

MOREIRA, Conceição R *et al.* Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão , Brasil Awareness of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and use of alternative thera. **Cadernos de Saúde Pública** v. 18, n. 1, p. 187–195 , 2002.

MUKBEL, Rami M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 76, n. 4, p. 669–675 , 2007.

NADERER, Thomas; MCCONVILLE, Malcolm J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology** v. 10, n. 2, p. 301–308 , 2007.

NOVAIS, Fernanda O.; SCOTT, Phillip. CD8⁺ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology** v. 37, n. 3, p. 251–259 , 2015.

NYLÉN, Susanne *et al.* Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine** v. 204, n. 4, p. 805–817 , 2007.

OLAJIDE, Olumayokun a *et al.* Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. **Journal of ethnopharmacology** v. 95, n. 2-3, p. 139–42 , dez. 2004.

OLIVEIRA, Walker Nonato *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine** v. 66, n. 2, p. 127–132 , 2014.

OTA, Haruko *et al.* Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science** v. 70, n. 6, p. 589–93 , 2008.

PAHO. Epidemiological Report of the Americas. **Report Leishmaniases** v. 3, p. 2–5 ,2015 Disponível em: <<http://new.paho.org/leishmaniasis>>.

PARAMASHIVAPPA, R *et al.* Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium*. **Society** p. 2548–2551 , 2001.

RAVICHANDRAN, Kodi S; LORENZ, Ulrike. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature reviews. Immunology** v. 7, n. 12, p. 964–74 , dez. 2007.

RODRIGUES, Eliana. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of ethnopharmacology** v. 111, n. 2, p. 295–302 , 2007.

SAHA, Piu; MUKHOPADHYAY, Debanjan; CHATTERJEE, Mitali. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International immunopharmacology** v. 11, n. 11, p. 1668–79 , dez. 2011.

SANTOS, Gustavo H. F. *et al.* Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, rich in tannins. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 21, n. 3, p. 444–449 , jun. 2011.

SERENO, Denis *et al.* Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 45, n. 7, p. 2064–2069 , 2001.

SILVA, Rubenice Amaral *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Anacardium occidentale*L. Flowers in Comparison to Bark and Leaves Extracts. **Journal of Biosciences and Medicines** v. 4, p. 87-99, 2016.

SILVEIRA, Fernando T; LAINSON, Ralph; CORBETT, Carlos E P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 99, n. 3, p. 239–51 , 2004.

SOKENG, S D *et al.* Hypoglycemic Effect of *Anacardium occidentale* L . Methanol Extract and Fractions on Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Global Journal of Pharmacology** v. 1, n. 1, p. 1–5 , 2007.

TEDONG, Leonard *et al.* Research Paper. v. 3, p. 23–35 , 2006.

TORRES, Davi Coe *et al.* Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. **Infection, Genetics and Evolution** v. 10, n. 6, p. 727–733 , 2010.

TUON, F F *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology** v. 47, n. 2, p. 109–124 , 2008.

UL BARI, Arfan; RAHMAN, Simeen Ber. Cutaneous leishmaniasis: An overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists** v. 18, p. 42–48 , 2008.

VAN ASSCHE, Tim *et al.* *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine** v. 51, n. 2, p. 337–351 , 2011.

VAN ZANDBERGEN, Ger *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 173, n. 11, p. 6521–6525 , 2004.

VELEZ, Ivan D. *et al.* Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. **Case Reports in Dermatology** v. 7, n. 52, p. 275–286 , 2015.

WHO. Media centre Leishmaniasis. **Leishmaniasis Fact sheet N°375** p. 1–5 , 2015.

ZAND, Mohammad; NARASU, M.lakshmi. *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **Intl. J. Mol. Med. Adv. Sci** v. 8, n. 4, p. 419–425 , 2014.