

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

EFICÁCIA DO LAPACHOL EXTRAÍDO DE *Handroanthus serratifolius*
(BIGNONIACEAE) PARA TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Iasmin Aparecida Cunha Araújo

Uberlândia
Agosto, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Aluna: Iasmin Aparecida Cunha Araújo

Orientador: Prof. Dr Sydney Magno da Silva
(ICBIM/UFU).

Co-orientadora: Dr^a. Renata Cristina de Paula
(ICBIM/UFU).

Uberlândia
Agosto, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- A663e
2017 Araújo, Iasmin Aparecida Cunha, 1992
 Eficácia do lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius*
(Bignoniaceae) para tratamento das leishmanioses / Iasmin Aparecida
Cunha Araújo. - 2017.
 72 f. : il.
- Orientador: Sydnei Magno da Silva.
 Coorientadora: Renata Cristina de Paula.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.67>
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Leishmaniose - Tratamento - Teses. 3.
Lapachol - Teses. 4. Produtos naturais - Teses. I. Silva, Sydnei Magno
da. II. Paula, Renata Cristina de. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me acompanhar e me guiar em todos os caminhos.

A minha mãe Eliane e ao meu padrasto Eduardo por todo o apoio e por acreditarem e confiarem em mim. A minha irmã Isabella pelo incentivo incondicional. Ao meu namorado Eurípedes por tudo o que fez por mim durante esse percurso e por estar comigo sempre que precisei. Vocês foram e são essenciais. Obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva e a minha co-orientadora Dra. Renata Cristina de Paula por me orientarem durante o mestrado. Obrigada por todo conhecimento, paciência e dedicação que vocês me ofereceram. Obrigada por me ajudarem tornar esse trabalho possível.

A técnica Juliana Silva Miranda por todos os ensinamentos e por todas as coisas que fez para mim durante o mestrado.

Aos meus colegas de laboratório Karen, Fernanda, Gabi, Eliane, Marco, Kelem, Talita, Natália, Maria Júlia, Camila, Douglas pelo companheirismo e por todas as alegrias.

A Prof^ª. Dra. Alaíde Braga de Oliveira e todos do Laboratório de Fitoquímica da UFMG pela parceria e pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, por ceder espaço e pelo suporte na leitura dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas e as secretárias Lucileide e Lucélia.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Colaboradores do projeto

Este trabalho conta com a colaboração da Prof^ª. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*. Pode comprometer pele, vísceras e mucosas dependendo da espécie que acomete o hospedeiro. A principal medida de controle da doença é o tratamento, porém o mesmo apresenta várias limitações, como efeitos colaterais, seleção de parasitos resistentes e eficácia reduzida. Com isso, a Organização Mundial da Saúde estimula a busca por novos fármacos e produtos naturais que possam minimizar as limitações do tratamento existente. Os objetivos desse estudo foram preparar extratos etanólicos a partir de plantas do gênero *Handroanthus* e extrair lapachol para caracterizar e avaliar sua eficácia *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*, e ainda, determinar a citotoxicidade do lapachol e dos extratos em células HepG2. A partir dos galhos coletados de diferentes espécies *Handroanthus* foi realizada análise cromatográfica de cada espécie onde foi observado a presença de quinonas, posteriormente o teste feito com Na₂CO₃ 2% em placa de toque mostrou que somente *H. serratifolius* foi positivo para lapachol. A partir disso foram preparados os extratos etanólicos e realizada a extração química do lapachol. Pelos métodos de CCD e CLAE o perfil fitoquímico das amostras coletadas foi caracterizado. Lapachol extraído de *H. serratifolius* apresentou uma citotoxicidade em células HepG2, avaliada pelo método colorimétrico MTT, de $826,66 \pm 82,67 \mu\text{g/mL}$. O mesmo demonstrou atividade tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, tendo um CI₅₀ de $19,38 \pm 2,21 \mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis* e $32,96 \pm 8,02 \mu\text{g/mL}$ para *L. infantum*, no teste de resazurina e redução de carga parasitária de 75,3%. Com amastigotas intracelulares houve redução da infecção em relação ao controle. Lapachol foi capaz de induzir redução média da carga parasitária (75,3%) em modelo murino de leishmaniose tegumentar. Estes resultados reforçam o potencial terapêutico do lapachol e abrem novas perspectivas para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose, tratamento, produtos naturais, *Handroanthus*, lapachol

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It can compromise the skin, viscera and mucous membranes depending on the species that attacks the host. The main measure of disease control is treatment, but it has several limitations, such as side effects, selection of resistant parasites and reduced efficacy. With this, the World Health Organization encourages the search for new drugs and natural products that can minimize the limitations of existing treatment. The objectives of this study were to prepare ethanolic extracts from plants of the genus *Handroanthus* and extract lapachol to characterize and evaluate their in vitro and in vivo efficacy against *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* and to determine the cytotoxicity of lapachol and extracts in cells HepG2. Through the branches collected from *Handroanthus* species, a chromatographic analysis of each species was performed, where the presence of quinones was observed, and the test done with Na₂CO₃ 2% on a touch plate showed that only *H. serratifolius* was positive for lapachol. From this the ethanolic extracts were prepared and the chemical extraction of lapachol was carried out. By the methods of TLC and HPLC the phytochemical profile of the samples collected was characterized. Lapachol extracted from *H. serratifolius* showed a cytotoxicity in HepG2 cells, evaluated by the MTT colorimetric method, of $826.66 \pm 82.67 \mu\text{g} / \text{mL}$. The same demonstrated activity in both the in vitro and in vivo assays, having an IC₅₀ of $19.38 \pm 2.21 \mu\text{g/mL}$ for *L. amazonensis* and $32.96 \pm 8.02 \mu\text{g/mL}$ for *L. infantum* in the Resazurin and parasite load reduction of 75.3%. With intracellular amastigotes there was reduction of infection in relation to the control. Lapachol was able to induce a mean reduction of the parasitic load (75.3%) in a murine model of tegumentary leishmaniasis. These results reinforce the therapeutic potential of lapachol and open new perspectives for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, treatment, natural products, *Handroanthus*, lapachol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD para registro dos perfis exploratórios do extrato etanólico de <i>Handroanthus</i> sp e do lapachol.....	32
Tabela 2 - Dados botânicos das plantas coletadas	39
Tabela 3 - Rendimento dos extratos dos galhos das espécies de <i>Handroanthus</i> sp. pelo método de maceração com 350g de pó dos galhos.....	39
Tabela 4- Redução do crescimento dos parasitos com os extratos etanólicos obtidos <i>H. crysotichus</i> , <i>H. ochraceus</i> e <i>H. serratifolius</i> e lapachol extraído de <i>H. serratifolius</i>	43
Tabela 5 - Valores de CC ₅₀ determinados para células HepG2, valores de CI ₅₀ determinados para formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> e índice terapêutico (IT) após incubação por 48 horas com lapachol extraído de <i>Handroanthus serratifolius</i> e anfotericina b.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2013.....	16
Figura 2 - Prevalência da leishmaniose visceral no mundo, 2013.	16
Figura 3 - Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	18
Figura 4 - Estrutura química do lapachol (FONSECA et al., 2003)	27
Figura 5 – Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras de <i>H. crysotrichus</i> , <i>H. ochraceus</i> e <i>H. serratifolius</i> . Revelador utilizado CAM. 1- <i>H. crysotrichus</i> ; 2- Lapachol; 3- <i>H. ochraceus</i> ; 4- <i>H. serratifolius</i>	40
Figura 6 - Placa de toque com Na ₂ CO ₃ para detecção de lapachol. 1- <i>H. serratifolius</i> ; 2 – <i>H. crysotrichus</i> ; 3- <i>H. ochraceus</i> ; 4- Lapachol.	40
Figura 7 - Cromatograma do extrato etanólico obtido de <i>H. serratifolius</i> com detecção no comprimento de onda de 220nm.	42
Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico obtido de <i>H. serratifolius</i> com detecção no comprimento de onda de 220nm.	42
Figura 9 - Cromatograma do lapachol obtido de <i>H. serratifolius</i> com detecção no comprimento de onda 350 nm	42
Figura 10 – Imagem representativa da infecção de macrófagos RAW 264.7 por amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (A) sem tratamento, setas indicam formas amastigotas (B) tratado com lapachol.	44
Figura 11 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) na pele de camundongos BALB/c infectados com 10 ⁷ promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (MHOM/BR/1989/Ba199), vinte dias após administração de lapachol (20mg/kg/24h/via oral)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Antimoniato de meglumina

ATP: Adenosina trifosfato

CAM: Molibdato cérico de amônio

CC₅₀: Concentração citotóxica em 50%

CCD: Cromatografia em camada delgada

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade ótica

EE: Extrato Etanólico

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HUFU: Herbário da Universidade Federal de Uberlândia

ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas

IT: Índice terapêutico

LC: Leishmaniose cutânea

LCM: Leishmaniose cutâneomucosa

LT: Leishmaniose tegumentar

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio

NADH: *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NT: Não testado

PBS: Tampão fosfato salino

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PSG - *Promastigote Secretory Gel*

Rf: *Retention fator* - Fator de retenção

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SFB: Soro fetal bovino

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMF: Sistema monocítico fagocitário

SUS: Sistema Único de Saúde

WHO: *World Health Organization*

α -MEM: *Minimum Essential Medium Alpha modification*

Sumário

1.	Introdução	14
1.1.	Leishmanioses	14
1.2.	Transmissão e Ciclo biológico	17
1.3.	Leishmaniose Visceral no Brasil	20
1.4.	Leishmaniose tegumentar americana no Brasil	21
1.5.	Tratamento convencional das leishmanioses e suas limitações	23
1.6.	Alternativas fitoterápicas para o tratamento da leishmaniose	25
2.	Justificativa	28
3.	Objetivos	29
3.1.	Objetivo Geral	29
3.2.	Objetivos Específicos	29
4.	Material e Métodos	30
4.1.	Coleta, identificação e preparo do material	30
4.2.	Prospecção fitoquímica	30
4.3.	Extração química do lapachol	30
4.4.	Análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)....	31
4.5.	Parasitas e células	32
4.6.	Animais	32
4.7.	Ensaio <i>in vitro</i>	32
4.7.1.	Eficácia <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos de <i>Handroanthus</i> sp e do lapachol extraído de <i>H. serratifolius</i> sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i>	33
4.7.2.	Ensaio de citotoxicidade do lapachol extraído de <i>Handroanthus serratifolius</i> sobre a linhagem celular HepG2	34
4.7.3.	Índice terapêutico <i>in vitro</i>	35

4.7.4.	Ensaios de eficácia do lapachol extraído de <i>Handroanthus serratifolius</i> em macrófagos imortalizados infectados com <i>Leishmania infantum</i>	35
4.8.	Ensaio <i>in vivo</i>	36
4.8.1.	Teste de eficácia em modelo murinho	36
4.8.2.	Determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR).....	36
4.9.	Análise estatística	37
5.	Resultados.....	39
5.1.	Coleta, identificação e preparo do material	39
5.2.	Prospecção Fitoquímica	39
5.3.	Extração química do lapachol.....	40
5.4.	Análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)....	41
5.5.	Ensaios de eficácia dos extratos etanólicos de <i>Handroanthus</i> sp e do lapachol extraído de <i>H. serratifolius</i> em modelo <i>in vitro</i> de leishmaniose.....	43
5.6.	Ensaios de eficácia do lapachol extraído de <i>Handroanthus serratifolius</i> em macrófagos imortalizados infectados com <i>Leishmania. infantum</i>	44
5.7.	Teste de eficácia em modelo murino de LTA.....	45
6.	Discussão	47
7.	Conclusões.....	53
	Referências bibliográficas	54
	Anexos	72
	Anexo 1	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças que podem comprometer vísceras, pele e mucosa de mamíferos. O tipo do acometimento em cada indivíduo depende da espécie do parasito que o infecta e a resposta imune do mesmo (WHO, 2017). Essa doença é causada por um protozoário intracelular obrigatório que pertence a classe Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 2005; WHO, 2017).

A transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (RANGEL & LAINSON, 2003). As fêmeas, que são hematófagas, participam diretamente do processo de infecção, possuindo importância epidemiológica. Estes insetos estão amplamente distribuídos na natureza e encontrados nos mais diferentes nichos ecológicos (SHAW, 2002).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são pleomórficos e apresentam em seu ciclo de vida as formas evolutivas promastigota e paramastigota, que se desenvolvem no trato intestinal de um inseto vetor, são móveis e com o flagelo aparente, e as formas amastigotas, que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) de um hospedeiro vertebrado, são imóveis e sem flagelo aparente (BATES, 2008). *Leishmania*, da mesma forma que outros tripanossomatídeos, possuem uma mitocôndria única e ramificada, que se estende por todo o corpo celular e tem um grande conteúdo de material genético localizado em uma região específica da organela, o cinetoplasto. Exibem um núcleo oval e cinetoplasto pequeno, em forma de bastão. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo varia, embora ele se localize preferencialmente, entre o núcleo e o maior volume de citoplasma (SIMPSON, 1986).

A transmissão do parasito para o ser humano pode ser: zoonótica, onde se dá de um reservatório animal para o vetor e posteriormente para o hospedeiro humano e outros animais, ou antroponótica, que ocorre quando o parasito é transmitido entre humanos, que

atuam como hospedeiros e reservatórios, pelo inseto vetor (DESJEUX, 2004; SECUNDINO et al., 2011; WHO, 2010).

