



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato de fungo endofítico Hb12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* manipulado conforme a Farmacotécnica Homeopática.

ALAN SOARES DA SILVA

Macaé
Abril de 2016

ALAN SOARES DA SILVA

Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato de fungo endofítico Hb12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* manipulado conforme a Farmacotécnica Homeopática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Passos Chaves
Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Barth

Macaé

Abril de 2016

“Fácil é sonhar todas as noites. Difícil é lutar por um sonho.”

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seus planos sempre se cumprirem em minha vida;

À minha família, em especial a minha mãe que acreditou e investiu para que meu sonho se tornasse possível; as minhas irmãs e irmão, em especial a minha irmã Nete que me impulsionava sempre com seu exemplo e sabedoria, além de todo o carinho e atenção, e ao meu irmão Pedro, que é a pessoinha mais especial que conheço e também a razão do meu viver;

Ao meu namorado Lucas, por todo amor, compreensão e palavras de estímulos durante a graduação, sendo de suma importância para que essa etapa se cumprisse;

Aos meus amigos de faculdade, que se tornaram uma força a mais nesses 5 anos, pelos tantos momentos harmoniosos, divertidos, felizes, mesmo que nas horas mais difíceis.

À minha amiga Jessica Pereira, que foi muito especial durante toda minha trajetória no curso de Farmácia e também na realização deste trabalho.

A Prof. Dr^a Suzana Passos Chaves pela orientação, pois compartilhou seu tempo, conhecimento, paciência e amizade comigo nesse trabalho. Ao Prof. Dr. Thiago Barth pela disposição, alegria e muita sabedoria demonstrada durante toda a construção desse projeto;

Ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) por ceder as preparações dos extratos para utilização neste estudo.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento disponível para a doença possui muitos efeitos colaterais, o que diminui a adesão da terapia pelo paciente. Na busca de um novo fármaco para a leishmaniose cutânea, nosso grupo tem estudado o extrato de fungo endofítico isolado da planta *Humiria balsamifera* (HB12b2) que demonstrou atividade anti-promastigota. A Homeopatia tem como um de seus princípios o uso de doses mínimas, com o objetivo de diminuir efeitos colaterais dos medicamentos utilizados. Com isso, o objetivo deste trabalho foi testar o extrato do fungo HB12b2 manipulado conforme a farmacotécnica homeopática e avaliar sua atividade anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* nas cepas Josefa e LV78. Os medicamentos HB12b2 10 CH (EtOH 30%) e 30 CH (EtOH 30% e água destilada) foram manipulados segundo o método da Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª Edição. Para avaliar o perfil químico dos medicamentos manipulados, utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos. As análises foram realizadas por fase reversa, empregando uma coluna Synergi Fusion RP (Phenomenex), C18 (150 x 4,6 mm e partícula de 4 µm). A fase móvel foi composta por metanol e água ultra-pura com eluição em gradiente, vazão de 1 mL/min e detecção em 268nm, com volume de injeção de 50 µL e temperatura de análise de 35 °C. Como o intuito do método era identificar os picos majoritários presentes no extrato, o método mostrou-se linear na faixa de concentração de 1,25 - 20 µg/mL de extrato, fornecendo um coeficiente de correlação linear de 0,9927. Além disso, forneceu limites de detecção e quantificação de 0,98 e 3,27 µg/mL. Após análise dos cromatogramas dos medicamentos das diluições 10 e 30 CH, não foram observados picos diferentes aos dos controles, que se justifica através do princípio da homeopatia que menciona não ser possível detectar moléculas ou átomos da substância original após as potências de 12CH e 24DH, pois nestas escalas, o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ átomos) é ultrapassado. No ensaio anti-promastigota de *L. amazonensis*, os parasitos foram tratados durante 48 horas/26° C com os medicamentos (10% medicamento/poço) e o número de parasitos avaliado através de ensaio fluorimétrico com Alamar blue (Josefa) e contagem de promastigotas (LV78). Na cepa Josefa, a atividade anti-promastigota apresentada por HB12b2 10 e 30 CH foi similar ao veículo EtOH 30% (20 % de inibição). Já na cepa LV78, o HB12b2 30 CH manipulado em água destilada não apresentou inibição de crescimento significativa comparado ao veículo controle (água), e o HB12b2 30 CH em álcool 30% teve

atividade similar ao controle EtOH 30%, entretanto, o EtOH 30% 30 CH demonstrou efeito anti-promastigota de LV78 significativo. Neste trabalho demonstramos que o preparado homeopático de Hb12b2 utilizando como veículo álcool 30% e água destilada apresentou atividade anti-promastigota similar aos veículos utilizados, e que métodos analíticos mais sensíveis são necessários para avaliação do perfil químico do medicamento.

Palavras-chave: Homeopatia, *Leishmania amazonensis*, Leishmaniose, medicamento homeopático, tratamento.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos testes segundo a finalidade.	28
Quadro 2	Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições Cromatográficas Otimizadas da Coluna.	45
Tabela 2	Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação gráfica da curva de calibração das diluições seriadas de HB12b2.	46
------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da ocorrência de novos casos de leishmaniose visceral no ano 2012.	19
Figura 2	Distribuição mundial da ocorrência de novos casos de leishmaniose cutânea no ano 2012.	19
Figura 3	Manifestações clínicas das diferentes formas de leishmaniose.	21
Figura 4	Ciclo parasitário da <i>Leishmania</i> .	22
Figura 5	Estrutura dos principais fármacos no tratamento das leishmanioses.	23
Figura 6	Teste da atividade anti-promastigota do extrato de fungo endofítico HB12b2 10 e 30 CH manipulados em etanol 30%.	40
Figura 7	Teste da atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> LV78 do extrato de fungo endofítico HB12b2 30 CH manipulados em etanol 30%.	43
Figura 8	Teste da atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> LV78 do extrato de fungo endofítico HB12b2 30 CH manipulados em água.	44
Figura 9	Cromatograma representativo da análise do extrato etanólico do fungo HB12b2 5µg/mL, EtOH 30% e H ₂ O. (1) pico marcador (3,8 min).	48
Figura 10	Cromatograma representativo da análise do extrato etanólico do fungo HB12b2 5µg/mL, medicamento homeopático obtido do extrato etanólico do fungo HB12b2 preparado em EtOH 30% 30CH, medicamento homeopático EtOH 30% 30CH e medicamento homeopático H ₂ O 30 CH.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CH	Centesimal Hahnemanianna
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DH	Decimal de Hering
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
HB12b2	Extrato de fungo endofítico em meio de crescimento de arroz isolado da planta <i>Humiria balsamifera</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Limite de Detecção
LM	Cinquenta Mlesimal
LMC	Leishmaniose Muco-Cutânea
LQ	Limite de Quantificação
LV	Leishmaniose Visceral
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Princípio da Similitude.....	15
1.2 Experimentação no Homem São e Patogenesias.....	15
1.3 Medicamento Único.....	16
1.4 Doses Infinitesimais e Escalas Homeopáticas.....	16
1.5 Leishmaniose.....	17
1.5.1 Epidemiologia.....	17
1.5.2 Formas Clínicas.....	20
1.5.3 Ciclo Parasitário.....	22
1.5.4 Tratamento das Leishmanioses.....	22
1.5.5 Alternativas Fitoterápicas para o Tratamento das Leishmanioses....	24
1.5.6 Medicamentos Homeopáticos usados para Leishmaniose.....	24
1.6 Uso de medicamentos alopáticos manipulados homeopaticamente....	25
1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	25
1.8 Validação de Metodos Analíticos.....	26
1.9 Estado da Arte.....	29
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Parasitos.....	32
4.2 Amostras.....	32
4.3 Controles.....	32
4.4 Atividade anti-promastigota.....	33
4.4.1 Extrato Bruto do Fungo Endofítico HB12b2.....	34
4.4.1.1 Manipulação dos Medicamentos Homeopáticos.....	34
4.5 Análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos.....	34
4.6 Análise Estatística.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> Josefa dos medicamentos HB12b2 10 e 30 CH.....	38

5.2 Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> JV78 do medicamento HB12b2 30 CH.....	41
5.3 Análise Cromatográfica dos Medicamentos Homeopáticos.....	45
5.4 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para identificação do constituinte majoritário do extrato em medicamentos homeopáticos.....	46
5.4.1 Linearidade.....	46
5.4.2 Limite de Quantificação.....	47
5.4.3 Limite de Detecção.....	47
5.4.4 Especificidade.....	47
5.5 Análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos.....	48
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A palavra homeopatia se origina do grego *homolós*= semelhante + *páthos*= doença. A mesma é considerada uma prática médica, farmacêutica e filosófica que se baseia em conceitos e ações através da cura do indivíduo enfermo utilizando uma substância semelhante e capaz de causar os sintomas desta enfermidade em um indivíduo saudável, chamada Lei dos Semelhantes (*Similia similibus curentur*) (KOSSAK-ROMANCH, 1984; HAHNEMANN, 2001; FURUTA, et al., 2003) que foi uma das formas de tratamento proposta por Hipócrates (460-350 a.C.), médico grego. Além da Lei dos Semelhantes, Hipócrates também propôs o princípio da cura pelos contrários (*Contraria Contrariis Curentur*) e a força de cura natural (*Vis medicatrix naturae*) (DUDGEON, 1994; CORRÊA et al., 1997).

Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843) é dito como o “pai” da Homeopatia. Nascido na Alemanha, Hahnemann se formou em medicina aos 24 anos pela Universidade de Erlangen, em 1779. Mas foi somente aos 35 anos de idade que realmente se envolveu com os princípios da Homeopatia, ao experimentar em si mesmo, durante a tradução da *Matéria Médica*, de William Cullen, uma substância chamada quinina, que era utilizada para o tratamento da malária. A quinina foi capaz de manifestar em seu organismo os sintomas da doença, e a partir desse experimento, Hahnemann concluiu que a mesma tratava a malária pelo poder de despertar em um indivíduo sadio os sintomas produzidos pela enfermidade. Consolidando as suas pesquisas, ele seguiu experimentando diversas substâncias para comprovação dos fundamentos inicialmente descritos por Hipócrates (DUDGEON, 1994; CORRÊA et al., 1997).

Hahnemann criou então, com base em seus fundamentos, os quatro princípios básicos pelos quais a homeopatia se baseia até os dias atuais: princípio da similitude, experimentação no homem são e patogênesias, medicamento único e doses infinitesimais e escalas de diluição do medicamento homeopático.

1.1 Princípio da Similitude

A Lei dos Semelhantes foi descrita por Hipócrates e testada experimentalmente por Hahnemann, que fez experimentos com medicamentos em indivíduos sadios correlacionando propriedades dos medicamentos com sintomas produzidos pelas drogas experimentadas (TEIXEIRA, 2006).

Em 1796, Hahnemann publicou o seu primeiro ensaio intitulado “Ensaio Sobre um Novo Princípio para se Averiguar o Poder Curativo das Drogas”, que traz a descrição de substâncias e suas propriedades farmacológicas através do princípio da similitude (CORRÊA *et al.*, 1997).

Esses ensaios descrevem as reações provocadas no organismo pela utilização de um medicamento homeopático. O efeito primário provocado pelo uso de um medicamento homeopático inclui a acentuação e piora dos sintomas, causando uma alteração da saúde por um tempo mais prolongado, na tentativa de alcançar o equilíbrio homeostático que é visto no efeito secundário, tendo a melhora dos sintomas e conseqüentemente a promoção da cura, pois o organismo é induzido a reagir contra os sintomas (TEIXEIRA, 2006).

1.2 Experimentação no Homem São e Patogenesias

A experimentação no homem são é dita como a utilização de ensaios através de protocolos específicos que tem a finalidade de elucidar qual seria o melhor medicamento homeopático ou substância capaz de provocar no indivíduo sadio os mesmos sintomas primários vistos no indivíduo enfermo (CORRÊA *et al.*, 1997).

Os sintomas despertados pelas drogas em indivíduos sadios são chamados de sintomas patogenéticos ou patogenesias (TEIXEIRA, 2013).

1.3 Medicamento Único

O medicamento único consiste em um tratamento individualizado (também conhecido como *simillimum*), baseado nas semelhanças físicas, emocionais e mentais do paciente (TEIXEIRA, 2006). Com esse princípio, pode-se afirmar que cada indivíduo vai possuir um medicamento único de acordo com as características apresentadas pelo mesmo.

Hahnemann acreditava muito nesse princípio, e pregava que o melhor tratamento seria aquele composto por apenas um medicamento, sendo este mais eficaz para atingir a cura (TEIXEIRA, 2006; SANTOS e SÁ, 2014). A Matéria Médica Homeopática deve ser aplicada pelo clínico com muita cautela para se chegar ao medicamento único do paciente em questão, de forma que ele (o medicamento) seja capaz de se adaptar aos sintomas apresentados (SIQUEIRA, 2009; SANTOS e SÁ, 2014).

1.4 Doses Infinitesimais e Escalas Homeopáticas

As doses infinitesimais representam as diluições do medicamento homeopático que foram introduzidas na técnica de manipulação homeopática feitas para reduzir os efeitos colaterais desses medicamentos. Hahnemann propôs também uma metodologia de dinamização, ou seja, fortes sucussões entre cada diluição, na tentativa de diminuir o efeito primário provocado pela administração da droga (TEIXEIRA, 2011).

As três principais escalas para a diluição e o desenvolvimento de um medicamento homeopático segundo a farmacotécnica homeopática são as centesimal hahnemanniana (CH), decimal de Hering (DH) e cinquenta milesimal (LM) (FONTES, 2012).

Na escala decimal, a diluição é preparada na proporção de 1:10, ou seja, uma parte do insumo ativo é diluída em nove partes do insumo inerte, totalizando dez partes. A escala decimal foi criada por Hering nos Estados Unidos e disseminada por Vehsemeyer na Alemanha, sendo proposta a fim de se reduzir as distâncias entre as quantidades de insumo ativo e insumo inerte, para que a diluição torne-se mais uniforme com fácil preparo (FONTES, 2012).

A escala de diluição centesimal possui a proporção de 1:100, ou seja, uma parte do insumo ativo é diluída em 99 partes do insumo inerte, totalizando 100 partes. Essa escala foi criada por Hahnemann, sendo a única citada por ele nas cinco primeiras edições do *Organon*. Por influência da escola francesa, a escala mais difundida no Brasil é a centesimal (FONTES, 2012).

Na escala cinquenta milésimal, a diluição é preparada na proporção de 1:50000. Para o preparo de uma potência a partir da escala cinquenta milésimal, alguns fatores importantes devem ser considerados. Deve ser feita a técnica de trituração até a potência 3 CH; então, faz-se a diluição do 3 CH triturado (1:1.000.000): pesa-se 63 mg do 3 CH triturado, e dissolve em 400 gotas de água e 100 gotas de álcool 96%. Então, coloca-se em frasco apropriado 1 gota da solução anterior + 100 gotas de EtOH 96% e aplicar 100 succussões. Em seguida, faz a impregnação de 500 microglóbulos com 1 gota da solução anterior: 1 microglóbulo = 1 LM (FONTES, 2012).

Para preparo das drogas através das escalas mencionadas acima, pode-se utilizar diferentes insumos inertes dependendo do ponto de partida, dentre eles temos a lactose, água purificada e álcool em diferentes graduações (ANVISA, 2010).

1.5 Leishmaniose

Leishmaniose é uma protozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* que está entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (LESSA *et al.*, 2007). Os reservatórios geralmente são pequenos roedores e outros mamíferos, e os parasitos são transmitidos aos humanos através da picada do mosquito fêmea do gênero *Phlebotomus* (CAMARGO, 2008). A leishmaniose apresenta diferentes processos patológicos (de quadros cutâneos a viscerais), em função da proliferação da *Leishmania* nas células do retículo endotelial do hospedeiro que a mesma é capaz de infectar (CAMPILLO e VÁZQUEZ, 2002; DUARTE, 2009).

1.5.1 Epidemiologia

As leishmanioses compõem um conjunto de doenças de importância clínica e epidemiológica. Existem cerca de 20 espécies consideradas

patogênicas para o homem e 30 vetores diferentes capazes de transmitir a doença (DESJEUX, 1996). Os principais agentes causadores da leishmaniose no Velho Mundo são: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, que causam leishmaniose tegumentar, e a *L. donovani* e *L. infantum* que causam leishmaniose visceral. No continente americano, o agente *L. chagasi* é o principal responsável por casos de leishmaniose visceral e as espécies de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guianensis*, *L. panamensis* e *L. mexicana*, são predominantemente responsáveis pela transmissão de leishmaniose tegumentar (GRIMALDI, 1987; LESSA, 2007).

A leishmaniose é considerada endêmica em cerca de 98 países e os principais casos da doença ocorrem nos países da Ásia, África e América Latina, estando associados a isso fatores como condições precárias de habitação, desnutrição, falta de recursos, dentre outros. Estima-se que ocorram a cada ano aproximadamente 200 a 400 mil novos casos de leishmaniose visceral e 700 mil a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2016). A leishmaniose visceral possui grande distribuição geográfica. Ela é considerada uma das formas clínicas mais letais e com maior taxa de incidência, principalmente em populações de indivíduos com sistema imune comprometido (portadores do vírus HIV) e crianças desnutridas (REIMÃO, 2012).

No Brasil, entre a década de 90 e o ano de 2007 foram registrados 561.673 casos, com 2.422 entre o início desse século e o ano de 2010, onde as maiores ocorrências foram registradas no Sudeste e Nordeste. O Nordeste era líder em registro de casos de leishmaniose até a década de 90, onde ocorriam 90% dos casos de leishmaniose visceral. Nos dias atuais, ela ocorre com mais frequência em 20 estados brasileiros com 2,1 casos a cada 100.000 habitantes e 3095 mortes entre 1996 e 2005 (ALVES, 2009; REIMÃO, 2012).

Em 2012, dados mostram que o Brasil teve um aumento no número de casos de leishmaniose visceral, registrando mais de 1000 ocorrências neste ano (**Figura 1**). Ainda em 2012, foram registrados no Brasil aproximadamente mais de 5000 novos casos de leishmaniose cutânea, mostrando que o país ainda está entre os principais na ocorrência de infecções por *leishmania* (**Figura 2**) (OMS, 2013).

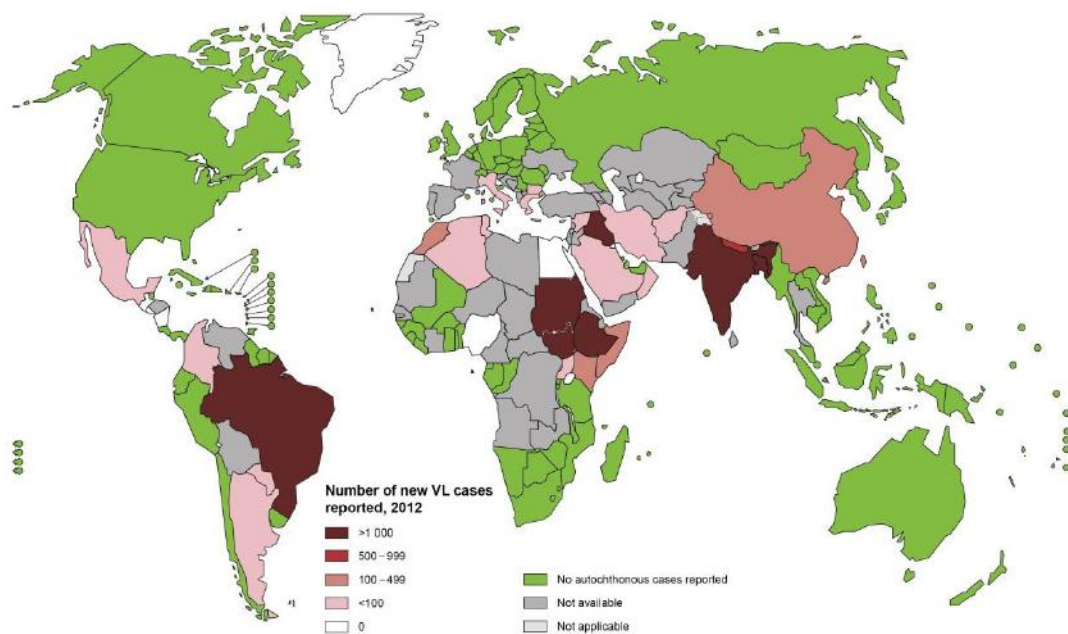


Figura 1: Distribuição mundial da ocorrência de novos casos de leishmaniose visceral no ano 2012. Fonte: OMS, 2013.

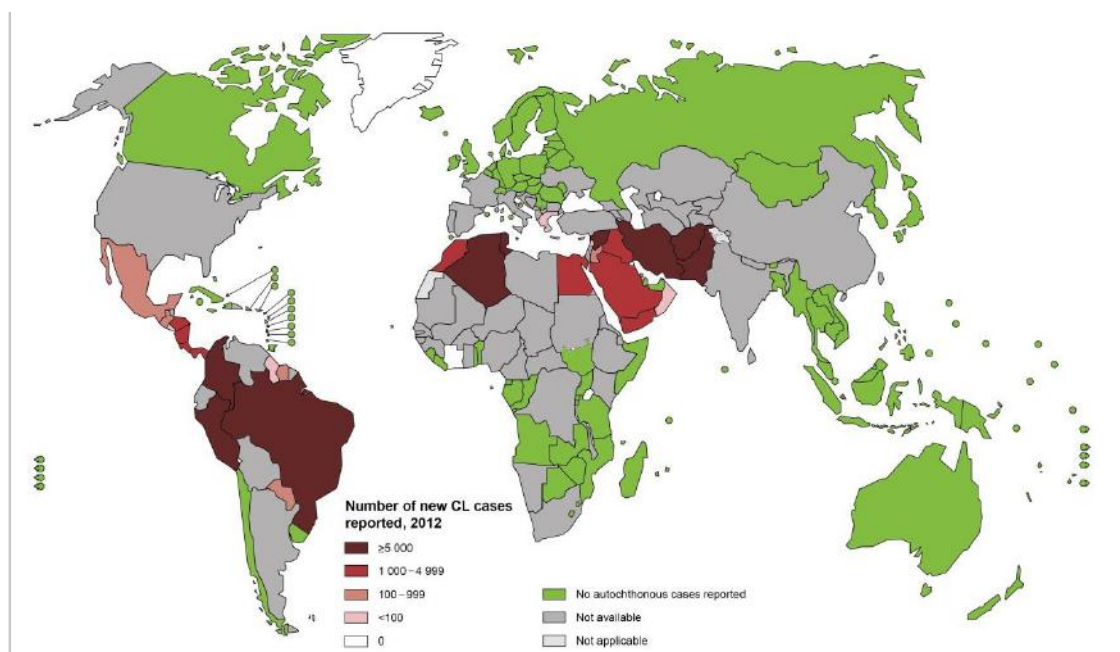


Figura 2: Distribuição mundial da ocorrência de novos casos de leishmaniose cutânea no ano 2012. Fonte: OMS, 2013.

1.5.2 Formas Clínicas

As leishmanioses acometem o homem em 4 formas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose muco-cutânea (LMC) (SILVA-LÓPEZ, 2010).

1.5.2.1 Leishmaniose Cutânea

A LC (**FIGURA 3A**) é caracterizada pelo surgimento de ulcerações de bordos altos na pele do indivíduo de forma localizada. A lesão inicial aparece geralmente de 2 a 8 semanas após a picada do inseto e progride até uma úlcera que pode persistir de meses até anos (PEARSON *et al.*, 1995).