Os principais hospedeiros vertebrados de *Leishmania* são mamíferos pertencentes da família Canidae, marsupiais, roedores e humanos. Com algumas exceções, as leishmanioses são zoonoses e a infecção em humanos é acidental (ASHFORD, 1996; SALIBA et al., 1999; GRAMICCIA et al., 2005; WHO, 2017).

As leishmanioses humanas podem apresentar distintas manifestações clínicas, sendo as duas formas básicas a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (SILVEIRA et al., 2004; LAINSON & SHAW, 2005).

A LV, também conhecida como calazar, consiste em uma infecção causada por *Leishmania donovani* (Velho Mundo) e *Leishmania infantum* (Novo Mundo e Velho Mundo) (GRIENSVEN e DIRO, 2012). A LV é uma doença sistêmica grave que atinge as células do SMF de homens e animais, sendo o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele os órgãos mais afetados. Clinicamente, a LV se caracteriza por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e ao óbito, quando não diagnosticada e tratada em tempo (BADARÓ et al., 1996). Sua grande importância na saúde pública se deve a expansão geográfica para áreas até então livres da doença e inclui, ainda, a urbanização, reemergência em focos endêmicos antigos e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas. É também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A LT pode se manifestar como diversas síndromes clínicas no hospedeiro, dependendo da espécie de *Leishmania* que o acomete e da resposta imune do indivíduo, sendo classificada em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou anérgica (CHAPPUIS et al., 2007; RAMOS, et al., 2015). O indivíduo com LC apresenta uma ou várias úlceras na pele, sendo essa forma considerada mais frequente. Conhecida popularmente como espúndia, a LCM causa úlceras que são gradativamente destrutivas nas mucosas como boca, nariz, faringe e laringe. Essa manifestação clínica da doença é considerada grave e pode causar a

mutilação da face e provocar sofrimento ao paciente. Feridas não ulceradas que apresentam uma grande quantidade de parasitos na pele do indivíduo e anergia ao teste intradérmico de Montenegro, são manifestações clínicas de LCD (RIBAS-SILVA et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A LT apresenta uma ampla distribuição mundial, estando presente em vários países. No continente americano, esta forma é denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo encontrado casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (GONTIJO et al., 2003; BRASIL, 2017).

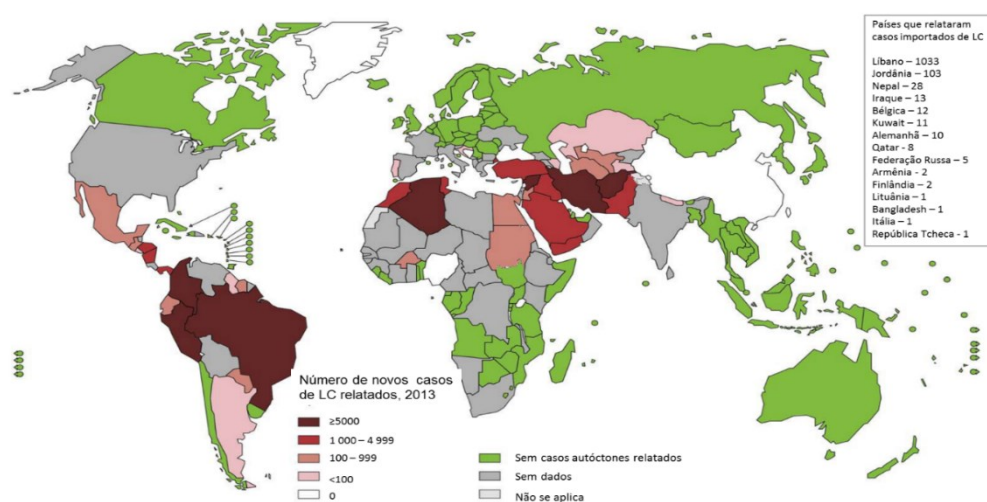


Figura 1 - Prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2013. Fonte: WHO 2017.

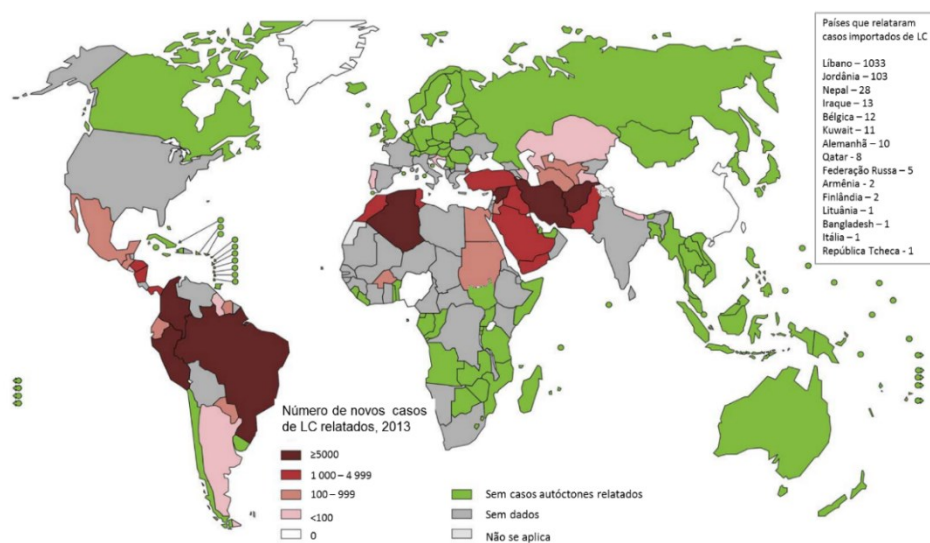


Figura 2 - Prevalência da leishmaniose visceral no mundo, 2013. Fonte: WHO (2017).

As leishmanioses ocorrem em 98 países distribuídos em quatro, dos seis continentes. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 310 milhões de pessoas estão expostas a contrair a doença, com incidência anual de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos, e destes, 1 milhão com LT (**Figura 1**) e 300.000 de pessoas acometidas pela LV (**Figura 2**), das quais cerca de 20.000 a 30.000 dos indivíduos doentes evoluem para o óbito (ALVAR et al., 2012; CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004; WHO, 2017).

As leishmanioses constituem, atualmente, o segundo grupo de doenças parasitárias que mais mata no mundo, e está entre as seis mais importantes doenças infecciosas combatidas pela OMS. Nos últimos anos houve um grande avanço em relação a prevenção e diagnóstico das leishmanioses, sendo o tratamento dos doentes a principal medida profilática, porém a mortalidade e morbidade ainda apresentam uma taxa de crescimento preocupante. Devido a isso, um grande esforço vem sendo realizado em avanços nas áreas de diagnóstico, controle e tratamento, sendo na descoberta de novos produtos, vacinas ou técnicas para melhoria de metodologias diagnósticas e tratamentos já existentes (WHO, 2017).

1.2. Transmissão e Ciclo biológico

Parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros, sendo um invertebrado, representado por um flebotomíneo, e um mamífero pertencentes as ordens Carnivora (cães e gatos), Xenarthra (tatus e preguiças), Marsupialia (gambás), Primata (humanos e não humanos), Rodentia (ratos) (LAINSON; SHAW 1987) (**Figura 3**). O gênero é dividido em dois subgêneros, de acordo com seu desenvolvimento no trato digestório do vetor, entre outros aspectos: *Leishmania* (*Leishmania*), com o desenvolvimento limitado ao intestino nas regiões média e anterior, e *Leishmania* (*Viannia*), onde os parasitos se desenvolvem na região posterior e, migram para as regiões média e anterior do intestino (LAINSON & SHAW, 1987).

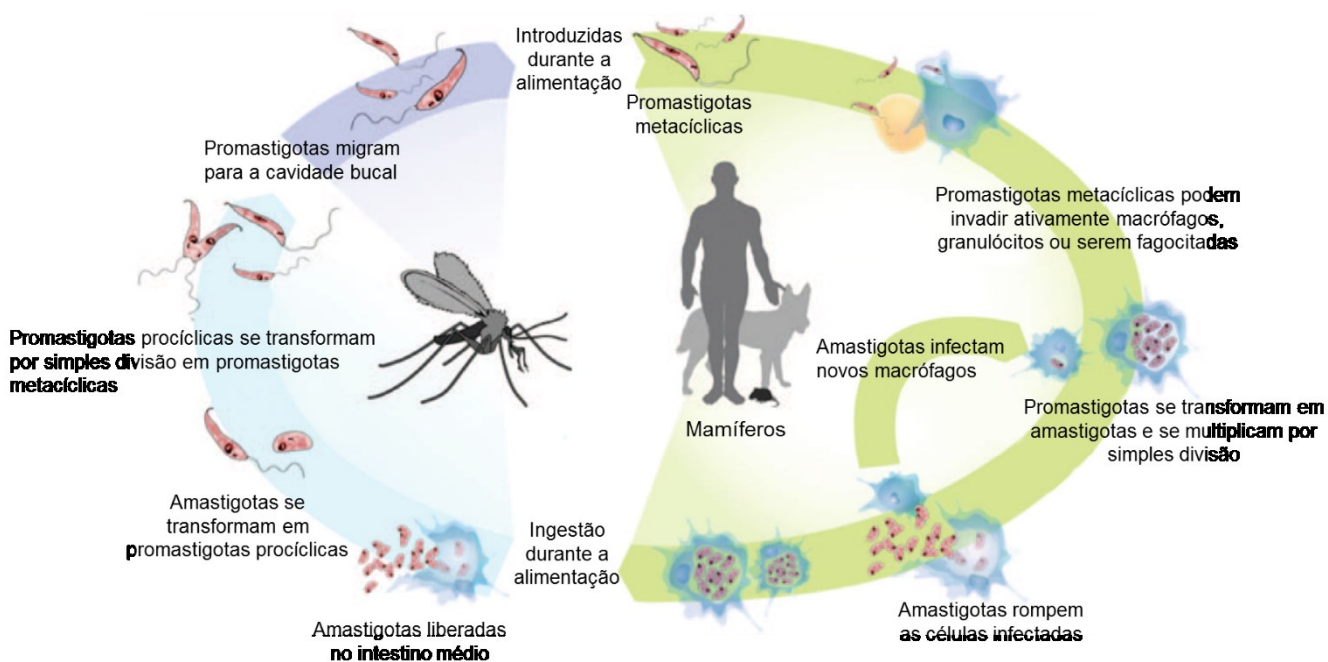


Figura 3 - Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de Harhay et al., 2011). Os flebotomíneos ingerem células infectadas durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do vetor, formas amastigotas se transformam em promastigotas, por simples divisão, se desenvolvem e migram para a probóscide. Durante o repasto sanguíneo as promastigotas são regurgitadas em hospedeiros humanos ou mamíferos vertebrados. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas e se transformam dentro dessas células em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares.

Sua transmissão ao homem e aos animais ocorre por meio da picada da fêmea de insetos pertencentes à ordem Diptera e família Psychodidae, subfamília Phlebotominae denominados popularmente como flebotomíneos. Os flebotomíneos são insetos pequenos e possuem o hábito de vida crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares protegidos e úmidos, sendo encontrados em diferentes regiões geográficas e condições climáticas e ambientais. A maioria desses insetos habita o ambiente silvestre, porém podem se alimentar em homens e animais, cujas habitações estão próximas a regiões de mata. Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas. Algumas espécies apresentam acentuada antropofilia e domiciliação, o que as tornam epidemiologicamente importantes na transmissão de doenças (LAINSON & SHAW, 1998).

São descritos em torno de 700 espécies de flebotomíneos e aproximadamente 10% foram relatados como vetores de *Leishmania*, sendo que todas as espécies do parasito são

transmitidas por flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, encontrado no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (SCHLEIN, 1993; SACKS & KAMHAWI, 2001, BATES, 2008; MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Apenas esses dois gêneros de flebotomíneos possuem importância médica, por serem os transmissores das leishmanioses (SCHLEIN, 1993; SACKS & KAMHAWI, 2001; KILLICK-KENDRICK, 1990).

O parasito é transmitido quando as fêmeas, ao realizar repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, ingerem as formas amastigotas, presentes nas células do SMF da pele do mesmo. No intestino do vetor as formas amastigotas transformam-se em formas paramastigotas, fixadas pelo flagelo à cutícula por meio de hemidesmossomos, e promastigotas que se replicam intensamente. As promastigotas passam por um processo de metacicloênese, onde migram para a parte anterior do tubo digestório do vetor, atingem um estágio infectivo, dando origem as formas metacíclicas, forma infectante. Essas formas infectantes se direcionam para a cavidade bucal do inseto, onde são introduzidas no novo hospedeiro durante o repasto (PIMENTA et al., 1992; SACKS & SHER, 2002, MICHALICK, et al., 2016).

As promastigotas metacíclicas, no tubo digestório do inseto vetor, produzem uma glicoproteína de consistência gelatinosa chamada PSG (*promastigote secretory gel*). Acredita-se que esse gel obstrua a passagem de alimento, quando há o repasto sanguíneo-tissular, o flebotomíneo é obrigado a regurgitar saliva juntamente com as formas promastigotas metacíclicas no local da picada (BATES, 2007).