1.5.2.2 Leishmaniose Cutânea Difusa

A LCD (**Figura 3B**) é considerada uma variação da leishmaniose tegumentar americana e aparece em áreas onde a doença é endêmica. Ela é causada principalmente por *L. amazonensis* e se manifesta através de nódulos, que não formam ulcerações. A mucosa nasal não é afetada nesse tipo de infecção (LESSA *et al.*, 2007).

1.5.2.3 Leishmaniose Visceral

A LV (**Figura 3C**) ou Calazar é transmitida principalmente por *L. donovani* na Índia e África, *L. infantum* no Mediterrâneo e *L. chagasi* na América Latina. Nessa variação de leishmaniose, o indivíduo infectado pode apresentar o envolvimento generalizado do sistema retículo endotelial. A forma clássica se caracteriza por sinais e sintomas de doença crônica persistente como hepatoesplenomegalia, perda de peso, fadiga e febre. Em alguns casos os indivíduos acometidos podem apresentar quadros assintomáticos ou infecções leves, sem necessidade de tratamento (WILSON, 2005). Em outros casos podem surgir lesões crônicas na pele, após a melhora do quadro de LV, se apresentando como pápulas ao redor da boca podendo se espalhar pelo

corpo. Esta é denominada como cutânea pós-calazar (LDPK). (CALDAS *et al.*, 2001).

1.5.2.4 Leishmaniose Muco-Cutânea

A LMC (**Figura 3D**) é uma forma de leishmaniose tegumentar associada com a *L. braziliensis*, *L. panamensis* e menos frequentemente com a *L. amazonensis*. É caracterizada por afetar regiões de mucosa, podendo desenvolver lesões mutilantes. Um fator que pode contribuir para o surgimento de uma lesão do tipo tissular na leishmaniose mucosa é o sistema imune do indivíduo acometido e também características do parasito. A mucosa nasal é o principal local atingido, porém locais como faringe, laringe e mucosa nasal também podem ser contaminadas pelo parasito (LESSA *et al.*, 2007).



Figura 3: Manifestações clínicas das diferentes formas de leishmaniose: leishmaniose cutânea (A), leishmaniose cutânea difusa (B), leishmaniose visceral (C) e leishmaniose mucocutânea (D). Fonte: PEARSON *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 2005.

1.5.3 Ciclo Parasitário

A transmissão da leishmaniose ocorre quando fêmeas da família Psychodidae dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* ao fazerem repasto sanguíneo inoculam no hospedeiro mamífero as formas promastigotas metacíclicas infectantes. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos, e no interior do vacúolo parasitóforo se transformam em formas amastigotas. As amastigotas se multiplicam por divisão binária até o macrófago se romper e liberar o parasito no meio extracelular, onde as amastigotas infectam células adjacentes. O ciclo tem sua continuidade quando um novo repasto sanguíneo acontece, e neste o vetor adquire células infectadas com formas amastigotas, que no inseto se transformam novamente em formas promastigotas (VOLF *et al.*, 2008). A **Figura 4**, a seguir, ilustra o ciclo de transmissão da leishmaniose.

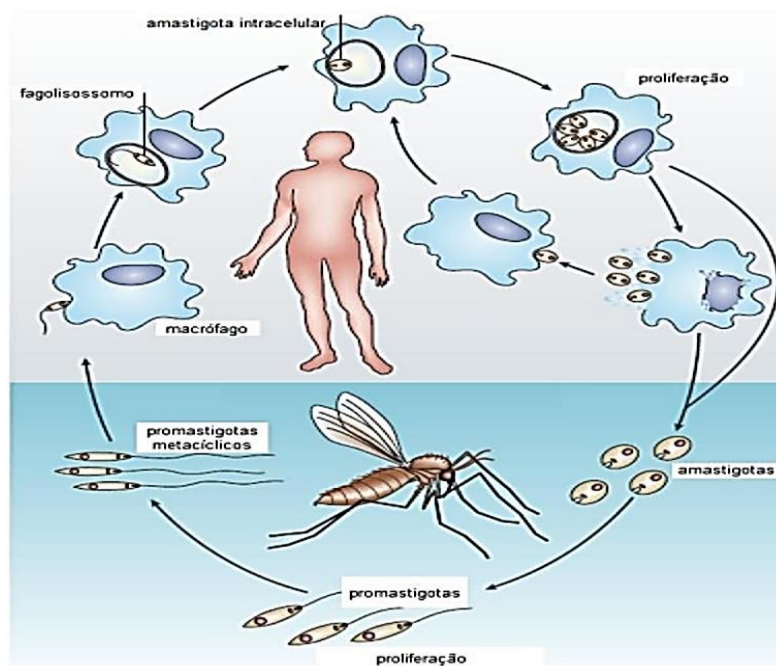


Figura 4: Ciclo parasitário da *Leishmania*. Fonte: CHAPPUIS *et al.*, 2007; REIMÃO, 2012.

1.5.4 Tratamento das Leishmanioses

Os medicamentos de primeira escolha designados para o tratamento de infecção por leishmaniose incluem os antimoniais. Em casos de resistência, ou dependendo do grau de infecção, são utilizados os medicamentos de segunda

escolha, onde os principais incluem a anfotericina B e o isotionato de pentamidina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; NEVES *et al.*, 2011).

Os antimoniais têm como indicação principal a leishmaniose visceral e cutânea, sendo utilizados desde o início do século passado. Além de possuir efeitos adversos muito intensos como mialgia, arritmia, cardiotoxicidade, pancreatite, por exemplo, a administração do antimonial é de difícil adesão pelo paciente por ser pela via intramuscular (SUNDAR *et al.*, 2007; SILVA-LÓPEZ, 2010). Os medicamentos disponíveis na clínica (**Figura 5**) são administrados aos pacientes por via intravenosa ou intramuscular, o que contribui para a baixa adesão ao tratamento (MOORE e LOCKWOOD, 2010; REIMÃO, 2012)

Além da anfotericina B e da pentamidina, outros medicamentos são utilizados como segunda escolha, dentre eles a miltefosina (utilizada em países como a Índia e o Sudão) e paramomicina. Porém, a anfotericina B é a que possui um maior espectro de ação com atividade leishmanicida e antifúngica, pois interage com o ergosterol do parasito, alterando a permeabilidade de sua membrana (BRAY *et al.*, 2003; SILVA-LÓPEZ, 2010).

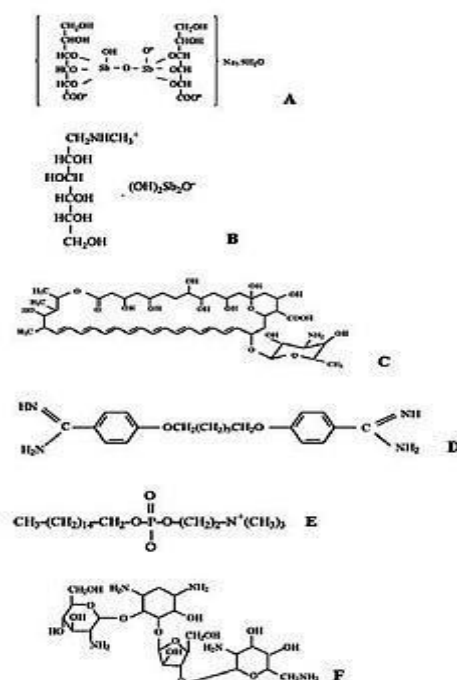


Figura 5: Estrutura dos principais fármacos no tratamento das leishmanioses. Estiboglunonato de sódio (Pentostam®) (A), Antimoniato de meglumina (Glucantime®) (B), Anfotericina B (Fungizone®) (C), Isotionato de pentamidina (Lomidina®) (D), Miltefosina (E) e Paramomicina (F) (RATH, e TRIVELIN, 2003; SILVA-LÓPEZ, 2010).

1.5.5 Alternativas Fitoterápicas para o Tratamento das Leishmanioses

A busca de novos produtos naturais tem impulsionado a pesquisa visando à descoberta de novos agentes para o tratamento de várias doenças. (PRESCOTT *et al.*, 2002). Sabendo disto, a pesquisa na busca de novos fármacos tem voltado atenção aos produtos naturais a fim de descobrir e elucidar substâncias que venham ter atividade farmacológica (PINTO *et al.*, 2002).

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas por pelo menos um período de seu ciclo de vida e são isolados de órgãos e tecidos saudáveis. São obtidos após esterilização superficial de várias partes do vegetal, como folhas, ramos e raízes. Esses micro-organismos vivem em simbiose com a planta hospedeira sem causar dano aparente ao mesmo (SCHULZ e BOYLE, 2005).

Existe pouca informação descrita sobre a influência dos fungos endofíticos em plantas, e também quanto a sua base biológica. Isso se torna um fator importante para a investigação da contribuição/benefício destes em relação às plantas (SCHULZ e BOYLE, 2005).

1.5.6 Medicamentos Homeopáticos usados para Leishmaniose

Em busca de alternativas para o tratamento de leishmaniose, já foram descritos na literatura experimentos demonstrando a ação de medicamentos homeopáticos em doenças parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2005; SMIT *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2011). Um dos medicamentos homeopáticos descritos é a Timulina, que tem ação bastante ampla no sistema imune, em várias espécies. Outro medicamento é o Antimonium crudum, que ocasiona no indivíduo sadio fraqueza, erupções crostosas, espessas e duras na pele, onicogribose, entre outros, que são sintomas vistos em pessoas infectadas (DUJANY, 1995).

O medicamento Canova® (que é o conjunto dos medicamentos Aconitum napellus 11 DH, Arsenicum album 19 DH, Bryonia alba 18 DH, Lachesis muta 18 DH e Thuya occidentalis 19 DH) tem efeito anti-inflamatório conhecido em infecções por *Leishmania amazonensis* (PEREIRA *et al.*, 2005).

1.6 Uso de medicamentos alopáticos manipulados homeopaticamente

O efeito rebote dos medicamentos alopáticos que se baseiam na cura da doença e alívio dos sintomas através de uma substância contrária ao que esteja causando a enfermidade, poderia ser empregado segundo o modelo homeopático, estimulando reações homeostáticas favoráveis, como por exemplo, um anticoncepcional capaz de promover a ovulação e concepção rebote em mulheres com esterilidade funcional (TEIXEIRA, 2003; TEIXEIRA 2005; TEIXEIRA 2011).

Pesquisas mostram que uma solução concentrada de uma substância denominada Causticum possui relevante poder inflamatório. Essa mesma substância inflamatória preparada nas potências de 6CH, 12CH, 30CH e 200CH foi capaz de demonstrar diminuição da inflamação. Essa pesquisa mostra o efeito do princípio da semelhança promovido pelo uso de uma diluição homeopática (NETO *et al.*, 2004).

1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica analítica empregada na separação de substâncias em mistura, com base nas diferenças das velocidades de migração dessas em função das afinidades pelas fases móvel e estacionária (COLLINS *et al.*, 1995).

Nas separações por CLAE, a amostra é transportada pela fase móvel líquida através da fase estacionária, sólida. As duas fases são selecionadas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as mesmas (HOLLER *et al.*, 2009).

A CLAE, quando acoplada a um detector, tem capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas. Além disso, possibilita a separação de um grande número de substâncias presentes em vários tipos de amostras (COLLINS *et al.*, 1995).

Nas análises por CLAE as substâncias com maior afinidade pela fase estacionária movem-se mais lentamente, enquanto que as substâncias que tem pouca afinidade por esta fase se movem mais rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma, que é um gráfico que relaciona intensidade do sinal do detector em função do tempo de análise (CRQ, 2010).

O mecanismo de separação mais empregado em CLAE consiste na cromatografia líquida em fase ligada. Neste tipo de CLAE, substituintes polares ou apolares são ligados ao suporte de sílica da fase estacionária. Quando grupos polares, como amina, diol e ciano são ligados a sílica e a fase móvel é menos polar (mistura de hexano e álcoois) que a estacionária temos o mecanismo de fase normal (SIMPSON & WELLS, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001). Por sua vez, quando o ligante da sílica é um grupamento apolar, frequentemente octadecilsilano (C₁₈), e a fase móvel é mais polar que a fase estacionária (misturas de água e metanol e/ou acetonitrila), temos o mecanismo de fase reversa (HARRIS, 2005), que foi empregado neste estudo. Nesse tipo de separação, a retenção é controlada pela hidrofobicidade do soluto (analito). Quanto maior for a polaridade dos analitos em estudo, maior será sua afinidade pela fase móvel polar e menor o tempo de retenção. Solutos apolares vão possuir comportamento inverso (GARCIA, 2011).

Na CLAE, a eluição pode ser conduzida em dois modos: isocrático, onde a proporção dos solventes da fase móvel permanece constante ao longo de toda a análise, ou gradiente (usado neste estudo), onde a proporção dos solventes da fase móvel é alterada ao longo da análise (SKOOG *et al.*, 2002). A separação por gradiente é geralmente empregada na separação de misturas complexas de substâncias como é o caso de substâncias em extratos vegetais e de micro-organismos, pois apresenta como vantagens a redução do tempo de análise, aumento da resolução por gerar picos mais eficientes e simétricos (SKOOG *et al.*, 2002; CECCHI, 2003). Mas também apresenta algumas desvantagens como o aumento do custo, já que necessita de bomba de gradiente quaternário com misturador; não ser compatível com todos os detectores, como por exemplo, com o detector de índice de refração e apresentar menor estabilidade da linha de base pela variação da fase móvel (CECCHI, 2003).

1.8 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é um procedimento necessário para demonstrar que o método é adequado para a intenção pretendida, ou seja, a determinação quantitativa, semi-quantitativa e/ou qualitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. O método será considerado

validado, desde que sejam avaliados os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, 2003).

A especificidade e seletividade avaliam a capacidade do método em medir exatamente um composto na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para métodos cromatográficos é importante demonstrar que não existem picos com o mesmo tempo de retenção dos analitos. (ANVISA, 2003).

A linearidade é definida pela capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

A precisão é definida pela avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso da CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e pela equação: $LD = DP_a \times 3/IC$; onde DP_a é o desvio padrão dos coeficientes lineares de no mínimo três curvas de calibração e IC é a média do coeficiente angular de no mínimo três curvas de calibração (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação é dito como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Esse parâmetro é utilizado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. Ele é estabelecido por meio de análise de soluções com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação: $LD = DP_a \times 10/IC$ (ANVISA, 2003).

A exatidão de um método analítico é dita como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece quatro categorias de métodos analíticos (**Quadro 1**) e determina os testes que devem ser avaliados para cada categoria (**Quadro 2**) (ANVISA, 2003). Sendo os métodos de identificação classificados como categoria IV, os quais requerem somente a avaliação do parâmetro de validação especificidade.

Quadro 1: Classificação dos testes segundo a finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

Quadro 2: Ensaios necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetros	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão					
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	**	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	*	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão.

Neste trabalho, além do parâmetro especificidade, a fim de conhecer a detectabilidade do método foram também avaliados os parâmetros linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

1.9 ESTADO DA ARTE

Nosso grupo têm estudado a atividade anti-*Leishmania* do extrato de fungo endofítico HB12b2 extraído da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba em Macaé, Rio de Janeiro. Vimos que o extrato possui boa atividade *in vitro* anti-promastigota e antiamastigota de *Leishmania amazonensis* cepa Josefa, mas em concentrações mais altas, o extrato é tóxico para macrófagos, a principal célula alvo da *Leishmania*.

2 JUSTIFICATIVA

Os medicamentos atualmente utilizados no tratamento das leishmanioses levam a efeitos adversos graves e indesejáveis, e produtos naturais têm sido estudados como potenciais fontes de novos medicamentos anti-leishmania. Nossos estudos anti-leishmania do extrato de fungo endofítico HB12b2 demonstraram que em concentrações mais altas o extrato foi tóxico para macrófagos. A homeopatia possui como um de seus pilares o uso de doses infinitesimais, onde diluições seguidas de sucussões fortes são utilizadas para potencializar a força medicamentosa e diminuir efeitos colaterais. Dessa forma, o uso da Farmacotécnica Homeopática para diminuir a toxidez do extrato HB12b2 pode ser uma alternativa eficaz para seu uso no tratamento da leishmaniose com um maior índice terapêutico, além da formulação ser manipulada para administração por via oral, que poderia aumentar a adesão dos pacientes à terapia.

3 OBJETIVO

Avaliar se o extrato de fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba/Macaé, que apresentou promissora ação anti-*Leishmania in vitro* com baixo índice terapêutico, mantém a sua atividade anti-*Leishmania* na forma de medicamento homeopático.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Avaliar a ação anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/75/Josefa do HB12b2 B 10 e 30 CH utilizando como veículo etanol 30%.

3.1.2 Avaliar a ação anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* cepa MPRO/BR/72/M1845 (LV78) do HB12b2 30 CH utilizando como veículo etanol 30% e água destilada.

3.1.3 Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para possível identificação de componentes majoritários do extrato do fungo endofítico HB12b2 nos medicamentos homeopáticos manipulados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parasitos

Foram utilizadas as cepas MHOM/BR/75/Josefa (Josefa) e MPRO/BR/72/M 1845 (LV78) de *Leishmania amazonensis* isolada de lesões de camundongos, mantida em cultura sob a forma promastigota a 26 °C em meio 199 (Sigma) Schneider com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (HIFCS), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e periodicamente selecionada em geneticina (1000 µg/mL). Os parasitos foram utilizados na fase estacionária da cultura.

4.2 Amostras

- HB12b2 10 µg/mL em meio 199;
- HB12b2 10 µg/mL em H₂O;
- HB12b2 10 µg/mL em EtOH 30%;
- HB12b2 30 CH em H₂O;
- HB12b2 30 CH em EtOH 30%;
- HB12b2 10 CH em EtOH 30%;
- Anfotericina B 3 µM em meio 199;
- Anfotericina B 3 µM em EtOH 30%;
- Antimonium crudum 30 CH em EtOH 30%;
- Antimonium crudum 10 CH em EtOH 30%;

4.3 Controles

- H₂O ultrapura 30 CH;
- H₂O ultrapura;
- EtOH 30% 30 CH;
- EtOH 30%

4.4 Atividade Anti Promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* ($2 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ poço) em meio 199 (Cultilab) foram plaqueadas em placa de 96 poços com as amostras descritas no item 4.2 e 4.3, deixando-os incubados com 48 horas a 26°C . Para os medicamentos homeopáticos foi utilizada uma dose de 10% do volume do poço ($20 \mu\text{L}$ em $200 \mu\text{L}$). A viabilidade dos promastigotas foi analisada por contagem de promastigotas em microscópio ótico ou avaliação de respiração celular através de ensaio fluorimétrico de Alamar blue.

4.4.1 Extrato Bruto do Fungo Endofítico HB12b2

O extrato bruto do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba/Macaé, foi obtido através de cultivo em meio de crescimento contendo arroz, por colaboração com a professora Denise Guimarães, fornecido na forma de extrato bruto seco (5 mg e 10 mg) e reconstituído para uso em DMSO. A concentração de IC_{50} anti-promastigota do extrato HB12b2 é de $10 \mu\text{g/mL}$, tendo sido avaliada por nosso grupo anteriormente.

4.4.1.1 Manipulação dos Medicamentos Homeopáticos

Os medicamentos foram preparados na escala centesimal (1:100) (Centesimal Hahnemanniana). Resumidamente, $50 \mu\text{L}$ do extrato HB12b2 em estoque (DMSO) foram acrescentados em $4,95 \text{ mL}$ de etanol 70% (alcoólatura utilizada na Farmacotécnica Homeopática para estoque e passagem de potências) em frasco âmbar de 10 mL aplicando 100 sucussões (1 dinamização) para obtenção da potência 1 CH. Depois, foram transferidos $50 \mu\text{L}$ do HB12b2 1 CH a outro frasco âmbar de 10 mL contendo $4,95 \text{ mL}$ de etanol 70 % aplicando 100 sucussões para obter a potência de 2 CH. Esse procedimento foi repetido até a obtenção da potência 9 e 29 CH. Para

obtenção da 10 e 30 CH, foram utilizados 50 µL da 9 e 29 CH, respectivamente, e 4,95 mL de etanol 30% (alcoólatura de dispensação do medicamento) ou água destilada (veículo de dispensação da forma farmacêutica Dose Única) em frasco de 10 mL aplicando 100 succussões. Antes do uso no ensaio biológico, todos os medicamentos homeopáticos e controles foram filtrados utilizando filtro de seringa de 22 µm. O mesmo procedimento aplicado aos medicamentos foi feito para os controles de H₂O 30 CH e Etanol 30% CH.

4.5 Análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos

4.5.1 Materiais

4.5.1.1 Reagentes e solventes

O metanol usado na preparação da fase móvel foi adquirido da Tedia (Fairfield, OH, EUA). A água ultrapura foi obtida do equipamento ELGA (High Wycombe, Inglaterra).

4.5.1.2 Referência química

Neste estudo foi empregada como referência química o extrato etanólico de fungo endofítico HB12b2 incubado em meio de crescimento de arroz. O fungo HB12b2 foi isolado como endofítico da planta *Humiria balsamifera*, coletada na restinga de Jurubatiba no Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro

A solução estoque do extrato HB12b2 foi preparada em DMSO, na concentração de 1 mg/mL. As soluções empregadas na validação do método foram preparadas a partir desta nas concentrações de 20; 10,0; 5; 2,5; 1,25; 0,625, 0,3125 e 0,15625 µg/mL, usando como solvente a mistura de H₂O: MetOH (50:50).

4.5.1.3 Coluna cromatográfica

As análises foram realizadas por fase reversa empregando uma coluna Synergi Fusion RP 18 (150 x 4,6 mm e partícula de 4 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

4.5.1.4 Equipamentos

4.5.1.4.1 Sistema Cromatográfico

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba de gradiente quaternário LC-20AT, um auto injetor modelo SIL-10AF, um detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, uma controladora modelo CBM-20A, forno modelo CTO-20A, um desgaseificador, modelo DGU-020A₅ (Shimadzu, Kyoto, Japão) e um sistema de aquisição de dados com software LCsolution® versão 1.25 SP1.

4.5.2 Métodos

4.5.2.1 Avaliação da coluna cromatográfica

A análise cromatográfica do extrato HB12b2 foi avaliada à temperatura de 35 °C. Alíquotas de 50 µL da solução estoque de HB12b2 na concentração de 1 mg/mL preparadas em DMSO foram cromatografadas.

A coluna avaliada para a análise cromatográfica do extrato HB12b2 foi a Synergi Fusion RP 18 por fase reversa, empregando no modo gradiente de eluição, devido a complexidade do extrato, com diferentes proporções de metanol e água ultrapura.

4.5.2.2 Validação do método para determinação do marcador do extrato Hb12b2

A validação de métodos exige o emprego de padrões de referência farmacopeicos ou certificados (ANVISA, 2003). Neste trabalho foi empregado um extrato, cujos constituintes não foram identificados, impossibilitando a busca e a aquisição do marcador do extrato. Dessa forma, para avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, foi selecionado o pico cromatográfico, presente no extrato HB12b2, que apresentou a maior absorção no ultravioleta. Este critério foi adotado no sentido de maximizar a detectabilidade do método, ou seja, possibilitar a obtenção de limites de detecção e quantificação o mais baixos possíveis. Para tanto, foi cromatografada a amostra do extrato HB12b2 na concentração de 1 mg/mL e definiu-se o pico com tempo de retenção de 3,8 min, como sendo o pico marcador

4.5.2.2.1 Parâmetros avaliados na validação do método

O método foi validado conforme recomendações de guia oficial da ANVISA (2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção e especificidade.