Após a infecção, os macrófagos atraídos pela reação inflamatória formada no local fagocitam os parasitos, que são internalizados no vacúolo parasitóforo, que se liga aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal. No interior deste vacúolo, o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio. Entre uma a quatro horas, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando os macrófagos estão repletos com amastigotas, eles se rompem e liberam os parasitos que vão infectar outros macrófagos (PETERS et al., 2008; SACKS & SHER, 2002).

1.3. Leishmaniose Visceral no Brasil

A LV acomete mais de 300 mil de pessoas que vivem em áreas de risco entre os 88 países com casos suspeitos ou confirmados, dos quais 72 são classificados como países em desenvolvimento. O Brasil é um dos seis países com maior número de casos de LV no mundo e o maior da América Latina, sendo responsável por cerca de 90% dos casos no continente (WHO, 2017). De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), no ano de 2015 foram notificados 3289 casos, sendo que a taxa de letalidade gira em torno de 7% (SINAN, 2015).

A LV era considerada como uma doença exclusiva de meio rural, mas a partir dos anos 1980 se expandiu para regiões periurbanas de vários municípios do Brasil (PASTORINO et al, 2002). Esse aumento da prevalência da doença na região urbana pode estar associado ao desenvolvimento urbano, movimentos de migrações, desmatamento e mudanças ambientais (ROCHA et al., 2005).

Segundo o SINAN, em 25 anos de notificação (1990-2015) os casos de LV somaram 81722 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram na região Nordeste. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram nesta região. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no ano de 2015, a Região Nordeste apresentou uma redução para 55% dos casos no país. Ao longo dos anos os casos passaram a ser notificados com mais frequência em outras regiões, como Norte, Centro-oeste e Sudeste (HARHAY et al., 2011; MARCONDES e ROSSI, 2013). A expansão atingiu todo o território brasileiro, principalmente em municípios com crescente urbanização e alto índice de pobreza (MARQUES et al., 2017).

Os dados epidemiológicos dos últimos anos confirmam a urbanização da LV. O fenômeno atual da urbanização em larga escala começou em 1981, quando a epidemia de LV atingiu Teresina e, em seguida, São Luís, espalhando por todo o país, afetando vários estados, incluindo São Paulo e Rio Grande do Sul, e grandes centros, como Belo Horizonte e a capital, Brasília (COSTA et al., 2011). Minas Gerais, em 2015, notificou 418 casos, 78% dos casos da Região Sudeste (SINAN, 2015). Belo Horizonte possui uma das maiores prevalências de LV humana no Brasil, sendo registrados casos desde o ano

de 1994 (HARHAY, et al., 2011). No ano de 2017 já foram confirmados 20 casos na cidade e três óbitos (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE, 2017).

Os principais fatores de risco se concentram em condições socioeconômicas, desnutrição, mobilidade da população, transformações ambientais e mudanças climáticas (WHO, 2017). A LV acomete pessoas que possuem baixo nível socioeconômico que vivem em condições precárias de moradias, crianças desnutridas, e vem sendo considerada emergente em indivíduos infectados por HIV. Segundo a OMS cerca de 90% dos indivíduos infectados sobrevive como renda inferior a US\$ 1 por dia (PASTORINO, et al. 2002; BARBOSA-JUNIOR et al., 2015; ALVAR et al., 2006; WHO, 2010).

No Brasil, o principal reservatório de *L. infantum* é o cão (*Canis familiaris*), onde temos uma infecção mais prevalente do que em humanos. No ambiente silvestre os reservatórios mais comuns são as raposas e cachorros-do-mato (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Como principal reservatório doméstico, o cão cumpre um papel importante no ciclo de transmissão da LV em áreas urbanas e, no Brasil, o sacrifício dos animais infectados é a principal medida de controle da endemia (COSTA, 2007; MORENO & ALVAR 2002).

Duas espécies de flebotomíneos, até o momento, estão relacionadas com a transmissão do parasito no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, que possui alta capacidade adaptativa e é o principal vetor no país, e *L. cruzi*, encontrado infectado por *L. infantum* nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e que, até o momento, não tem importância epidemiológica confirmada. São conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (SANTOS, et al., 1998; MISSAWA, et al., 2011).

1.4. Leishmaniose tegumentar americana no Brasil

A LT constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos (WHO, 2017). É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela sua capacidade de produzir deformidades e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (DU, et al., 2016; WHO, 2017).

São descritas no continente americano 11 espécies dermatóricas de *Leishmania* como agentes etiológicos da LTA que acometem o homem e animais, e oito que acometem apenas animais. No Brasil há sete espécies descritas que acometem o homem, seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*; e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As de maior importância no país são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (LAINSON e SHAW, 2005). Em relação às espécies de flebotomíneos, as mais importantes são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. *Lutzomyia neivai* e *L. fischeri* ainda não são vetores comprovados da LTA, porém estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares nas áreas de transmissão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; LAINSON e SHAW, 2005). Os reservatórios principais do parasito são os roedores, marsupiais, desdentados e canídeos (LAINSON e SHAW, 2005).

Casos autóctones de LTA são notificados em todas as regiões do Brasil desde 2003, sendo endêmica no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste. No ano de 2015, de acordo com o SINAN, o Brasil confirmou 19.395 casos, sendo a região Norte com o maior número de casos (8.939) e o Pará o estado com mais notificações com 3.610 casos (SINAN, 2015).

Como tem havido um aumento dos casos autóctones a cada ano, é notável as modificações no perfil de transmissão da doença. Primeiramente, a LTA era conhecida como zoonose apenas de animais silvestres e, portanto, transmitidas somente para indivíduos que tinham contato com matas e florestas. Em seguida, expandiu para as zona rural e periurbana. Nos dias atuais, são descritos três padrões de transmissão na epidemiologia da LTA: o silvestre, que ocorre em áreas de vegetação primária; o ocupacional ou de lazer, que é relacionada com a exploração desenfreada de matas e florestas para construção de estradas, atividades agropecuárias e de lazer; e o rural ou periurbano, onde há a adaptação do vetor ao peridomicílio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O controle de LTA no Brasil é complexo e difícil de ser estabelecido, devido aos padrões epidemiológicos, a variedade de vetores, reservatórios, hospedeiros e agentes

etiológicos da doença, aliados ao insuficiente conhecimento sobre todos os aspectos da cadeia epidemiológica da doença (SILVEIRA et al., 2004).

1.5. Tratamento convencional das leishmanioses e suas limitações

Para que ocorra a prevenção e o controle das leishmanioses, várias estratégias de intervenção são sugeridas pela OMS. O diagnóstico precoce e o tratamento eficaz dos casos humanos pode reduzir a prevalência da doença, bem como o controle de vetores que pode interromper o ciclo do parasito, e controle de reservatórios pode reduzir o número de novas infecções (WHO, 2017).

O tratamento deve ser realizado após o diagnóstico da doença, e os medicamentos de primeira escolha, tanto no Brasil como no mundo, são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), sendo os mais utilizados o antimoniato de N-metil d-glucamina (AM) (Glucantime®, Rhône Mérieux, França) empregado a mais de 70 anos no Brasil e no mundo, e o estibogluconato de sódio (Pentostan®, Wellcome, Reino Unido), que não é comercializado no país. Estes compostos agem inibindo enzimas do parasito que são utilizadas na oxidação de ácidos graxos e glicólico, resultando na depleção dos níveis de ATP intracelular, além da redução do antimônio pentavalente para trivalente (Sb^{5+} em Sb^{3+}), a forma tóxica para os parasitos, capaz de interferir no metabolismo dos tióis (BALANA-FOUCE et al., 1998, ALVARENGA, et al. 2010; LIMA et al., 2015). A dose dos antimoniais deve ser calculada em miligramas de Sb^{5+} /kg/dia. No Brasil a dose recomendada é 20 mg Sb^{5+} /kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias (WHO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Embora os antimoniais sejam o medicamento de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, seu uso apresenta diversas limitações, como a necessidade de administração parenteral diariamente por três ou mais semanas, e efeitos colaterais como náusea, vômito, fraqueza, cólica abdominal, mialgia, diarreia, hepatotoxicidade, erupções cutâneas e cardiotoxicidade (GUERIN et al., 2002).

No Brasil, os pacientes que não apresentam melhora em seu quadro clínico com a utilização dos antimoniais, ou se o uso desses medicamentos for impossibilitado devido aos motivos citados anteriormente, é utilizado como tratamento alternativo a anfotericina b ou as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (ROCHA, et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, LIMA, et al., 2015).

As formas mucosas de LT exigem um maior cuidado no tratamento com os antimoniais pentavalentes, podendo apresentar uma resposta mais lenta ou não efetiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A anfotericina b é considerada a droga leishmanicida mais eficaz disponível comercialmente. É um antibiótico da classe dos polienos, produzido a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. É primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp., sendo o seu mecanismo de ação principal a ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) que estão presentes na membrana plasmática da *Leishmania*, levando a formação de poros na membrana e consequente lise osmótica com morte do parasito (LEMKE et al., 2005; WHO, 2017).

O Ministério da Saúde disponibiliza duas apresentações de anfotericina b: o desoxicolato de anfotericina b e a anfotericina b lipossomal (AmBisome®, Gilead Sciences, Inc, EUA), sendo a eficácia dessas apresentações comparáveis, porém a anfotericina b lipossomal apresenta uma menor toxicidade (MEYERHOFF, 1998).

Assim como todos os agentes quimioterápicos usados para tratar as leishmanioses, a anfotericina b também é considerada tóxica, e pode apresentar efeitos colaterais importantes (PELISSARI et al., 2011; RODRIGUES-SANTOS, 2013). Quando o paciente faz uso da anfotericina b pode apresentar febre, cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. Além desses efeitos colaterais citados, o desoxicolato de anfotericina b também pode causar anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, e distúrbios de comportamento (GONTIJO et al., 2003). Todos os pacientes em tratamento com esses fármacos devem ser acompanhados por equipe médica para monitorar efeitos colaterais das drogas. Esse acompanhamento deve ser realizado mesmo após o fim da quimioterapia para verificar qualquer recaída após o tratamento inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Outro medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses é a hexadecilfosfocolina (miltefosina). Inicialmente, este fármaco foi desenvolvido como droga antineoplásica e foi o primeiro medicamento a ser administrado por via oral no tratamento da LV. Este medicamento é usado em alguns países tanto para o tratamento

da LV quanto para a LT (SINDERMANN et al., 2004; BHATTACHARYA et al., 2007). Apresenta efeitos colaterais importantes como nefrotoxicidade, teratogenicidade, e problemas gastrointestinais devido a sua administração por via oral. Também apresenta meia-vida prolongada, que acaba favorecendo a seleção de parasitos resistentes a droga (BHATTACHARYA et al., 2007).

1.6. Alternativas fitoterápicas para o tratamento da leishmaniose

O interesse no uso de plantas medicinais e produtos naturais para a prevenção de doenças parasitárias vem crescendo nos últimos anos (BATISTA et al., 2009; LIMA et al., 2015). As plantas são fontes de descobertas de medicamentos, especialmente quando se trata de drogas antiparasitárias (ANTHONY et al., 2005). A eficácia e o mecanismo de ação dos medicamentos provenientes de vegetais vêm sendo estudados mais profundamente nos últimos 30 anos, e alguns autores pesquisam novas alternativas para o tratamento das leishmanioses, baseando-se na etnofarmacologia, onde utilizam do conhecimento tradicional em plantas medicinais para busca de novos medicamentos com menor toxicidade e menor custo (ANTHONY et al., 2005; VILA NOVA, 2012).

O Brasil possui uma grande diversidade genética vegetal, a maior do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO e SILVA, 2006). Mesmo com tamanha diversidade, apenas 8% desse potencial biológico foi estudado para busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES et al. 2004).

No Brasil foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, a fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As plantas apresentam em sua composição metabólitos secundários das mais variadas classes: alcaloides, chalconas, flavonoides, lignanas, naftoquinonas e terpenos, diversos desses compostos descritos na literatura como efetivos na atividade leishmanicida (QUEIROZ, et al., 1996; ROCHA, et al., 2005).

A família Bignoniaceae é constituída por 113 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. Essas espécies se encontram distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, ocorrendo frequentemente no continente americano. No Brasil, são encontradas na região Amazônica até o estado do Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podendo ser encontradas no Cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica. Entre as espécies arbóreas podemos citar os ipês do Brasil (*Tabebuia* sp ou *Handroanthus* sp) e Jacarandá (*Jacaranda* sp) (LORENZI, 1988; FISHER et al., 2004; OLMSTEAD et al., 2009; CIPRIANI et al., 2012; LOHMANN, 2014).

O perfil químico de Bignoniaceae é caracterizado pela ocorrência de terpenoides, quinonas, derivados aromáticos especiais, derivados não nitrogenados de cadeia longa da via do ácido acético e flavonoides (CIPRIANI et al., 2012). Uma classe de metabólitos secundários ocorrente na família Bignoniaceae são as quinonas, com 151 registros, segundo Cipriani et al. (2012). As quinonas representam uma classe de metabólitos secundários de ocorrência natural que são reduzidos a fenóis e apresentam dois grupos carbonílicos, com pelo menos duas ligações duplas C-C, geralmente de cor amarela a vermelha (SIMÕES, et al. 2004). As naftoquinonas são substâncias aromáticas cíclicas com um esqueleto básico de naftaleno (SILVA et al., 2013).

As naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae expressam várias atividades biológicas e são uma das categorias de produtos químicos mais estudados do ponto de vista farmacológico nos últimos tempos (OLIVEIRA et al, 1990; FERREIRA et al., 2010). As naftoquinonas são capazes de induzir o estresse oxidativo nas células, sendo um motivo de grande interesse nesta classe de substâncias, especialmente em relação a sua atividade contra parasitos intracelulares obrigatórios, como os tripanossomatídeos (DA SILVA et al., 2003).

Os diversos estudos ligados às naftoquinonas devem-se ao fato da incessante busca pelo lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] (**Figura 4**) que é um produto natural isolado de várias espécies de plantas da família Bignoniaceae, particularmente do gênero *Handroanthus* (LIMA, et al. 2004). Além de ser obtido a partir de fontes naturais, pode ser facilmente sintetizado (Da SILVA et al., 2010), e essas qualidades favorecem a síntese de outras substâncias com potenciais atividades farmacológicas, incluindo o desenvolvimento de novas drogas que atuem contra doenças negligenciadas (CASTRO et al., 2013).

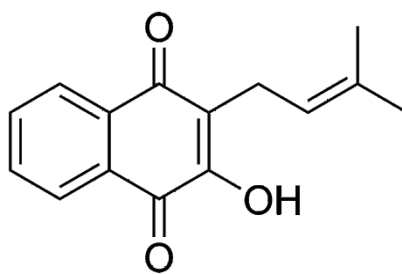


Figura 4 - Estrutura química do lapachol

O lapachol é conhecido desde 1858 e foi isolado pela primeira vez no final do século XIX por Paternó da espécie *Handroanthus impetiginosus* (*Tabebuia avellanedae* - ipê-roxo). Por apresentar importantes atividades biológicas, como, tripanossomicida, antitumoral, leishmanicida e redução da proliferação de queratinócitos, o lapachol tem sido muito estudado (MÜLLER, et al. 1999; BALASSIANO, et al., 2005; ZHANG, et al., 2016). Recentemente, foi demonstrado que o lapachol é um composto efetivo para preparo de substâncias bioativas, pois possui um núcleo de indol, que é uma estrutura chave presente em muitos compostos naturais biologicamente ativos e em diversos produtos farmacêuticos (FIORITO, et al., 2014). Devido a isso, há um grande esforço dedicado a estudar sua funcionalidade (FIORITO, et al., 2014).

Atovaquona[®], um derivado de lapachol, foi aprovado para o tratamento de pneumonia por *Pneumocystis*, toxoplasmose e malária. O lapachol também foi testado como agente anti-tumoral pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (EPIFANO et al., 2014). Essa substância já foi comercializada pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) para o tratamento do câncer. Possui também atividade antibacteriana contra bactérias do gênero *Brucella*, que são agentes etiológicos da brucelose e protozoários do gênero *Plasmodium* (FERREIRA, 1996).

O lapachol e seus derivados sintéticos já demonstraram efeito leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em trabalhos realizados por Lima et al. (2004) e Rocha et al. (2013). Com isso este trabalho investigou o potencial do lapachol tanto *in vitro* como *in vivo* contra uma cepa de *L. amazonensis* e uma de *L. infantum*.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Em razão disso, recomenda o diagnóstico rápido e o tratamento imediato dos casos para reduzir a propagação da doença (WHO, 2017).

Há mais de 70 anos os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (AM). Em casos de resposta insatisfatória aos antimoniais, o fármaco utilizado é a anfotericina b. Entretanto, ambos apresentam importantes limitações no que diz respeito à toxicidade elevada e seleção de parasitos resistentes. Devido a isso, a OMS recomenda, dentre outras estratégias, a busca de substâncias extraídas da flora que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses (WHO, 2017). O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de plantas, entretanto, poucas foram estudadas em relação às suas propriedades medicinais.

Como já mostrado, os tratamentos atuais para as leishmanioses possuem limitações importantes e são tóxicos aos pacientes, sendo assim, o desenvolvimento de novas terapias podem apresentar uma redução nos efeitos adversos e também diminuir os custos do tratamento.

A literatura relata que já existem produtos naturais promissores para o tratamento de leishmanioses. O lapachol já foi descrito na literatura como um desses produtos em testes *in vitro* e *in vivo* contra algumas espécies de *Leishmania*. Sabe-se que muitas espécies da família Bignoniaceae, principalmente os ipês, são ricas no composto lapachol.

O presente estudo objetiva a avaliação fitoquímica de *Handroanthus* sp, da família Bignoniaceae e avaliar suas propriedades leishmanicida, com a finalidade de propor o uso do lapachol como medicamento fitoterápico para o tratamento das leishmanioses.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida de lapachol obtido de *Handroanthus* sp por testes *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, e *in vivo*, em modelo murino de leishmaniose tegumentar.

3.2. Objetivos Específicos

- Coletar galhos de *Handroanthus* sp.
- Realizar identificação das espécies coletadas;
- Preparar extrato etanólico a partir dos galhos das diferentes espécies de *Handroanthus*;
- Realizar a caracterização fitoquímica preliminar dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico obtido dos galhos de *Handroanthus* sp;
- Purificar o lapachol a partir dos galhos coletados;
- Avaliar a atividade leishmanicida dos extratos etanólicos preparados a partir dos galhos de *Handroanthus* sp e do lapachol extraído de *H. serratifolius*, por testes *in vitro* em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade do lapachol extraído de *H. serratifolius*, por testes *in vitro* em culturas de células derivadas de um hepatoblastoma primário humano (HepG2);
- Avaliar a atividade do lapachol extraído de *H. serratifolius*, em amastigotas intracelulares de *L. infantum*;
- Avaliar a eficácia do lapachol em modelo murino de leishmaniose tegumentar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta, identificação e preparo do material

A coleta dos galhos, folhas, flores e frutos utilizados foi realizada no *campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, na cidade de Uberlândia-MG. Exemplares foram encaminhados ao Herbário/UFU para identificação e depósito de exsicata.

Os galhos foram desidratados, separadamente, em estufa com ar circulante, a 38°C por 72 horas e triturados em moinho de facas para que se reduzissem a pó. Depois de triturados, os farmacógenos passaram por um processo de maceração e percolação descontínua, que é um método de extração em temperatura ambiente, na qual a escolha do solvente é feita a partir da facilidade de dissolução da substância, por polaridade, e da facilidade com que se pode isolar o soluto extraído utilizando o aparato percolador (DUARTE, et al. 2014; SANTOS, et al. 2015). O solvente escolhido para a percolação descontínua foi o etanol comercial (95%).

A metodologia dos itens 4.2, 4.3 e 4.4 foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Minas Gerais, sob supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Alaíde Braga de Oliveira.

4.2. Prospecção fitoquímica

A caracterização fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se sílica gel 60G como fase estacionária. Foi avaliada a presença de quinonas empregando a fase móvel clorofórmio/acetato de etila (6:4) e como revelador foi utilizado CAM (Molibdato cérico de amônio) (WAGNER et al. 1984).

4.3. Extração química do lapachol

Com o objetivo de avaliar se, entre as substâncias presentes no extrato etanólico (EE) das espécies de *Handroanthus* sp., poderia ser encontrado o lapachol, 5g pó obtido das cascas das plantas foi depositado nas cavidades de uma placa de toque na presença de Na₂CO₃ 2% (p/v). As amostras que apresentaram coloração vermelho arroxeada foram consideradas como positivas para a presença dessa substância.

A extração do lapachol foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Ferreira (1996). Resumidamente, 200 g de serragem de *Handroanthus* foram colocados em um béquer de 2 L e, em seguida, adicionou-se 1 L de uma solução de Na₂CO₃ 2% (p/v). A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional com bastão de vidro, em temperatura ambiente. Após isso, houve a remoção dos resíduos insolúveis por filtração em papel filtro e foi adicionado uma solução de HCl 6M. Após a adição desse ácido, o lapachol começa a se concentrar na superfície da solução. Uma nova filtração foi realizada para separar o material sólido. Para cristalização, o material obtido da filtração foi colocado em chapa aquecedora com 20 mL de etanol.

4.4. Análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após o registro por CCD dos perfis obtidos do EE dos galhos de *Handroanthus* sp, o extrato foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para uma melhor caracterização dos componentes presentes no mesmo (HOSTETTMANN et al., 1997; SASIDHARAN et al., 2011). Para isto, 10 mg do EE e o padrão de lapachol (Sigma Aldrich Inc., EUA) foram solubilizados em 1mL de metanol P.A. grau CLAE (Tedia Company Inc., Ohio, EUA). Para que as amostras fossem completamente solubilizadas, as mesmas foram mantidas em banho de ultrassom por 15 min. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 8000 x g e o sobrenadante foi analisado por CLAE.

Para registro dos perfis cromatográficos, utilizou-se coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 250 x 4 mm d.i.) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 4 x 4 mm d.i.), com detecção no UV₂₂₀₋₄₀₀ nm, fluxo de 1mL/min., tempo de varredura de 70 min e com o forno da coluna em uma temperatura constante de 40°C. Com o objetivo de promover uma separação eficiente dos componentes dos extratos de *Handronthus* sp foi utilizada uma metodologia previamente padronizada por Brandão (2010). O método consiste em eluição em gradiente linear de 5 a 95%, empregando-se água ultrapura (Mili-Q) contendo 0,1% (p/v) de H₃PO₄ e acetonitrila contendo 0,1% (p/v) de H₃PO₄ como fases móveis (**Tabela 1**).

Os cromatogramas dos EEs foram comparados ao do lapachol comercial, que foi utilizado como referência para as análises que constam deste trabalho.

Tabela 1- Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD para registro dos perfis exploratórios do extrato etanólico de *Handroanthus* sp e do lapachol

Tempo	Água Mili-Q (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

Fluxo de 1ml/min

4.5. Parasitos e células

Nos ensaios conduzidos nesse projeto utilizamos *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401 e *L. amazonensis* cepa MHOM/BR/1989/Ba199, referências da OMS, células derivadas de um hepatoblastoma primário, HepG2 A16 e macrófagos imortalizados, linhagem RAW 264.7 provenientes do criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* - Departamento de Parasitologia/ICBIM-UFU, coordenado pelo o Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva.

4.6. Animais

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFU - CEUA/UFU (Protocolo CEUA/UFU nº 069/2013) (ANEXO 1).

Foram utilizados 18 camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - CBEA/UFU. Os animais foram mantidos no CBEA/UFU, sobre condições adequadas de manejo técnico, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e *Principles of Laboratory Animal Care* – NIH/EUA.

4.7. Ensaios *in vitro*

Os ensaios de eficácia e citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU.

Para a realização dos testes *in vitro*, os extratos e o lapachol foram diluídos em DMSO, em uma concentração estoque de 50mg/mL.

4.7.1. Eficácia *in vitro* dos extratos etanólicos de *Handroanthus* sp e do lapachol extraído de *H. serratifolius* sobre formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*

A concentração inibitória (CI₅₀) dos EEs obtidos de espécies do gênero *Handroanthus* para promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* foi avaliada por ensaio de viabilidade celular à base de resazurina (CORRAL et al. 2013). Promastigotas em fase logarítmica de crescimento ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço) foram semeadas em placas de 96 poços em meio α -MEM completo (*Minimum Essential Medium Eagle* (Sigma Aldrich Inc., EUA), suplementado 20mM de HEPES, 10% de soro bovino fetal (SFB), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) e incubadas a 26°C em atmosfera de 5% de CO₂ (CO₂ Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). Os EEs de *Handroanthus* sp e o lapachol extraído de *H. serratifolius* foram diluídos em meio α -MEM completo em na faixa de concentração de 200 a 6,25 μ g/mL, e a anfotericina b foi usada como controle positivo de tratamento. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação de viabilidade (controle negativo). Os EEs de *Handroanthus* sp, a anfotericina b e o lapachol em contato com os parasitos foram incubados durante 48 h. Quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada solução de resazurina a 10% v/v (Sigma-Aldrich Inc., EUA) nos poços e as placas mantidas por mais 4h a 26°C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, a intensidade de fluorescência (Spectramax M2, Molecular Devices LLC, EUA) foi determinada utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. A intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, foi utilizada para o cálculo da viabilidade celular. Todos os compostos foram testados em triplicata para cada concentração e foram realizados três experimentos independentes.

A CI₅₀ é a concentração dos compostos testes capaz de gerar redução de 50% no crescimento dos parasitos, refletindo em uma redução de 50% no valor da intensidade de fluorescência nos ensaios de resazurina, em relação ao controle (parasitos incubados com α -MEM completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão.

4.7.2. Ensaio de citotoxicidade do lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* sobre a linhagem celular HepG2

A linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano (Criobanco Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*), foi cultivada em garrafas plásticas de cultura celular de 75cm² em meio RPMI completo (10% de SFB, 20mM de HEPES, 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Subculturas (repiques) foram realizadas de três a cinco dias, quando foi realizada a contagem das células viáveis pela metodologia de exclusão por corante vital azul de tripan (0,4% p/v).