4.5.2.2.1.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção de três curvas de calibração nas concentrações de 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL.

4.5.2.2.1.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado usando a seguinte equação: $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão dos coeficientes lineares de no

mínimo três curvas de calibração e IC é a média do coeficiente angular de no mínimo três curvas de calibração (ANVISA, 2003).

4.5.2.2.1.3 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado utilizando a seguinte equação: $LD = DP_a \times 10/IC$ (ANVISA, 2003).

4.5.2.2.1.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada pela análise cromatográfica dos veículos empregados no preparo dos medicamentos homeopáticos, etanol 30% (v/v) e água destilada. O cromatogramas gerados para os veículos foram comparados ao cromatograma do extrato preparado na concentração de 5 µg/mL, a fim de verificar a presença de picos interferentes no veículo com o mesmo tempo de retenção do pico marcador.

4.5.2.2 Análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos

A análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos: HB12b2 30 CH em EtOH 30%, HB12b2 30 CH em H₂O; H₂O ultrapura 30 CH e EtOH 30% 30 CH, bem como a solução do extrato HB12b2 na concentração de 5 µg/mL foram conduzidas empregando o método cromatográfico desenvolvido e a presença do pico cromatográfico referente ao marcador do extrato HB12b2 foi avaliada.

4.6 Análise Estatística

Para análise estatística comparativa da atividade entre as amostras, foi utilizado ANOVA ONE WAY (análise de variância) e posteriormente o teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* Josefa dos medicamentos HB12b2 10 CH e 30 CH

A atividade anti-*Leishmania* do extrato de fungo endofítico HB12b2 manipulado de forma homeopática nas potências 10 CH e 30 CH em EtOH 30% (veículo de dispensação na clínica) foi avaliada inicialmente na cepa Josefa de *Leishmania amazonensis*. Essa cepa foi escolhida por já ser modelo de trabalho do nosso grupo em pesquisas de leishmaniose cutânea.

Os parasitos foram tratados durante 48 horas/26° C com os medicamentos homeopáticos (10% medicamento (20 µL) / volume final do poço (200 µL)) ou Anfotericina B (3 µM). De acordo com o princípio de similitude proposto por Hahnemann, ao administrar em indivíduos enfermos substâncias que causaram sintomas semelhantes em indivíduos sadios, há a estimulação da reação de homeostase do organismo, fazendo com que o corpo reaja contra os próprios sintomas (TEIXEIRA, 2006) foi escolhido como controle homeopático para leishmaniose o Antimonium crudum, medicamento utilizado na clínica. O número de parasitos foi avaliado através de ensaio fluorimétrico com corante fluorescente Alamar blue (**Figura 6**).

Vimos que o HB12b2 10 CH e 30 CH inibiram o crescimento das promastigotas de forma semelhante ao controle positivo Anfotericina B e Antimonium crudum. No entanto o veículo EtOH 30% apresentou taxa de inibição igualmente alta em relação aos controles positivos, demonstrando que o veículo apresentou toxidez à *Leishmania*.

Apesar de nosso resultado demonstrar que o efeito anti-promastigota do HB12b2 10 CH e 30 CH em EtOH 30% foi devido a toxidez do veículo, já é descrito na literatura protocolos utilizando modelos anti-promastigotas para avaliação da atividade anti-*Leishmania* de medicamentos homeopáticos. Um estudo analisou a atividade anti-promastigota de um bioterápico homeopático obtido de promastigotas de *L. brasiliensis*, dinamizado nas potências de 30 CH, 200 CH, 30 DH e 200 DH. Os medicamentos foram preparados até as potências 3 CH e 6 DH utilizando NaCl 0,9% como insumo inerte, já que este era o solvente presente na solução mãe; para as potências intermediárias utilizou-se EtOH 70% a fim de estocagem e EtOH 30% para as potências

usuais. As formas promastigotas foram cultivadas em meio axênico (Liver Infusion Tiptose – LIT), na concentração de 10^6 formas do parasita/mL. O ensaio foi realizado em triplicata com placa de microtitulação, adicionando os bioterápicos para reagirem em um período de incubação de 24 horas a 23° C. Os resultados mostraram que na potência de 200 CH houve uma porcentagem de lise de 60% de promastigotas, quando comparada ao controle. Houve uma pequena variação em relação à atividade das demais potências, mas todas apresentaram valores um pouco acima de 50% para lise celular. Não foi possível estabelecer uma relação com o controle positivo de Anfotericina B, pois não existe a possibilidade de determinar uma concentração em relação ao bioterápico; foi utilizado o controle negativo de NaCl a 0,9%, que não apresentou lise celular. O estudo salienta que o veículo utilizado nas preparações dos ensaios *in vitro* em relação ao bioterápico não foi o mesmo estabelecido pela Farmacopéia Homeopática (EtOH 30%), pois ele poderia alterar os resultados, já que induz por si só a lise celular. Porém, o estudo afirma que a força medicamentosa apresentada pelo bioterápico não corresponde a uma dependência direta do efeito terapêutico (PONTIN, 2003).

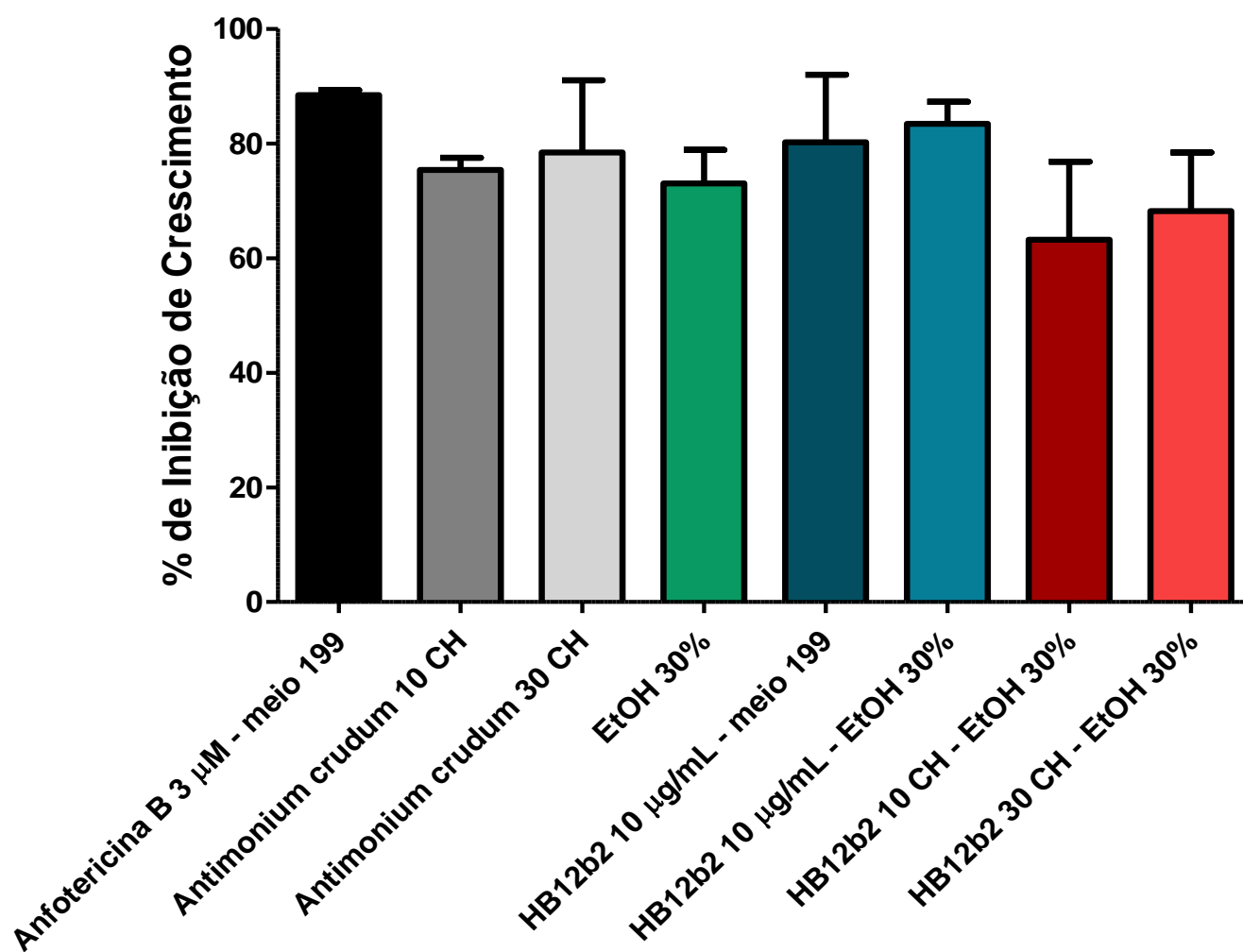


Figura 6: Teste da atividade anti-promastigota do extrato de fungo endofítico HB12b2 10 e 30 CH manipulados em etanol 30%. Promastigotas (2×10^5 /poço) foram tratadas por 48 horas/26° C com os medicamentos homeopáticos (20 µL / 200 µL poço) e controles nas concentrações indicadas, % de inibição do crescimento foi avaliado ensaio fluorimétrico com Alamar blue. Média ± DP.

5.2 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* JV78 do medicamento HB12b2 30 CH

No ensaio anti-promastigota com a cepa Josefa de *L. amazonensis* vimos que o veículo EtOH 30% foi tóxico para a *Leishmania* e que não houve diferença entre as potências 10 CH e 30 CH do Antimonium crudum e HB12b2. Então, avaliamos o efeito do HB12b2 30 CH em outra cepa de *L. amazonensis*, a LV78, para verificar se a toxidez do EtOH 30% era específica para a cepa Josefa. Também utilizamos como veículo, além do EtOH 30% (**Figura 7**), a H₂O destilada (**Figura 8**).

A atividade inibitória do Hb12b2 30 CH em EtOH 30% no ensaio anti-promastigota *in vitro*, mostrou que o medicamento foi mais eficaz na inibição do crescimento das promastigotas LV78 que o HB12b2 controle. Porém, essa atividade possivelmente ocorreu por toxidez ao EtOH 30%, similar ao resultado visto para a cepa Josefa. Surpreendentemente, o EtOH 30% 30 CH apresentou uma atividade de inibição do crescimento da *Leishmania* significativamente maior que o veículo não dinamizado (**Figura 8**). A literatura aponta estudos que, assim como o nosso, utilizaram o EtOH 30% como veículo. Pesquisadores analisaram o efeito homeopático de *Arnica montana* preparada em diferentes escalas em EtOH 30% no tratamento de estresse oxidativo e também a função mitocondrial, comparado com controles. Os estudos *in vitro* demonstraram que o EtOH 30% dinamizado teve pouco efeito nas mitocôndrias, diferente das amostras de *Arnica montana* (CAMARGO, et al., 2013). Como já mencionado, em contraste a esse resultado, nosso estudo demonstrou que a dinamização potencializou a atividade do EtOH 30%, e que a presença do HB12b2 diminuiu essa potencialização, uma vez que o HB12b2 30 CH foi menos ativo que o EtOH 30% 30 CH (controle).

Na Farmacotécnica Homeopática, o veículo de dispensação do medicamento é o EtOH 30%, mas para dispensação da forma farmacêutica Dose Única, utiliza-se H₂O destilada ou EtOH 5%, conforme a Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição. Para verificar se o uso da água como veículo poderia diminuir a toxidez induzida pelo EtOH 30% no tratamento das promastigotas, o HB12b2 30CH e os controles foram manipulados em água destilada (**Figura 8**). As amostras em veículo H₂O apresentaram 50% de

inibição de crescimento de promastigotas, mas novamente, como o resultado do EtOH 30%, o veículo induziu toxidez. Em busca de modelos que trouxessem protocolos similares que utilizassem água purificada como veículo para preparos homeopáticos e análise de sua atividade, bem como uma possível toxidez induzida pela presença do solvente, foram realizadas buscas utilizando palavras chaves relacionadas ao modelo descrito acima. Um estudo publicado em 2013 avaliou a atividade de um bioterápico desenvolvido a partir do vírus influenza A (A/Aichi/2/68 H3N2) e sua resposta *in vitro*. Este bioterápico foi preparado a partir de uma solução suspensa do vírus na proporção de 10,240 HAU/ 25 µL diluída em 0,9 mL de água destilada estéril para fazer a primeira dinamização na escala decimal (1:10) e obter a 1 DH. Este processo foi repetido até chegar a potência 30 DH (Influenzinum RC 30dH (Inf RC)). Os controles do bioterápico foram similares ao nosso estudo, utilizando água dinamizada até a potência 30DH sem adição do vírus e água destilada estéril sem dinamização. Os efeitos citotóxicos do bioterápico foram avaliados pelo ensaio de vermelho neutro, utilizando Inf RC 10%/v/v. A citotoxicidade dos controles foi avaliada pela mesma metodologia. Ao contrário do que vimos em nosso modelo, o Inf RC não foi citotóxico para as células MDCK utilizadas no ensaio e a incubação dessas células com o bioterápico promoveu uma aceleração dos índices de metabolismo celular, o que foi comprovado por observação diária da cultura de células (SIQUEIRA, *et al.*, 2013).

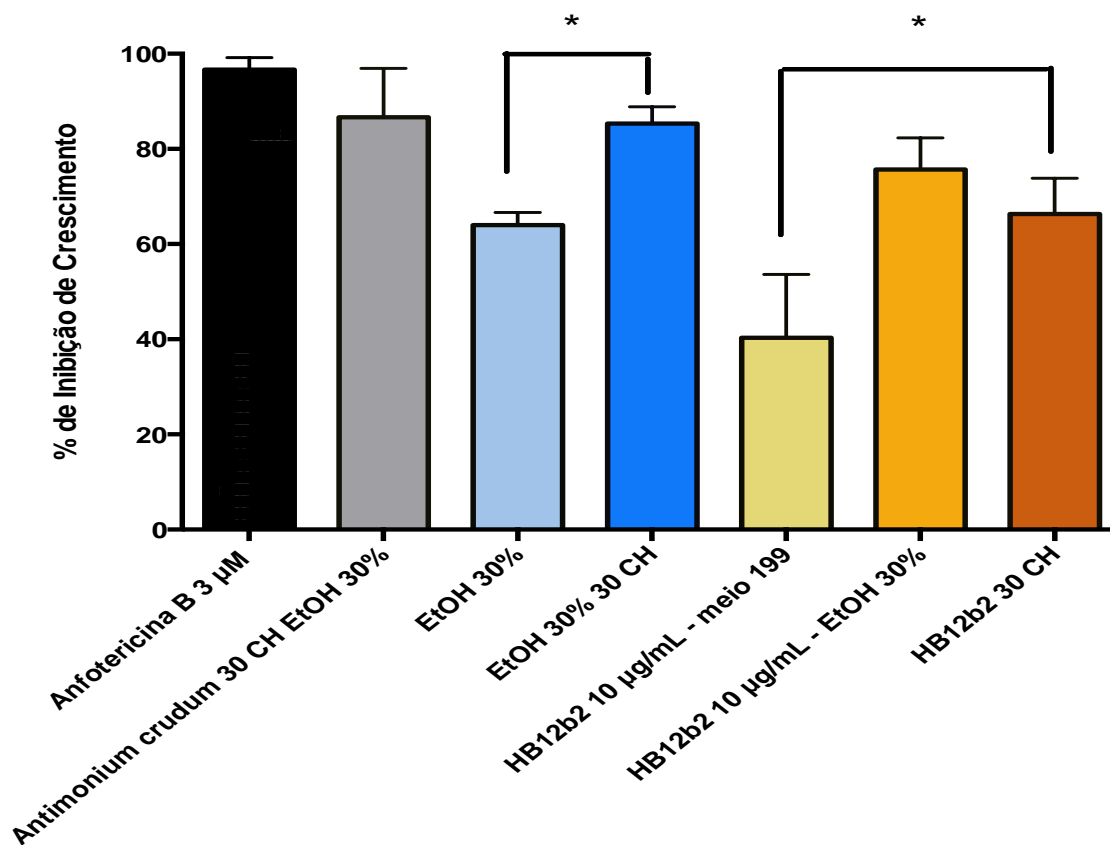


Figura 7: Teste da atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* LV78 do extrato de fungo endofítico HB12b2 30 CH manipulados em etanol 30%. Promastigotas (2×10^5 /poço) foram tratadas por 48 horas/26 °C com os medicamentos homeopáticos (20 µL / 200 µL poço) e controles nas concentrações indicadas. % de inibição do crescimento foi avaliada por contagem de promastigotas em hemocitômetro. Média ± DP.

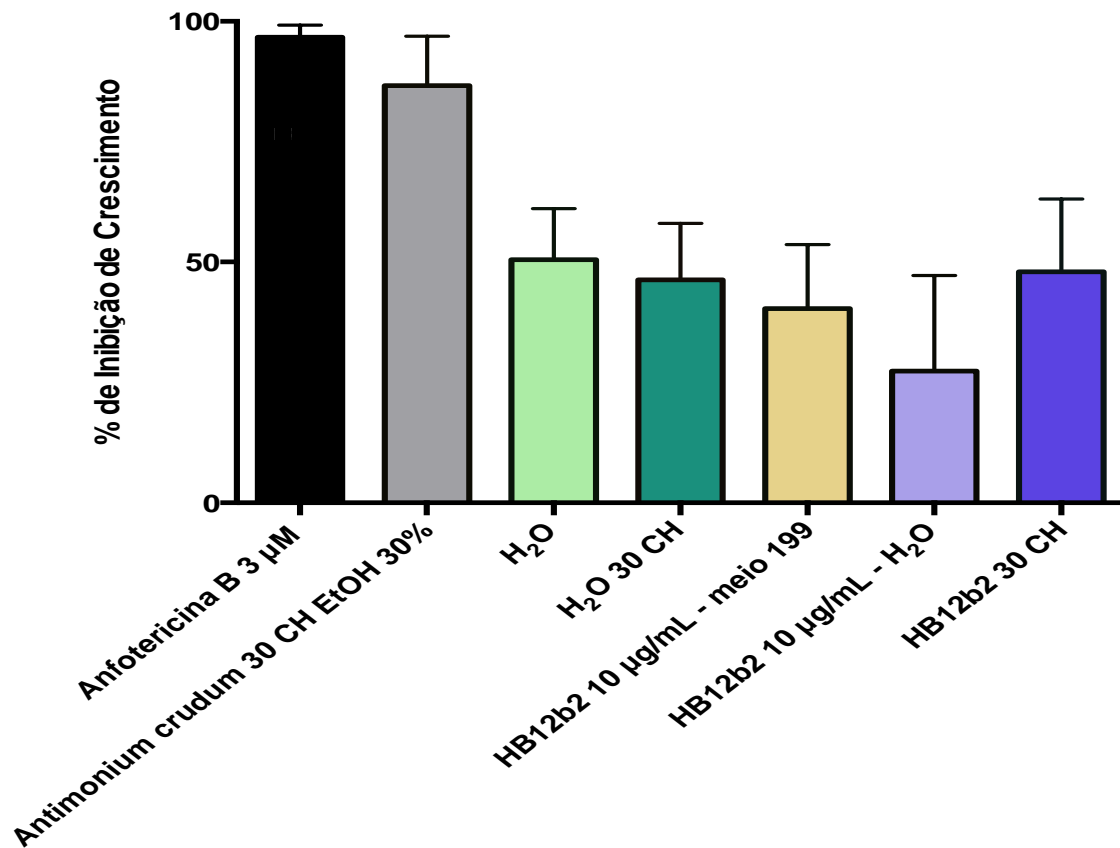


Figura 8: Teste da atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* LV78 do extrato de fungo endofítico HB12b2 30 CH manipulados em água destilada. Promastigotas (2×10^5 /poço) foram tratadas por 48 horas/26 °C com os medicamentos homeopáticos (20 µL / 200 µL poço) e controles nas concentrações indicadas. % de inibição do crescimento foi avaliada por contagem de promastigotas em hemocítômetro. Média ± DP.

5.3 Análise Cromatográfica dos Medicamentos Homeopáticos

Neste trabalho, em virtude da complexidade dos extratos de origem natural, caso do extrato do cultivo do fungo HB12b2 em meio arroz, optou-se por empregar o modo gradiente de eluição buscando o menor tempo de análise associado a suficiente resolução entre os picos. As fases móveis empregadas foram constituídas por diferentes proporções de metanol e água ultrapura.

A condição cromatográfica que permitiu melhor resolução com tempo adequado de análise está apresentada na **Tabela 1**:

Tabela 1: Condições Cromatográficas Otimizadas da Coluna.

Parâmetro	Condição Otimizada
Coluna	Synergi Fusion RP 18 (150 x 4,6 mm e partícula de 4 µm)
Modo de Eluição	Gradiente
Fase Móvel	Metanol (B): Água (A)
Vazão da fase móvel	1 mL/min
Detecção	268 nm (UV)
Volume de injeção	50 µL
Tempo de análise	40 min
Temperatura do forno	35°C

A fase móvel foi eluída no modo gradiente conforme **Tabela 2**:

Tabela 2: Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico.

Tempo	Concentração de Fase Móvel B*
0,01 min	10%
25,00 min	100%
30,00 min	100%
30,01 min**	10%
40,00 min**	10%

* Fase móvel A = água; Fase móvel B = metanol;

** Tempo para reequilíbrio da coluna.

O comprimento de onda selecionado foi 268 nm, pois representa o comprimento de onda de máxima absorção no ultravioleta para o pico com tempo de retenção de 3,8 min (**Figura 9**), empregado como marcador do extrato etanólico do fungo HB12b2.

5.4 Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para identificação do constituinte majoritário do extrato em medicamentos homeopáticos.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi escolhida como técnica analítica na tentativa de se detectar a substância marcadora do extrato nos medicamentos homeopáticos. O método desenvolvido foi validado objetivando a identificação do componente majoritário do extrato, pela avaliação dos parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação.

5.4.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade foram construídas três curvas de calibração na faixa de concentração de 0,156 a 20,0 µg/mL, utilizando para isso a média (n = 3) da área de cada replicata da substância marcadora (pico 3,8 min).

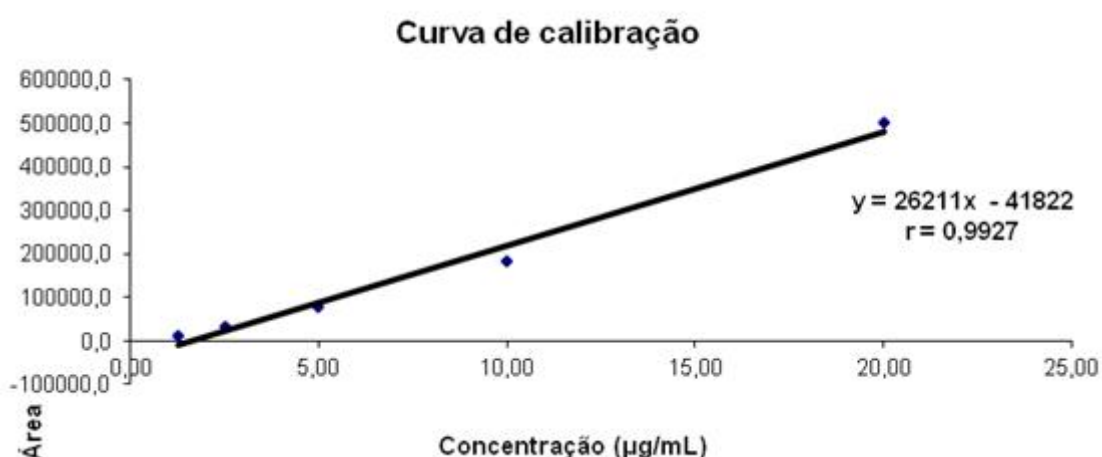


Gráfico 1: Representação gráfica da curva de calibração das diluições seriadas de HB12b2.