As células foram então incubadas (37°C, 5% de CO₂, 24 horas) em placa de 96 poços, em concentração ajustada para 5x10⁵ células/poço em meio RPMI completo, para aderência aos poços. Após o período de incubação, o meio dos poços foi esgotado e adicionado os compostos testes diluídos em RPMI completo nas concentrações de 1000 a 1µg/mL. As culturas de células permaneceram expostas ao lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* durante 48 horas (37°C, 5% de CO₂). Após o período de incubação, os poços foram esgotados, e foi adicionada solução MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma Aldrich Co, EUA) 50µg/poço. As placas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos (37°C, 5% de CO₂). Passado esse período foi adicionado DMSO para solubilizar os cristais de formazan gerados, e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (570nm) (MOSMANN, 1983; DUTTA et al., 2005).

Cada experimento foi repetido três vezes, e a densidade ótica (DO) foi obtida pelo valor da média ± desvio padrão das leituras das amostras, realizadas em triplicata nas placas, subtraído do valor médio da DO dos poços contendo somente células incubadas com meio completo (considerado 100% de viabilidade).

A concentração citotóxica (CC₅₀) corresponde a concentração dos compostos testes capaz de gerar redução de 50% no crescimento das células, refletindo em uma redução de 50% no valor da DO nos ensaios de MTT em relação ao controle, calculada por análise de regressão linear a partir dos dados obtidos em cada experimento.

4.7.3. Índice terapêutico *in vitro*

O índice terapêutico (IT) foi determinado pela razão CC_{50}/CI_{50} . As amostras que apresentaram valor de IT maior que 10 foram consideradas eficazes e com ação seletiva para *L. amazonensis* e *L. infantum* (BEZIVIN et al., 2003).

4.7.4. Ensaios de eficácia do lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* em macrófagos imortalizados infectados com *Leishmania infantum*

Ensaios com amastigota intracelular de *L. amazonensis* já são descritos na literatura (ROCHA, et al. 2013; COSTA, et al., 2017), sendo assim este trabalho priorizou a espécie *L. infantum* pois não existem resultados na literatura.

As culturas de promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento, foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo com a concentração ajustada para 5×10^6 células/mL. Os parasitos foram colocados para interagir com os macrófagos, previamente incubados (37°C, 5% de CO₂, 4 horas), em placas de 24 poços, contendo uma lamínula estéril/poço, em formato circular na proporção de 10 promastigotas/macrófago/poço. As placas foram novamente incubadas por 4 horas (37°C, 5% de CO₂) e os poços lavados com meio RPMI 1640 completo, aquecido a 37°C, para remoção de promastigotas não fagocitadas e células não aderidas (ESLAM e TANNER, 1994).

O lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* foi diluído em meio RPMI 1640 completo em diferentes concentrações respeitando os valores de CC_{50} e CI_{50} individuais obtidos previamente. Os macrófagos infectados foram incubados por 48 horas (37°C, 5% de CO₂) com o lapachol e anfotericina b (controle positivo de tratamento). Os demais controles do experimento foram: macrófagos infectados incubados somente com meio completo, e macrófagos não infectados com o lapachol e anfotericina b.

A taxa de infecção dos macrófagos (número de macrófagos infectados / número de não infectados, após contagem de 300 macrófagos por lamínula, em triplicata) foi determinada para o lapachol e comparada com a taxa de infecção do controle sem as drogas (100% de infecção). Os valores obtidos para cada concentração foram utilizados para obtenção do CI_{50} .

4.8. Ensaio *in vivo*

4.8.1. Teste de eficácia em modelo murinho

Para os ensaios *in vivo* de eficácia terapêutica do lapachol, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, 8 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g. Os animais foram infectados com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento (ricas em formas metacíclicas) de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199), na base da cauda (dia 0).

Trinta dias após a infecção (dia 30), os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, de acordo com a proposta terapêutica, conforme descrito a seguir:

Grupo 1: Seis animais que receberam, por via oral, lapachol (20mg/kg), solubilizado em PBS (pH= 8) durante 10 dias, com intervalo de 24 horas entre cada aplicação.

Grupo 2: Seis animais que receberam, por via IP, anfotericina b (1mg/kg) solubilizado em PBS durante 10 dias com intervalo de 24 horas entre cada aplicação;

Grupo 3: Seis animais que receberam, por via oral, solução salina estéril, a cada 24 horas, durante 10 dias em volume correspondente ao do lapachol.

Após o tratamento os animais foram mantidos no CBEA/UFU, onde receberam água e alimentação balanceada *ad libitum*. Durante todo o experimento os parâmetros ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas foram monitorados. Vinte dias após a última administração (dia 60) os animais foram eutanasiados.

4.8.2. Determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR)

Após a eutanásia as lesões da pele dos camundongos tratados foram coletadas, pesadas e transferidas para tubos de microcentrífuga estéreis para a determinação da carga parasitária por qPCR, e congeladas a -20°C até o uso. As extrações de DNA genômico foram realizadas em amostras de 20mg de pele da lesão utilizando o kit RealiapRep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Co., EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações da qPCR foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems

by Life Technologies, EUA), em triplicata e processadas em termociclador (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, EUA). Para determinar as cargas parasitárias foram utilizados iniciadores (direto L150 [5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT(G/C)CG AA-3'] e reverso L152 [5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAACCC C-3']) que amplificam um fragmento de 120pb da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp (DEGRAVE et al., 1994). As reações foram realizadas em 25µL de volume final contendo 100nM de cada iniciador, 1x GoTaq qPCR Master Mix (Promega Co., EUA) e 20ng de DNA. O número de cópias de DNA de *L. amazonensis* em cada amostra foi determinado a partir de regressão linear, na comparação com uma curva padrão, gerada com quantidades conhecidas de DNA de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199Ba199), diluído sucessivamente na razão dez (10^7 até 10^1 parasitos).

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação de fragmento do gene TNF- α de camundongos, utilizando os iniciadores (TNF-5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF-5411 5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'), que amplificam fragmento de 170pb (CUMMINGS & TARLETON, 2003). O gene TNF- α é expresso de forma constitutiva em todas as células e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade do DNA das amostras, além de ser utilizado como normalizador das reações (BUSTIN et al., 2009).

Para a análise dos resultados foram consideradas reações com eficiência entre 90-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de correlação entre as diluições do DNA dos parasitos e o Ct ($r^2 = 0,96-0,999$) (BUSTIN et al., 2009).

4.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com a natureza dos dados, pelos testes que mais se aplicaram a cada caso, com o auxílio dos programas de pacotes estatísticos GraphPad® Instat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e Origin® Pro 8.5 (OriginLab Corp, EUA).

Para calcular os valores de CI₅₀ e CC₅₀, foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes em triplicata.

O tipo de distribuição amostral foi verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na análise da carga parasitária, foram procuradas diferenças entre o lapachol, a anfotericina B e grupo controle utilizando o teste de ANOVA *one way*, seguido do teste Mann-Whitney como pós-*hoc*.

Em todos os testes foi observado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Coleta, identificação e preparo do material

As coletas foram realizadas na cidade de Uberlândia, no *campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Após a coleta foi preparada exsicata das espécies para identificação e posteriormente as mesmas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU) (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Dados botânicos das plantas coletadas

Nome científico	Família	Nome popular	Número de registro	Local da Coleta
<i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	Bignoneaceae	Ipê amarelo, ipê amarelo anão, ipê amarelo cascudo	73786	18°53'55.33"S 48°15'33.151"W
<i>Handroanthus ochraceus</i> (Cham.) Mattos	Bignoneaceae	Ipê amarelo, ipê do cerrado	73881	18°53'33.31"S 48°15'30.058"W
<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O.Grose	Bignoneaceae	Ipê amarelo, ipê amarelo da mata, pau d'arco	73875	18°53'02.4"S 48°15'32.6"W

De acordo com a metodologia proposta para o preparo dos extratos foram obtidas massas diferentes para cada espécie. A espécie com o maior rendimento foi *Handronathus serratifolius*. O rendimento da extração para cada espécie e a massa final obtida após realização de três percolações constam na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Rendimento dos extratos dos galhos das espécies de *Handroanthus* sp. pelo método de maceração com 350g de pó dos galhos

Espécie	Massa obtida de extratos (g)	Rendimento (%)
<i>Handroanthus crysotrichus</i>	22,97	6,6
<i>Handroanthus ochraceus</i>	19,69	5,6
<i>Handroanthus serratifolius</i>	39,84	11,4

Método de extração ver item 4.1

5.2. Prospecção Fitoquímica

Para identificar a presença de quinonas nas espécies *H. crysotrichus*, *H. ochraceus* e *H. serratifolius* foi realizada a prospecção fitoquímica por CCD. Na **Figura 5** pode-se

observar a presença de quinonas que aparecem como manchas de cor azul após a revelação com o reagente CAM. Lapachol puro foi utilizado como referência.

Todas as espécies apresentam uma mancha azulada com o fator de retenção (Rf) semelhante ao apresentado pelo padrão de lapachol, sugerindo que as quinonas encontradas nas três espécies de *Handroanthus* correspondem ao lapachol.

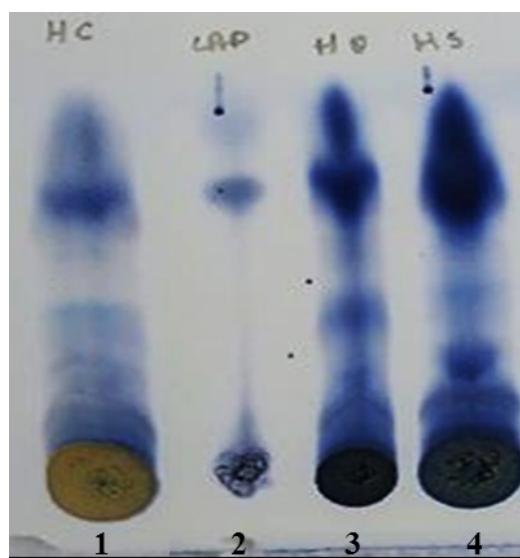


Figura 5 – Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras de *H. crysotrichus*, *H. ochraceus* e *H. serratifolius*. Revelador utilizado CAM. 1- *H. crysotrichus*; 2- Lapachol; 3- *H. ochraceus*; 4- *H. serratifolius*.

5.3. Extração química do lapachol

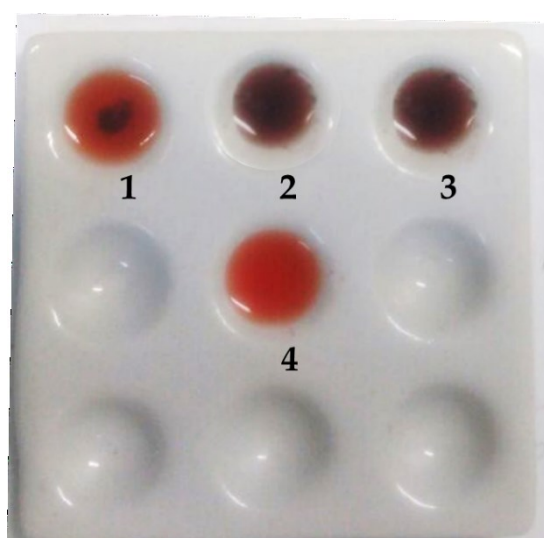


Figura 6 - Placa de toque com Na_2CO_3 para detecção de lapachol. 1- *H. serratifolius*; 2 – *H. crysotrichus*; 3- *H. ochraceus*; 4- Lapachol.

Quando realizado o teste a base de Na_2CO_3 para a detecção de lapachol nos EEs das três espécies de *Handroanthus* foi possível observar que apenas na espécie *H. serratifolius* tinha lapachol em quantidades detectáveis por esta metodologia, onde se observa a cor avermelhada nos poços da placa de toque (**Figura 6**). A partir desses resultados, o EE de *H. serratifolius* foi selecionado para a realização dos ensaios biológicos, extração química do lapachol e análises por CLAE. Ao final da extração, foram obtidos 2,8g de lapachol puro (rendimento de 1,4 %).

5.4. Análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), com varredura de 220 a 400 nm e detecção nos comprimentos de onda (λ) de 220, 280 e 350nm.

Os cromatogramas do EE obtido de *H. serratifolius* (**Figuras 7 e 8**) são de média complexidade, já o do lapachol (**Figura 8**) é simples, apresentando as seguintes características:

Extrato etanólico: apresenta picos que variam de muito fracos (% área < 5%) a fracos (% área entre 5 e 10%), na faixa de 1 a 12min assim como dos 18min ao fim da corrida. No tempo de retenção (TR) de ~13min há um pico majoritário (16,55% de área) com detecção no comprimento de onda de 220nm (**Figura 7**). Essas mesmas características são observadas quando o cromatograma é extraído com detecção no comprimento de onda de 280nm (**Figura 8**) com predominância do pico majoritário no TR ~13min. (29,09%).

Lapachol: possui um pico majoritário (79,09% de área) no TR~35min e absorção máxima no UV de 250,8nm, o que é esperado para essa substância, nessas condições cromatográficas (**Figura 9**).

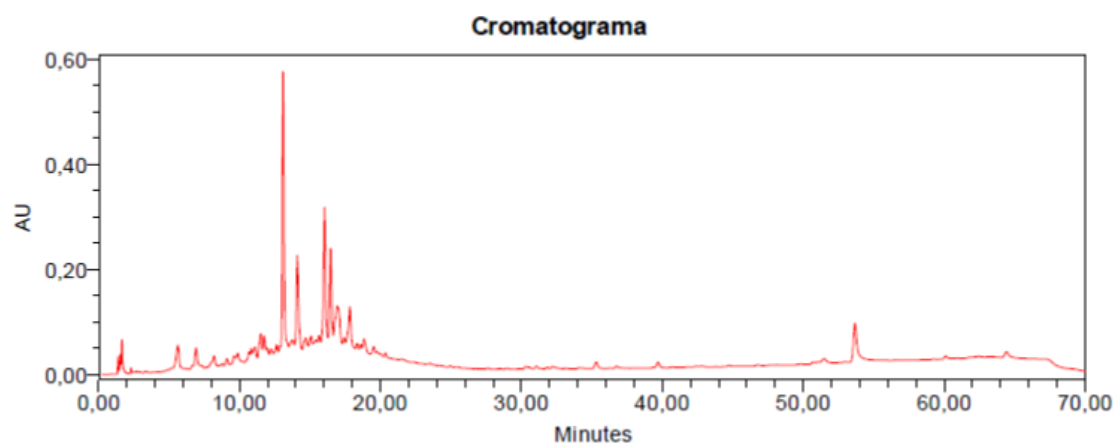


Figura 7 - Cromatograma do extrato etanólico obtido de *H. serratifolius* com detecção no comprimento de onda de 220nm.

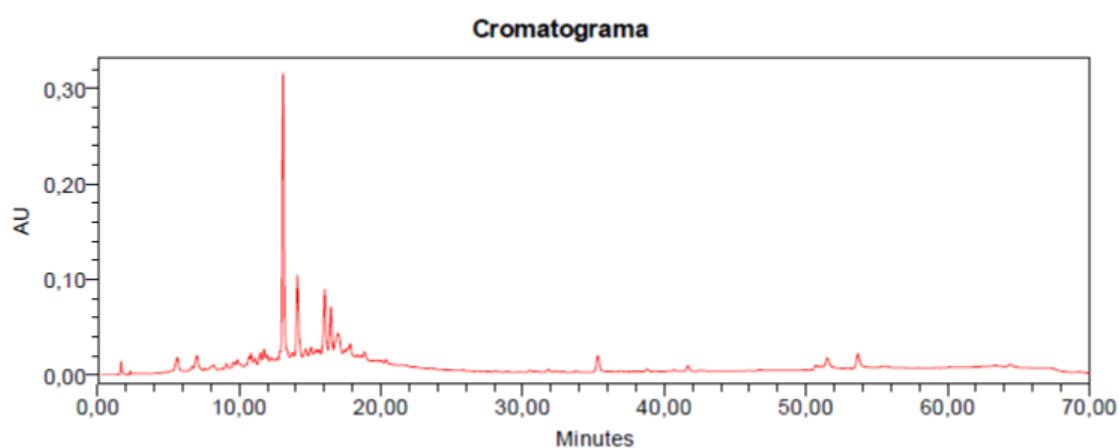


Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico obtido de *H. serratifolius* com detecção no comprimento de onda de 220nm.

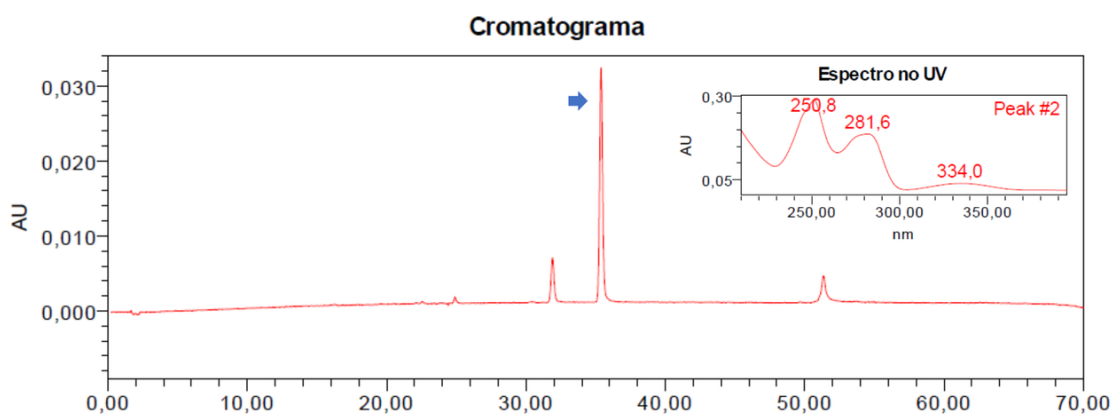


Figura 9 - Cromatograma do lapachol obtido de *H. serratifolius* com detecção no comprimento de onda 350 nm. Seta indica o pico majoritário no TR~35 min.

5.5. Ensaios de eficácia dos extratos etanólicos de *Handroanthus* sp e do lapachol extraído de *H. serratifolius* em modelo *in vitro* de leishmaniose

Foi realizada, inicialmente, uma triagem em duas concentrações (100 e 200 µg/mL) com os extratos etanólicos obtidos de *H. crysotichus*, *H. ochraceus* e *H. serratifolius* e também com o lapachol extraído de *H. serratifolius*. A redução do crescimento dos parasitos promovida pelos extratos e pelo lapachol foram expressas em percentual na **Tabela 4**.

Tabela 4- Redução do crescimento dos parasitos com os extratos etanólicos obtidos *H. crysotichus*, *H. ochraceus* e *H. serratifolius* e lapachol extraído de *H. serratifolius*

Extrato/ substância pura	Redução (%) 200 µg/mL		Redução (%) 100 µg/mL	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
<i>H. crysotichus</i>	0,02	31,97	0	17,53
<i>H. ochraceus</i>	2,13	26,16	0,31	22,29
<i>H. serratifolius</i>	10,05	76,36	8,53	44,88
Lapachol	97,45	87,42	79,15	74,92

Nesses testes, os EEs de *H. crysotichus* e *H. ochraceus* apresentaram redução de crescimento dos parasitos inferior a 50% de nas duas concentrações. Já o extrato de *H. serratifolius* apresentou redução maior que 50% na maior concentração, sendo assim foi utilizado para realizar a extração do lapachol e os testes *in vitro*.

Na **Tabela 5** observam-se os valores da CC₅₀, a CI₅₀ e o índice terapêutico (IT) e do lapachol extraído de *H. serratifolius*. O lapachol extraído de *H. serratifolius* apresentou CC₅₀ de 826,66 µg/mL; CI₅₀ de 19,38 µg/mL e 32,96 µg/mL; e IT de 42,65 e 25,08, para de *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente.

Tabela 5 - Valores de CC₅₀ determinados para células HepG2, valores de CI₅₀ determinados para formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* e índice terapêutico (IT) após incubação por 48 horas com lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* e anfotericina b

	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP		IT (CC ₅₀ /CI ₅₀)	
	HepG2	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
Lapachol	826,66 \pm 82,67	19,38 \pm 2,21	32,96 \pm 8,02	42,65	25,08
Anfotericina b	>1	0,055 \pm 0,02	0,048 \pm 0,02	>18,18	>20,47

DP: desvio padrão

>: indica que o valor de CC₅₀ não foi alcançado nas concentrações testadas

5.6. Ensaios de eficácia do lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* em macrófagos imortalizados infectados com *Leishmania infantum*.

O ensaio de eficácia sobre macrófagos imortalizados foi realizado com amastigotas de *L. infantum*. Macrófagos infectados e sem nenhum tratamento (controle não tratado) apresentaram uma taxa de infecção de 48% (**Figura 10A**).

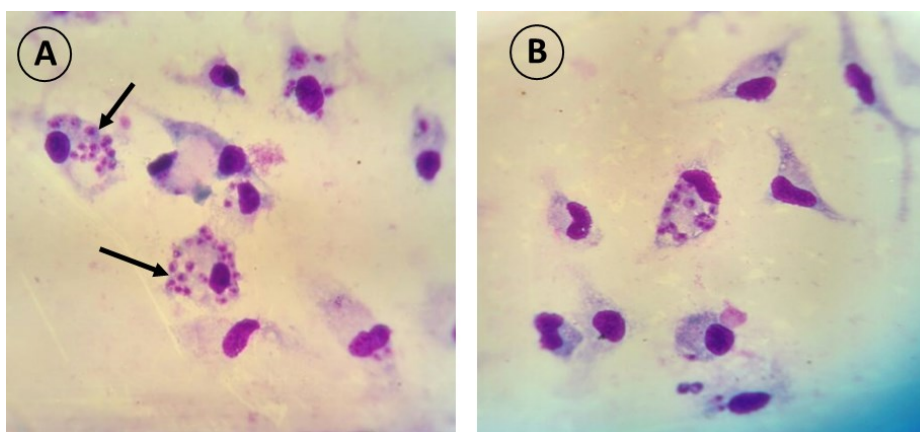


Figura 10 – Imagem representativa da infecção de macrófagos RAW 264.7 por amastigotas de *Leishmania infantum* (A) sem tratamento, setas indicam formas amastigotas (B) tratado com lapachol.

Neste ensaio pode-se observar que após o tratamento houve uma redução do número de macrófagos infectados com *L. infantum* em todas as concentrações testadas. A CI₅₀ do lapachol contra formas amastigotas intracelulares foi de 41,57 $\mu\text{g/mL}$. As

células tratadas com anfotericina b apresentaram taxa 0% de infecção na concentração de $1\mu\text{g/mL}$, sendo esta uma droga referência e foi utilizada como controle do experimento. A análise por microscopia de luz sugere que os macrófagos não sofreram alterações importantes na morfologia (tamanho médio alterado, vacuolização citoplasmática, núcleo com bordas irregulares, cromatina grosseira) quando expostos por 48h as diferentes concentrações de lapachol (**Figura 10B**).

5.7. Teste de eficácia em modelo murino de LTA

Vinte dias após o término do tratamento com o lapachol extraído de *H. serratifolius* foi realizada a eutanásia dos animais. Não foram observadas alterações macroscópicas importantes durante a coleta da pele. A **Figura 11** mostra o efeito do tratamento com lapachol sobre a carga parasitária na pele, determinada por qPCR.

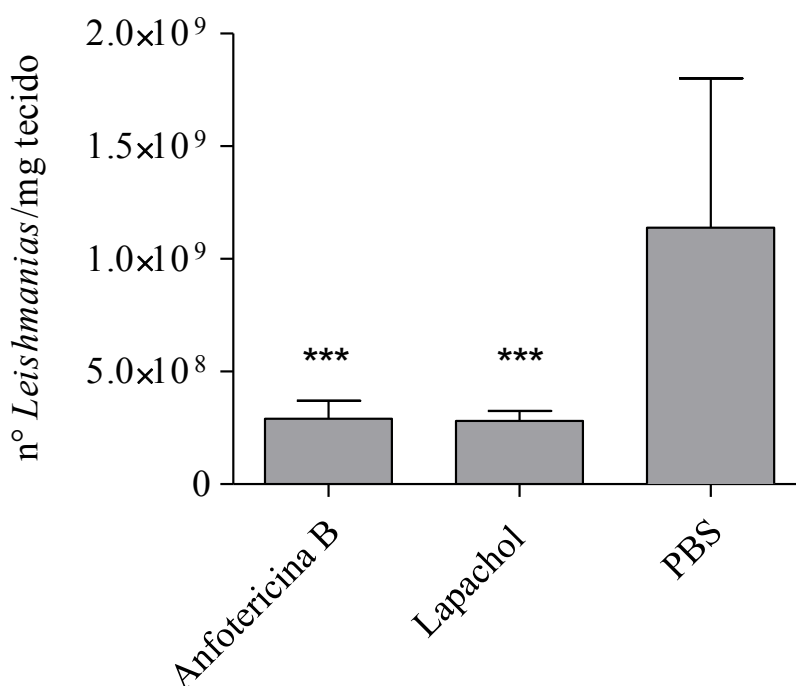


Figura 11 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) na pele de camundongos BALB/c infectados com 10^7 promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199), vinte dias após administração de lapachol (20mg/kg/24h/via oral). Grupo controle negativo: PBS em volume correspondente ao do lapachol/24h/via oral/10 dias; Grupo controle positivo de tratamento: Anfotericina b (1mg/kg/24h/via intraperitoneal/10 dias). Figura representativa de dois experimentos independentes de qPCR, em duplicata. Eficiência da reação = 100,026%; *slope* = -3,321; *Y-intercepts* = 33,306; $R^2 = 0,964$. Limite de detecção = 1 parasito/mg de pele.

O grupo controle tratado com PBS apresentou carga parasitária média de $1,14 \times 10^9$ parasitos/mg de tecido. Os resultados demonstram que tanto os animais tratados com lapachol quanto os tratados com anfotericina b apresentaram redução significativa da carga parasitária na pele, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$). Os resultados sugerem que o lapachol foi capaz de induzir redução média da carga parasitária da pele em 75,3%, sendo que o número médio de parasitos por miligrama de pele ($2,82 \times 10^8$) determinados nas amostras deste grupo, foi quatro vezes menor que o determinado para o grupo controle sem tratamento. De maneira similar, nos animais que foram tratados com a anfotericina b (controle positivo de tratamento) houve redução média da carga parasitária da pele em 74,6% e 3,9 vezes menos parasitos ($2,9 \times 10^8$) por miligrama de pele que o grupo controle.

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, por acometer a população mais vulnerável economicamente, sendo estimado que cerca de 90% dos pacientes infectados viva com menos de US\$ 1 por dia, e socialmente, pela falta de investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas diagnósticas e terapêuticas, além de medidas de controle mais eficazes (ALVAR, et al., 2006).