Na avaliação da linearidade das curvas de calibração das amostras de HB12b2, os resultados apresentaram correlação linear satisfatória na faixa de concentração de 1,25 a 20 µg/mL (**Gráfico 1**). Nesta faixa de concentração, o coeficiente de correlação linear médio, para as três curvas de calibração analisadas foi de 0,9927, em acordo com o mínimo estabelecido pelo guia de ANVISA que é de 0,99 e com um mínimo de cinco concentrações analisadas

5.4.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método foi calculado conforme a equação 1:

$$1: LQ = DP_a \times 10/IC$$

$$1: LQ = (8591,31 \times 10) / 26245,667 = \mathbf{3,27 \mu g/mL}$$

5.4.3 Limite de Detecção

O limite de detecção do método foi calculado e determinado pela equação 2:

$$2: LD = DP_a \times 3/IC$$

$$2: LD = (8591,31 \times 3) / 26245,667 = \mathbf{0,98 \mu g/mL}$$

A partir dos valores dos limites de quantificação e detecção, não foi possível indentificar a substância marcadora do extrato nos medicamentos homeopáticos.

5.4.4 Especificidade

Na avaliação da especificidade do método foram comparados os cromatogramas das amostras dos veículos etanol 30% (v/v) e água destilada frente ao cromatograma do extrato preparado na concentração de 5 µg/mL. Ao observar a **Figura 9**, verificamos a ausência de picos cromatográficos no veículo com o mesmo tempo de retenção do pico marcador (3,8 min), demonstrando a especificidade do método. O espectro de absorção molecular no UV do pico em 3,8 min, também está representado na **Figura 9**.

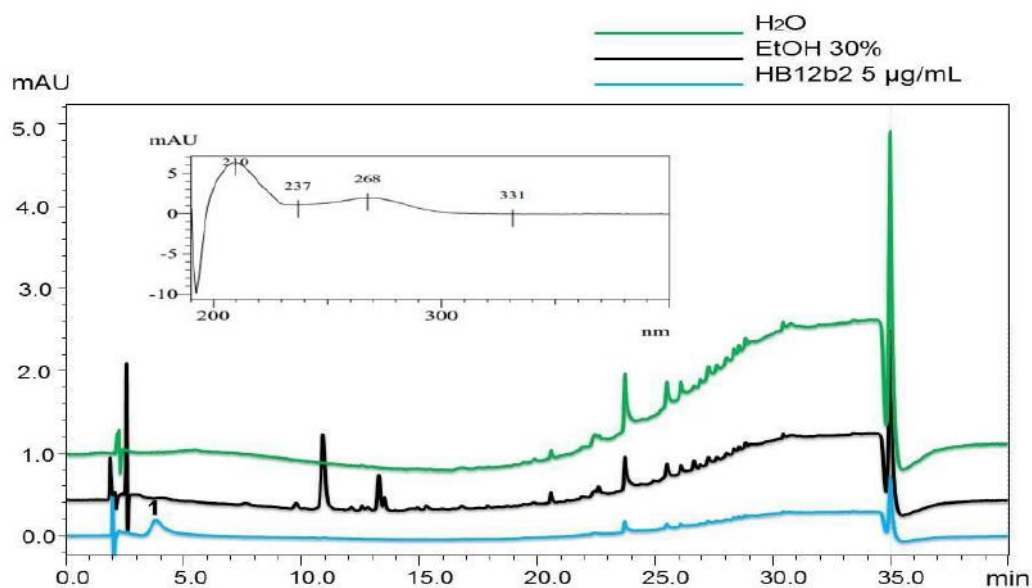


Figura 9: Cromatograma representativo da análise do extrato etanólico do fungo HB12b2 5µg/mL, EtOH 30% e H₂O. (1) pico marcador (3,8 min).

5.5 Análise cromatográfica dos medicamentos homeopáticos

Os medicamentos dinamizados a partir do extrato bruto de HB12b2 foram analisados por CLAE. Na **Figura 10**, somente observamos a presença do pico marcador do extrato (3,8 min) na solução do extrato preparada a 5 µg/mL de maneira alopática. No medicamento homeopático 30 CH preparado a partir do extrato HB12b2 não foi observada a presença do pico marcador, bem como nos medicamentos EtOH 30% 30 CH e H₂O 30 CH.

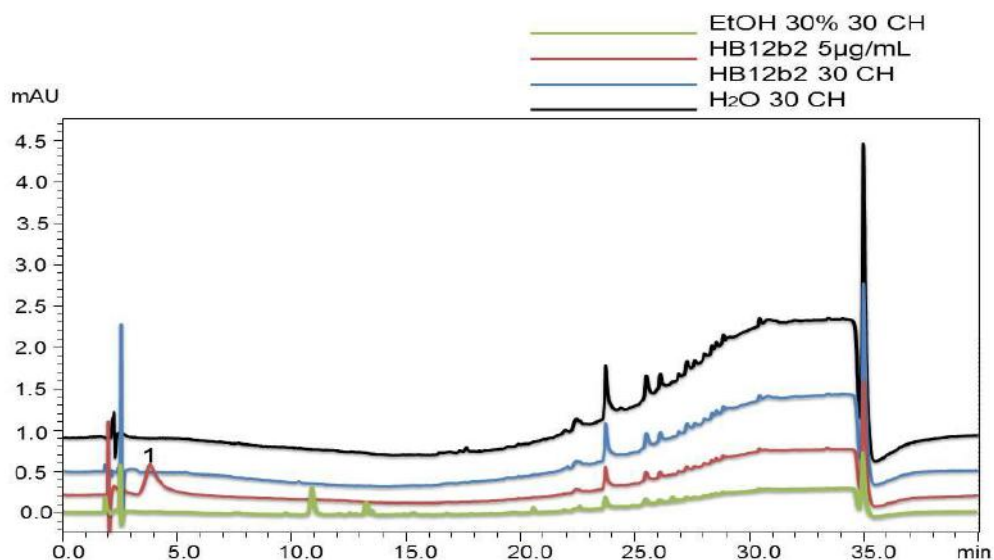


Figura 10: Cromatograma representativo da análise do extrato etanólico do fungo HB12b2 5µg/mL, medicamento homeopático obtido do extrato etanólico do fungo HB12b2 preparado em EtOH 30% 30CH, medicamento homeopático EtOH 30% 30CH e medicamento homeopático H₂O 30 CH. (1) pico marcador (3,8 min).

Após análise dos cromatogramas do medicamento em 30 CH, não foram observados picos diferentes aos dos controles, o que se justifica pelos limites de detecção e quantificação obtidos de 0,98 e 3,27 µg/mL, respectivamente, para o método cromatográfico. Através do princípio da homeopatia que menciona não ser possível detectar moléculas ou átomos da substância original após as potências de 12 CH e 24 DH, pois nestas escalas, o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ átomos) é ultrapassado (TEIXEIRA, 2011). Como perspectiva o uso de detectores mais sensíveis como os espectrômetros de massas poderiam aprimorar a detectabilidade do método.

A CLAE não é um método analítico capaz de identificar/quantificar metais. Em contraste, a literatura demonstra estudos que procuram utilizar técnicas analíticas de alta sensibilidade como a espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma individualmente acoplado (ICP-MS), para identificar a presença de metais em preparos homeopáticos. No estudo de Nogueira e colaboradores, foram utilizadas amostras nas potências entre 3 e 12 CH em busca de quantificar a presença de cobre, utilizando matrizes com bases em

metais. Porém, ambos os métodos utilizados não se mostraram sensíveis o bastante para quantificar/detectar a presença de cobre. Alguns fatores podem ter contribuído para isso, como os preparos diferentes dos medicamentos homeopáticos (variações referentes as escalas, como a matriz sólida (3 CH), matriz líquida em álcool a 20 % contendo 1 % de lactose (4 CH) e outras matrizes líquidas em álcool a 70 % com menor concentração de lactose); o etanol presente nas amostras líquidas que também é um importante interferente nas análises por ICP-OES e ICP-MS, já que pode levar a um resfriamento do plasma; o número de etapas utilizadas para preparo de amostras foi alto em alguns casos, o que aumentou as chances de erro, perda do metal e também contaminação (NOGUEIRA, 2010). Dessa maneira, mesmo empregando detectores mais sensíveis que o ultravioleta, e que em teoria poderiam detectar a presença da substância no medicamentos homeopático, outros fatores como os acima listados podem também interferir na análise, impossibilitando sua identificação.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o medicamento homeopático dinamizado a partir do extrato de fungo endofítico HB12b2 nas potências 10 e 30 CH em EtOH 30% apresentou atividade anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* Josefa, mas essa atividade foi devida a toxidez do veículo etanol 30%.

O medicamento homeopático dinamizado a partir do extrato de fungo endofítico HB12b2 na potência 30 CH em EtOH 30% e água destilada apresentou atividade anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* LV78 similar aos seus veículos controles não dinamizados, mas o EtOH 30% 30 CH apresentou atividade significativa anti-promastigota.

Foi desenvolvido e validado um método por CLAE para identificação da substância majoritária do extrato em medicamentos homeopáticos. O método mostrou-se específico e linear. A partir dos limites de detecção e quantificação observados não foi possível identificar o marcador do extrato nos medicamentos homeopáticos.

Estudos em modelos celulares *in vitro* e em camundongos *in vivo* são necessários para melhor avaliar o potencial anti-*Leishmania* do HB12b2 30 CH, pois será possível avaliar se o medicamento será capaz de promover atividade anti-parasitária através do estímulo da reação celular e orgânica de camundongos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, W.A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil, **Boletim Epidemiológico Paulista**. v.6, p. 25-29, 2009.

BALSHI, M. e SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods: critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BASTIDE, M. BOUDARD, F. Na alternative concept of immunomodulation. **Forum on immunomodulatorys**. p. 303-16, 1995.

BASTIDE, M.; DAURAT, V.; DOUCET-JABOEUF, M. PÉLEGRIN, A.; DORFMAN, P. Immunomodulatory activity of very low doses of thymulin in mice. **Int. J. Immunother.**, v. 3, p. 191-200, 1987.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA (CRQ). **Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC)**, São José do Rio Preto, 29 de maio de 2010.

BRAY, P.G.; BARRET, M.P.; WARD, S.A.; KONING, H.P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol**, v.19, p. 232, 2003.

CALABRESE E.J.; BLAIN R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.202 p. 289-301, 2005.

CALDAS, A.J.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, A.A.M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.1, p. 95, 2001.

CAMARGO, E.P. Doenças Tropicais. **Estud. av.**, v.22, n. 64, 2008.

CAMARGO, R.A., COSTA, E.D., CATISTI, R. Effect of the oral administration homeopathic *Arnica montana* on mitochondrial oxidative stress. **Homeopathy**. v.102, p. 49-53, 2013.

CAMPILLO, M. e VÁZQUEZ, F. Parasitosis sistêmicas – Leishmanioses canina in McGraw Hill. **Parasitología Veterinaria**, ed 3ª, cap. 36, p. 652-665, 2002.

CECCHI, H., M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. **2ª Ed. rev. Campinas: Editora da UNICAMP**, p. 207, 2003.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB H., RIJAL, S., PEELING, R.W., et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, p. 7-16, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1ªed., p.179, 2000.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, ed 6ª, 1995.

CONVIT J., CASTELLANOS P.F., ULRICH M., COSTÉS M., RONDON A., PINARDI M.E., RODRIGUES N., BLOOM B.R., FORMICA S., VALEILLOS L., BRETANA A. Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of american cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases** v. 160, p. 104-115, 1989.

CORRÊA, A.S., SIQUEIRA-BATISTA, R. e QUINTIAS L.E.M. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 347-351, 1997.

COSTA, J.M.L., SALDANHA, A.C.R., SILVA, C.M.P., SERRA-NETO, A., GALVÃO C.E.S., GODINHO, A.M.R., SILVA, A.C., MENDES, W.S., SILVA, A.C.M. Estágio atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 59-60, 1991.

DARDENNE, M., SAADE, N., SAFIEH-GARABEDIAN, B. Role of thymulin or its analogue as a new analgesic molecule, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, p. 153-63, 2006.

DAURAT, V., CARRIÈRE, V., DOUYLLIEZ, C., BASTIDE, M. Immunomodulatory activity of thymulin and alpha -beta interferon on the specific and nonspecific cellular response of C57BL/6 and NZB mice, **Immunobiology**, p. 173-188, 1986.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, p. 417-423, n. 14, 1996.

DOUCET-JABOEUFF, M., PÉLEGRIN, A., SIZES, M., GUILLEMAIN, J., BASTIDE, M. Action of very low doses of biological immunomodulators on the humoral response in mice. **Intern Immunopharmacol.**, v. 7, p. 312, 1985.

DUARTE, C.S. **Leishmaniose: que futuro nos reserva?**. Relatório Final de Estágio Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade de Porto, Portugal, 2009.

DUDGEON, R.E. O princípio homeopático em medicina antes de Hahnemann. **Revista de Homeopatia – APH**, v.59, n.2, p. 8-18, 1994.

DUJANY, R. **Manual Prático de Homeopatia**, p. 159-160, 1995.

ELIA, V., BAIANO, S., DURO I., *et al.* Permanent physical chemistry properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. **Homeopathy**, v. 93, p. 144-150, 2004.

ELIA, V., MARCHESE, M., MONTANINO, M., *et al.* Hydrohysteretic phenomena of extremely diluted solutions induced by mechanical treatments: a calorimetric and conductometric study at 25°C. **J Solut Chem**, v. 34, n. 8, p. 947-960, 2005.

ELIA V., ELIA L., CACACE P., *et al.* The extremely diluted solutions as multi-variable systems: a study of calorimetric and conductometric behaviour as a function of the parameter time. **J Therm Anal Calorim**, v. 84, n. 2, p. 317-323, 2006.

ELIA V., NAPOLI E., GERMANO R. The “Memory of Water”: an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. **Homeopathy**, v. 96, p. 163-169, 2007.

ESPÓSITO, R.C. **Avaliação *in vitro* da eficácia de produtos homeopáticos contendo *Mormodica charantia* através de bioensaios**, Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

FERRAZ, F. N., SIMONI, G. K., NASCIMENTO, A., MELO, C. S., ALEIXO, D. L., GOMES, M. L., SPACK, M., DE ARAÚJO, S. M. Different forms of administration of biotherapy 7 dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**, v. 100, n. 4, p. 237-243, 2011.

FILHO, R.B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 30, p. 229-239, 2010.

FONTES, O.L. **Farmácia Homeopática – Teoria e Prática**, ed 4^a, 2012.

FURUTA, S.E., WECKX, L.L.M., FIGUEIREDO, C.R. Estudo clínico, randomizado, duplo-cego, em crianças com adenóide obstrutiva, submetidas a tratamento homeopático. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 3, p. 343-347, 2003.

GARCIA, A.J.C. **Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenois por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada**. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2011.

GARRITANO, C. R. O. Avaliação do uso de extrato de timo (timulina) em pacientes com neoplasia maligna submetidos ao tratamento cirúrgico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, n. 4, p. 225-231, 2007.

GRIMALDI, G.J., DAVID J.R., MACMAHON-PRATT D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, p. 270-287, 1987.

HAHNEMANN, S. **O moderno Organon da arte de curar**. Tradução Marcelo Pustiglione, ed.6, p. 320, 2001.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, ed. 6, p. 876, 2005.

HOLLER, F.J., SKOOG, D.A. e CROUCH, S.R. **Princípios de análise instrumental**, ed. 6, 2009.

KANAAN, S. A., SAFIEH-GARABEDIAN, B., KARAM, M., KHANSA, H., JABBUR, S.J., JURJUS, A.R., SAADE, N. E. Thymulin reduces the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. *Brain, Behavior and Immunity*. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n.4, p. 450-460, 2002.

KLIMEK, W., YAN, Y., TSCHULAKOW, A.V. A new approach to the memory of water. **Homeopathy**, v. 94, p. 241-247, 2005.

KOSSAK-ROMANACH, A. **Homeopatia em 1000 conceitos**, v. 27, p. 170, 1984.

LESSA, M.M., LESSA, H.A., CASTRO, T.W.N., OLIVEIRA, A., SCHERIFER, A., MACHO, P. e CARVALHO E.M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LOBYSHEV, V.I., SHIKHLINSKAYA R.E., RYZHIKOV, B.D. Experimental evidence for intrinsic luminescence of water. **J Mol Liq**, v. 82, p. 73-81, 1999.
MAHATA, C.R. Dielectric dispersion studies of some potentised homeopathic medicines reveal structured vehicle. **Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 262-267, 2013.

MERLINO, P. G., MARSH, J.A. Evidence for the direct action of thymulin on avian NK cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, p. 337-343, 2001.

Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** 2 ed, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 180, 2007.

MOORE, E.M., LOCKWOOD, D.N. Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal Glob Infect Dis**, v. 2, p. 151-158, 2010.

NETO, J.A.P., PERAZZO, F.F., CARDOSO, L.G.V., BONAMIN, L.V., CARVALHO, J.C.T. Action of Causticum in inflammatory models. **Homeopathy**, v.93, p.12-16, 2004.

NEVES, L.O., TALHARI, A.C., GADELHA, E.P.N., JÚNIOR, R.M.S., GUERRA, J.A.O., FERREIRA, L.C.L., TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p.1092-1101, 2011.

NOGUEIRA, R. **Determinação de cobre em preparações homeopáticas utilizando espectroscopia de emissão óptica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES e ICP-MS)**, Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação Lato sensu em Homeopatia, Rio de Janeiro: Instituto Hahnemanniano do Brasil, 2010.

NOVA, N.S.V. **ALTERNATIVAS FITOTERÁPICAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**, Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2012.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**, [acesso em 17 de janeiro de 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis: Situation and trends**, [acesso em 18 de abril de 2016]. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. 2016.

PEARSON, R. D., QUEIROZ-SOUZA, A. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 1995.

PEREIRA, W. K., LONARDONI, M. V., GRESPAN, R., CAPARROZ-ASSEF, S.M., CUMAN, R. K., BERSANI-ARMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, v. 51, n. 2, p. 157- 164, 2005.

PINTO, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S., LOPES, N.P., EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, vol. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PONTIN, K. **Determinação da atividade biológica de bioterápico e extrato de própolis “in vitro” e “in vivo” na infecção experimental determinada por *Leishmania (viannia) braziliensis***, Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2003.

PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P., KLEIN, D. A. **Microbiology**, p. 1139, 2002.

QUEIROZ, S. C. N., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

RAO, M.L., ROY, R., BELL, I.R., HOOVER, R. The defining role of structure (including eptiaxy) in the plausibility of homeopathy. **Homeopathy**, v. 96, p. 175-182, 2007.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. **Química Nova**, v. 26, p. 550, 2003.

REIMÃO, J.Q. **Estudo da Atividade anti-*Leishmania* e anti-*trypanosoma cruzi* de bloqueadores de canal de cálcio, furazolidona e buparvaquona: reposicionamento, associações de fármacos e formulações lipossomais**, Tese – Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2012.

REITHINGER R., DUJARDIN J.C., LOUZIR H., PIRMEZ C., ALEXANDER B., BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REY L. Thermoluminescence of ultra high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. **Physica A**, v. 323, p. 67-74, 2003.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **The British Medical Journal**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 1903.

SAFIEH-GARABEDIAN, B., DARDENNE, M., PLÉAU, J. M., SAADÉ, N. E. Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. *British Journal of Pharmacology*. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, p. 947-955, 2002.

SAMAL S., GECKELER, K.E.. Unexpected solute aggregation in water on dilution. **Chem Commun**, v. 21, p. 2224-2225, 2001.

SANTOS, R., SÁ, F.M.P. Homeopatia: Histórico e Fundamentos. **Revista Científica FAEMA**, n. 1, v. 5, p. 60-78, 2014.

SATO, C., LISTAR, V. G., BONAMIN, L. V. Development of broiler chickens after treatment with thymulin 5 cH: a zoo technical approach. **Homeopathy**, n. 1 v. 101, p. 68-73, 2012.

SCHULZ, B., BOYLE, C. **Mycological Research**, p. 661-686, 2005.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, 2010.

SIMPSON, N. J. K. e WELLS, M. J. M., **Introduction to solid-phase extraction. In: Solidphase extraction: principles techniques and applications**, p. 1-17, 2000.

SIQUEIRA, C. M. **Alterações Celulares Induzidas por um novo Bioterápico do Tipo Nosódio Vivo sobre as Linhagens MDCK e J774**. Tese - Mestrado

em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SIQUEIRA, C.M., COSTA, B., AMORIM, A.M., *et al.* H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines, **Homeopathy**, v. 102, p. 31-40, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, ed. 5, Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676, 2012.

SMIT, E., OBERHOLZER, H. M., PRETORIUS, E. A review of immunomodulators with reference to Canova. **Homeopathy**, v. 98, n.3, p. 169-176, 2009.

SUNDAR, S., JHA, T.K., THAKUR, C.P., SINHA, P.K., BHATTACHARYA, S.K. **Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India**, p. 2571-2581.

SUNILA, E.S. Dynamized preparations in cell culture. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 6, n.2, p. 257-263, 2009.

TEIXEIRA MZ. **Homeopathic use of modern medicines: utilisation of the curative rebound effect. Med Hypotheses**, p. 276-283, 2003.

TEIXEIRA, MZ. "Paradoxical strategy for treating chronic diseases": therapeutic model used by homeopathic paradigm for more than two centuries. **Homeopathy**, v. 94, p.265-266, 2005.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: Ciência, Filosofia e Arte de Curar. **Revista Médica de São Paulo**, v. 85, n. 2, p. 30-43, 2006.

TEIXEIRA, M.Z. New homeopathic medicines: use of modern drugs according to the principle of similitude. **Homeopathy**, v. 100, n. 3, 2011.

TEIXEIRA, M.Z. Protocolo de experimentação patogênica homeopática em humanos. **Revista Médica de São Paulo**, v. 92, n. 4, p. 242-263, 2013.

VAN Wijk R., BOSMAN S., VAN Wijk EP. Thermoluminescence in ultrahigh dilution research. **J Altern Complement Med** , v. 12, n. 5, p. 437-443, 2006.

VOLF, P., HOSTOMSKA, J., ROHUSOVA, I. **Parasite**, v. 15, p. 237, 2008.

WALACH H., VAN A. T., BOURKAS P., *et al.* Electric measurement of ultrahigh dilutions e a blinded controlled experiment. **Br Homeopath J**, v. 87, p. 3-12, 1988.

WILSON, M. E., JERONIMO, S. M. B., PEARSON, R. D., **Microb. Pathog.**, v. 38, p. 147, 2005.