O controle das leishmanioses não se concentra em apenas uma medida, sendo assim, várias estratégias devem ser aplicadas em conjunto. De acordo com o ciclo das leishmanioses é possível identificar quais medidas de prevenção devem ser tomadas. No Brasil, as estratégias estão centradas no diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos, redução da população de vetores e uso de proteção individual da população, e a medida de controle mais utilizada para os reservatórios é a eliminação de cães infectados, sendo esta uma medida não eficaz como pode ser observado na literatura (COSTA, et al., 2007). Apesar de suas limitações, o tratamento ainda permanece como principal medida de controle para todas as formas clínicas das leishmanioses. Mesmo que as drogas usadas para tratar as leishmanioses apresentem várias limitações, esses compostos são as únicas opções terapêuticas disponíveis atualmente (ANDRADE, et al., 2016).

Na tentativa de encontrar novas drogas leishmanicidas, vários estudos mostram o potencial de produtos naturais para tratamento das leishmanioses. Nieto-Yañez (2017) demonstrou que o extrato metanólico de *Bursera aptera*, uma planta da família Burseraceae, foi eficaz contra formas promastigotas de *L. mexicana* na concentração de 0,408 mg/mL, quando comparados aos fármacos convencionais utilizados no trabalho, anfotericina b e estibogluconato de sódio. O extrato metanólico de *Euphorbia peplus*, da família Euphorbiaceae, demonstrou 100% de inibição contra promastigotas de *L. donovani*, atividade similar a anfotericina b (AMIN, et al., 2017). Mesa et al. (2017) realizaram um estudo mostrando que camundongos com LT tratados com *Artemisia annua* (folhas secas, maceradas e encapsuladas) (500mg/kg/dia) foram curados, apresentando fechamento total das úlceras, este trabalho também apresentou resultados de cura em dois seres humanos após tratamento de 30g ao longo de 20 dias, onde após o tratamento as úlceras causadas pela doença apresentaram cicatrização. Os pacientes permaneceram livre da doença após 24 e 26 meses.

Plantas da família Bignoniaceae são amplamente distribuídas em todo Brasil. Os ipês ocorrem naturalmente em floresta estaciobal, floresta de araucária e no cerrado e é uma das árvores mais cultivadas em todo o país (CHAGAS-JUNIOR, et al. 2010). Devido a abundância do lapachol encontrado nos ipês, a facilidade de extração e também a simplicidade da síntese é possível propor uma nova alternativa terapêutica barata para tratamento de doenças parasitárias. Os ipês possuem ampla distribuição e a extração química do lapachol é uma técnica simples e barata sendo possível produzir lapachol em larga escala (FERREIRA, et al. 1996).

Neste trabalho foram coletadas três espécies de *Handranthus* (*H. crysotrichus*, *H. ochraceus* e *H. serratifolius*) (ipês amarelos), para estudo do perfil fitoquímico, extração química de lapachol e avaliação da atividade contra *Leishmania* sp. Costa et al. (2017), também realizaram coleta de *Handroanthus serratifolius* para testar o EE da planta e o lapachol extraído contra *L. amazonensis*. Os autores demonstraram que foi possível realizar a extração química do lapachol e preparar o extrato etanólico que, entretanto, não foi ativo contra *L. amazonensis*, apresentando uma diferença em relação ao nosso trabalho onde os resultados mostram atividade leishmanicida tanto para *L. amazonensis* quanto *L. infantum*.

Neste trabalho, através da CCD foi possível observar que em todas as amostras havia manchas de cor azul, sugestivas da presença de naftoquinonas quando reveladas com o corante CAM (WAGNER, 1984). Porém, somente em *H. serratifolius* foi obtido lapachol em massa suficiente para os testes. O resultado negativo na placa de toque e na CLAE para *H. crysotrichus* e *H. ochraceus* pode ser justificado pelo fato do lapachol se encontrar no cerne do lenho das árvores da família Bignoneaceae, e os galhos coletados para o preparo dos extratos ainda não estavam maduros o suficiente para apresentarem essa substância em quantidades detectáveis pelos métodos utilizados (BARBOSA e NETO, 2013). Na coleta de *H. serratifolius* foi possível coletar galhos mais grossos com o cerne amarelado característico dos ipês, o que favoreceu a extração e obtenção de lapachol em quantidades adequadas para os experimentos. Como observamos na CLAE existe um pico majoritário nos cromatogramas do EE, não se encontrando no mesmo R_f do lapachol puro, mostrando que o EE tem outras substâncias presentes em sua composição.

Após a caracterização do lapachol foi testada sua eficácia *in vitro*. A escolha por realizar os ensaios *in vitro* de 48h de duração foi baseada em resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa avaliando formulações lipossomais (PORTA, 2015), e em testes de eficácia terapêutica de diferentes de extratos de plantas e seus metabólitos secundários das mais variadas classes (p. ex. alcaloides, flavonoides, naftoquinonas e terpenos), em que não foram observadas diferenças significativas nos valores de CC₅₀ e o CI₅₀ para esses extratos em ensaios de 24h, 48h e 72h.

Um critério importante no desenvolvimento de novos fármacos com ação leishmanicida é a busca por substâncias com menor toxicidade que as drogas utilizadas nos dias atuais (RISS, et al. 2016). Devido a isso, além de avaliar a eficácia dos EE de *Handroanthus* sp e lapachol sobre *L. infantum* e *L. amazonensis*, também foi avaliada a citotoxicidade destes extratos, por MTT, um método amplamente adotado para avaliação da viabilidade celular e estudos de proliferação em biologia celular.

O lapachol extraído de *H. serratifolius* apresentou valores de CC₅₀ (826,66 ± 82,67) elevados sugerindo baixa citotoxicidade deste composto. Em estudos que avaliaram a citotoxicidade do lapachol em outras linhagens celulares, os valores de CC₅₀ foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. Costa et al. (2017) obtiveram um resultado de >500µg/mL para lapachol e >100 µg/mL para anfotericina b quando testadas em células THP-1(linhagem de monócitos humanos). Rocha et al. (2013) também utilizaram células HepG2 apresentando um resultado de 201,77 µg/mL para lapachol e 644,59 µg/mL para anfotericina b, sendo estes valores menores quando comparado a este trabalho.

O lapachol apresentou importante atividade leishmanicida, entretanto, esta foi menor quando comparado com anfotericina b, nas duas espécies testadas. Lima et al. (2004) mostraram que o lapachol foi eficaz contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, tendo um CI₅₀ de 5,2 µg/mL e 11,9 µg/mL respectivamente. Rocha et al. (2013) mostraram que a concentração 15,48 µg/mL inibiu em 50% o crescimento de *L. amazonensis*. Ambos os trabalhos confirmam nossos dados, sugerindo que lapachol tem atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Este trabalho também mostra a atividade contra *L. infantum* tendo um valor de CI₅₀ 32,96 ± 8,02 e IT de 25,08. O fato dos outros extratos não apresentarem atividade leishmanicida

pode ser atribuído a menor quantidade de lapachol nos EEs em relação ao *H. serratifolius* e a presença de outras substâncias nos EEs das diferentes espécies de *Handroanthus*, que poderiam interferir na atividade leishmanicida destas espécies. Estudos devem ser conduzidos para identificar os possíveis de metabólitos secundários nos EEs das três espécies de *Handroanthus* capazes de interferir na atividade leishmanicida destas espécies.

Através das pesquisas realizadas concluímos que não existem relatos de ensaios que avaliaram a eficácia do lapachol contra *L. infantum*. Existem trabalhos que utilizam naftoquinonas, como Pinto et al. (2014) que sintetizaram 36 compostos a partir de 2-hidroxi-3-fenil sulfonyl metil- [1,4] –naftoquinonas, destes 32 mostraram eficácia contra promastigotas de *L. infantum* e 14 compostos com atividade contra amastigotas.

Após os testes citotoxicidade e da atividade leishmanicida em promastigotas, o lapachol foi testado contra amastigotas intracelulares em um ensaio de 48h. Os resultados sugerem que o lapachol foi capaz de reduzir a taxa de infecção de macrófagos em relação ao controle no tempo avaliado. O lapachol reduziu a infecção de macrófagos, com maior efeito observado a 80 µg/mL, tendo uma CI_{50} de 41,57 µg/mL. A atividade anti-amastigota do lapachol contra *L. braziliensis* foi descrita por Teixeira et al., (2001).

O mecanismo de ação do lapachol em *Leishmania* ainda não é claro, mas sabe-se que em células tumorais e em *Trypanosoma cruzi* esta substância inibe a respiração celular e interfere no metabolismo de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (HUSSAIN, et al., 2007; SALAS, et al., 2008; ALMEIDA, 2009). Santana et al. (1968) mostraram que o lapachol tem mecanismo de ação semelhante a outras quinonas como inibidor da oxidação e fosforilação mitocondriais e inibidor da oxidase succínica. Não existem até o momento dados na literatura mostrando o uso de lapachol contra formas amastigotas de *L. infantum*. Além do lapachol ter atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* o mesmo não foi tóxico para os macrófagos, não alterou a morfologia e apresentou baixa citotoxicidade, sendo promissor para medicamento, pois atinge somente o parasito e não a célula do hospedeiro.

Os resultados *in vitro* obtidos nesse trabalho confirmam estudos anteriores que sugerem que o lapachol apresenta atividade contra formas promastigotas e amastigotas de espécies causadoras de LTA (SANTANA, et al., 1968; TEIXEIRA et al., 2001;

ROCHA et al., 2013; COSTA, et al. 2017) e mostra que lapachol também apresenta atividade contra *L. infantum*, espécie causadora de LV. Acreditamos que, pela primeira vez, foi realizada a prova de conceito da atividade leishmanicida do lapachol contra promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, sugerindo que o produto natural pode vir a ser uma nova alternativa de tratamento.

Avaliação carga de *Leishmania* nos tecidos do hospedeiro foi proposto para que fosse possível realizar um monitoramento da resposta ao tratamento (MARY, et al., 2006; van der MEIDE et al., 2008; ROMERO, et al., 2010). A técnica de qPCR é amplamente utilizada em pesquisas e diagnóstico, pois fornece uma detecção rápida e é uma técnica precisa e sensível (LIN, et al., 2000; CUMMINGS, et al., 2003; KAMAU, et al., 2011).

A análise de dados da qPCR sugere que os animais que foram tratados tanto com o lapachol apresentaram redução significativa de carga parasitária na pele quando comparados com o grupo controle, e valores similares aos da droga referência, a anfotericina b.

Teixeira et al. (2001) testaram lapachol *in vivo* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. braziliensis* onde o mesmo não preveniu o desenvolvimento das lesões. Os autores sugerem que isto pode estar relacionado a inativação dessa substância pelo organismo do hospedeiro e/ou a cepa do parasito envolvida, o que resultaria em concentração do lapachol no sítio da lesão abaixo daquela necessária para controle da infecção. Segundo os autores, a dose utilizada no estudo provavelmente não foi suficiente para proporcionar níveis plasmáticos ideais que proporcionassem o efeito terapêutico desejado. Além dos fatores citados pelos autores, utilizamos modelo murino de LTA (camundongos), espécie de *Leishmania* (*L. amazonensis*), protocolo terapêutico e metodologia de avaliação da carga parasitária (qPCR, mais sensível que diluição limitante) diferentes daqueles utilizado por Teixeira et al. (2001), o que pode explicar as diferenças entre os dois trabalhos.

Trabalhos posteriores visando melhor esclarecimento sobre o mecanismo de ação do lapachol em *Leishmania* são necessários, pois nossos resultados sugerem que o lapachol, quando testado tanto *in vitro* como *in vivo*, causa redução no número de parasitos. O estudo do lapachol se faz necessário, pois esta substância pode servir como base para a produção de análogos com alvos cada vez mais específicos e com menor

toxicidade para o desenvolvimento de fármacos com ação leishmanicida, podendo ser testado o efeito sinérgico do lapachol com a anfotericina b e o seu uso encapsulado em lipossomas.

De maneira geral foi demonstrado a baixa citotoxicidade e o efeito leishmanicida do lapachol, *in vitro*, em *L. amazonensis* e *L. infantum*. Este efeito foi confirmado *in vivo*, em modelo murino de LTA, quando o lapachol foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária na lesão, de maneira similar a droga referência (anfotericina b). Estes resultados promissores nos permitiram propor novos estudos, já em andamento, para adequação da dose terapêutica, avaliação da toxicidade e da resposta imune, e de histopatologia. Além disso, testes de eficácia terapêutica do lapachol em modelo murino de LV, utilizando a espécie *L. infantum*, também estão sendo conduzidos.

7. CONCLUSÕES

- Foi possível confirmar a presença e extrair lapachol de *Handranthus serratifolius*;
- O lapachol extraído de *H. serratifolius* apresentou atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*;
- O lapachol extraído de *H. serratifolius* apresentou baixa citotoxicidade para células HepG2 apresentando um IT maior que 10 para as duas espécies utilizadas;
- O lapachol apresentou redução na taxa de infecção dos macrófagos por *L. infantum*, em relação aos grupos controle;
- O lapachol apresentou redução significativa na carga parasitária na pele de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 15 dias de tratamento, em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.R. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 42-47, 2009.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v.22, n.12, p. 552-7, 2006.

ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.194-197, 2010.

AMIN E.; MOAWAD, A.; HASSAN, H. Biologically-guided isolation of leishmanicidal secondary metabolites from *Euphorbia peplus* L. **The Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 236-240, 2017.

ANDRADE, M.A.; AZEVEDO, C.D.; MOTTA, F.N.; SANTOS, M.L.; SILVA, C.L.; SANTANA, J.M.; BASTOS, I.M. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 444, 2016.

ANTHONY J, FYFE L. SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 462-8, 2005.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinical Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v. 20, p. 185-194, 2006.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose visceral (Calazar). Tratado de infectologia: Atheneu, São Paulo; 1996. vol. 2, cap. 97; p. 1234-1259.

BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.

BALASSIANO I.T.; DE PAULO, S.A.; SILVA, N.H.; CABRAL, M.C.; CARVALHO, M.C.; Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports**, v.13, p.329–33, 2005.

BARBOSA JÚNIOR W.L.; RAMOS DE ARAÚJO, P.S.; DIAS DE ANDRADE, L.; AGUIAR DOS SANTOS, A.M.; LOPES DA SILVA, M.A.; DANTAS-TORRES, F.; MEDEIROS, Z. Rapid Tests and the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome Coinfection. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p.967-969, 2015.

BARBOSA, T.P.; NETO, H.D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. **Química Nova**, v.36, n.2, 2013.

BATES, P.A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 340-344, 2008.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BATISTA, R.; SILVA JUNIOR, A.J.; OLIVEIRA, A.B. Plant-derived antimalarial agents: New leads and efficient phytomedicines. **Molecules**, v. 14, p. 3037-3072, 2009.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, p. 499-503, 2003.

BHATTACHARYA, S.K., SINHA, P.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., JHA, T.K., PANDEY, K., DAS, V.R., KUMAR, N., LAL, C., VERMA, N., SINGH, V.P., RANJAN, A., VERMA, R.B., ANDERS, G., SINDERMAN, H., GANGULY, N.K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Journal Infectious Diseases**, v.196, n.4, p.591-8, 2007.

BRANDÃO, G.C. Fitoquímica, triagem antiviral e fracionamento biomonitorado de espécies vegetais da biodiversidade brasileira. 2010. 326 f. Tese de doutorado - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFMG, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral** grave: normas e condutas. Brasília: DF, 2006. s/p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CASTRO, S.L.; EMERY, F.S.; DA SILVA JUNIOR, E.N. Synthesis of 2,3- unsaturated O-glycosides: TeCl₃(OTf) as the catalyst for type I Ferrier rearrangement. **Tetrahedron**, v.69, p. 4524-4531, 2013.

CHAGAS JUNIOR, J.M.; CARVALHO, D.A.; MANSANARES, M.E. A família Bignoniaceae Juss. (Ipês) no município de Lavras, Minas Gerais. **Cerne**, v.16, n.4, p.517-529, 2010.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Natures review/microbiology*, v.5, p. 873-882, 2007.

CIPRIANI F.A.; FIGUEIREDO, M.R.; SOARES, G.L.G.; KAPLAN, M.A.C. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. *Química Nova*, v.3,5 n.11, 2012.

CORRAL, M.J.; GONZÁLEZ, E.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J.M. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 2, p.111-6, 2013.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 415-419, 2007.

COSTA, E.V.S.; BRÍGIDO, H.P.C.; SILVA, J.V.S; COELHO-FERREIRA, M.R.; BRANDÃO, G.C.; DOLABELA, M.F. Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae) **Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017.

COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 232-242, 2011.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53–59, 2003.

DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; de SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

DA SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; da CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 17, 2010.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p. 463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DU, R.; HOTEZ, P.J.; AL-SALEM, W.S.; ACOSTA-SERRANO, A. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.5, 2016.

DUARTE, J.L.; MOTA, L.J.T.; ALMEIDA S.S.M.S. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Ipê Amarelo) **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 4, n. 1, p. 33-43. Macapá, 2014.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-22, 2005.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochemistry Review**, v. 13, p. 37–49, 2014.

ESLAM, I. Z.; TANNER, C. E. Time course and intensity of infection in vitro in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 743-747, 1994.

FERREIRA, V.F. Extração do lapachol da serragem do Ipê. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA Conceitos de Ácido e Base nº 4, Novembro, 1996.

FERREIRA, V.F.; FERREIRA, S.B.; GONZAFA, D.T.G.; SANTOS, W.C.; ARAÚJO, K.G.L. β -lapachona: sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FIORITO, S.; EPIFANO, F.; BRUYÈRE, C.; MATHIEU, V.; KISS, R.; GENOVESE, S. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 454–457, 2014.

FISHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. Pp. 9–38. In: J. W. Kadereit (Ed). The families and genera of vascular plants. Nova York, Springer. 2004.

FONSECA, S.G.C.; BRAGA, R.M.C.; SANTANA, D.P. Lapachol: química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p. 71-80, 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p.1169-1180, 2005.

GRIENSVEN J. van; DIRO, E. Infectious Disease Clinics of North America, v. 26, p. 309–322, 2012.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 494-501, 2002.

HARHAY, M.O.; OLLIARIO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n.9. , p. 403 – 409, 2011.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research**, v. 63, n. 1, p. 210, 1997.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V.U.; MIANA, G.A.; GREEN, I.R. Lapachol: an overview. **ARKIVOC**, v.II, p. 145-171, 2007

KAMAU, E.; TOLBERT, L.S.; KORTEPETER, L.; PRATT, M.; NYAKOE, N.; MURINGO, L.; OGUTU, B.; WAITUMBI, J.N.; OCKENHOUSE, C.F. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay

for detection and quantitation of *Plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 2946 –2953, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1–24, 1990.

LAINSON, R.; SHAW J. J. New World Leishmaniasis. In Cox FEG, Wakelin D., Gillespie SH, Despommier DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10 th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases. London: Arnold, v. 5, p.241-66. 1998

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Petters & Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine. **Academic Press**, v. 1, p. 1-20. 1987.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

LIMA, G.S.; CASTRO-PINTO, D.B.; MACHADO. G.C.; MACIEL, M.A.M.; ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p.1133–1137, 2015.

LIMA, N.M.F.; CORREIA, C.S.; LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; MADEIRA, M.F.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antileishmanial activity of lapachol analogues.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 99, no. 7, pp. 757–761, 2004.

LIN, M.H.; CHEN, T.C.; KUO, T.T.; TSENG, C.C.; TSENG, C.P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38:p. 4121–4125, 2000.

LOHMANN, L.G. Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB112305>>. Acesso em: 11 julho. 2017

LORENZI, H. Árvores Brasileiras I, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: Nova Odessa, 1988.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARQUES, L.H.S.; ROCHA, I.C.M.; REIS, I.A.; CUNHA, G.M.R.; OLIVEIRA, E.; PFEILSTICKER, T.R.; ARAÚJO, V.E.M.; MORAIS, M.H.F.; RABELLO, A.; CARNEIRO, M. *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. **Parasitology**, v. 144, n. 4, p. 546-556, 2017.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.P.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic

monitoring and patient follow-up. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p. 858–863, 2006

MESA, L.E.; VASQUEZ, D.; LUTGEN, P.; VÉLEZ, I.D.; RESTREPO, A.M.; ORTIZ, I.; ROBLEDO, S.M. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.1, p.52-60, 2017.

MEYERHOFF, A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 42-48, 1998.

MICHALICK, M.S.M.; RIBERIRO, R.R., SILVA, S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. G. Parasitologia Humana. p. 41-47

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76–78, 2011.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1863–1888, 2013.

MORENO J; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 399-405, 2002.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MÜLLER, K.; SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential antipsoriatic agents: lapachol compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. **The Journal of Natural Product**, v.62, p. 1134–6, 1999.
- NIETO-YAÑEZ, O.J.; RESENDIZ-ALBOR, A.A.; RUIZ-HURTADO, P.A.; RIVERA-YAÑEZ, N.; RODRIGUEZ-CANALES, M.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; JUAREZ-AVELAR, I., RODRIGUEZ-LOPEZ, M.G.; CANALES-MARTINEZ, M.M.; RODRIGUEZ-MONROY, M.A. *In vivo* and *in vitro* antileishmanial effects of methanolic extract from bark of *Bursera aptera*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 14, n.2, p.188-197, 2017.
- OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M.; MESQUITA, A.A.L., ZANI, C.L.; FERREIRA, D.T.; MAIA J.G.S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceas brasileiras. **Química Nova**, v. 13, p. 302-307, 1990.
- OLMSTEAD, R.G.; ZJHRA, M.L.; LOHMANN L.G.; GROSE, S.O. & ECKERT, A.J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731-1743, 2009.
- PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v.78, n. 2, p.120-127, 2002.

PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; SOUSA-GOMES, M.L.; LIMA-JÚNIOR, F.E.F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, Brasília, v.20, n.1, p.107-110, 2011.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n.5891, p. 970-4, 2008.

PIMENTA, P. F., TURCO, S. J., MCCONVILLE, M. J., LAWYER, P. G., PERKINS, P. V., SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v.256, n. 5065, p. 1812-1815, 1992.

PINTO, E.G.; SANTOS, I.O.; SCHMIDT, T.J.; BORBOREMA1, S.E.T.; FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; TEMPONE, A.G. Potential of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]- Naphthoquinones against *Leishmania* (L.) *infantum*: Biological Activity and Structure-Activity Relationships. **Plos one**, v.9, n. 8, 2014.

PORTA, M. R. **Preparo, caracterização e eficácia *in vitro* de formulações lipossomais de circulação prolongada contendo miltefosina e antimonato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral**. 2015. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) -Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia-MG.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; M. D. Q. PAULO, M. D. Q.; FOURNET, A. Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 438–440, 1996.

RAMOS, A.; MÚÑEZ, E.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, J; R. MARTINEZ-RUIZ, CHICHARRO, C.; BAÑOS, I.; SUAREZ-MASSA, D.; CUERVAS-MONS, V. Mucosal leishmaniasis mimicking squamous cell carcinoma in a liver trans-plant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v.17, p.488–492, 2015.

RANGEL, E.F. & LAINSON R. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

RIBAS-SILVA R.C.; RIBAS A.D.; FERREIRA E.C.; SILVEIRA T.G.; BORELLI S.D. Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p.198, 2013.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514–535, 2005.

ROCHA, M.N.; NOGUEIRA, P.M.; DEMICHELI, C.; OLIVEIRA, L.G.; SILVA, M.M.; FRÉZARD, F.; MELO, M.N; SOARES, R.P. Cytotoxicity and *In Vitro* Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2013, 2013.

RODRIGUES-SANTOS, C.E.; LEON, L.L.; BORTOLUZZI, A.J.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; MACHADO, G.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis, antileishmanial activity and structure-activity relationship of 1-*N*-X-phenyl-3-*N'*-Y-phenyl-benzamidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p.166-174, 2013.

- ROMERO, I.; TÉLLEZ, J.; SUÁREZ, Y.; CARDONA, M.; FIGUEROA, R.; ZELAZNY, A.; SARAVIA, N.G. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 819, 2010.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in leishmaniasis. **The Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.
- SALAS, C.; TAPIA, R.A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, J.D.; MORELLO, A. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.2, p. 668-674, 2008.
- SALIBA, E. K.; OUMEISH, Y. O. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v. 17, p.275-277, 1999.
- SANTANA, C.F. DE; LIMA, O.G. DE; DÍALBUQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L.; MARTINS, D.G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (*Tabebuia avellaneda*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 8, n. 1/2, p. 89-94, 1968.
- SANTOS, R.F.E.P.; CONSERVA, L.M.; BASTOS, M.L.A.; CAMPESATTO, E.A. Avaliação do potencial biológico da *Tabebuia aurea* (Silva Manso) como fonte de moléculas bioativas para atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.17, n.4, supl. III, p.1159-1168, Campinas, 2015.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315–317, 1998.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y. SARAVANAN, D; SUNDRAM, K.M.; YOGA LATHA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v.8, n. 1 p. 1-10, 2011.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, p. 255-257, 1993.

SECUNDINO, N. F. C.; FREITAS, V. C.; PIMENTA, P. F. P. A Biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas* p. 90-101, 2011.

SHAW, J.J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: J Farrell, editors. *World Class Parasites: Leishmania*. London: Kluwer Academic Publishers Boston; 2002. p. 11-31.

SILVA, A.O.; LOPES, R.S.; LIMA, R.V.; TOZATTI, C.S.S; MARQUES, M.R.; ALBUQUERQUE, S.; BEATRIZ, A.; LIMA, D.N. Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* of substituted 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.60, p.51-56, 2013.

SILVEIRA F. T., LAINSON R., CORBETT C. E. 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.239-251, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. **International Review Cytology**, v. 99, p. 119-207, 1986.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose visceral. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>>, acesso em 10/06/2017.

SINDERMANN H.; CROFT L.; ENGEL K. R.; BOMMER W.; EIBL J.; UNGER C.; ENGEL J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**, 193: 173-180, 2004.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 44–48, 2001.

VAN DER MEIDE, W.F.; PEEKEL, I.; VAN THIEL, P.P.; SCHALLIG, H.D.; DE VRIES, H.J.; ZEEGELAAR, J.E.; FABER, W.R. Treatment assessment by monitoring parasite load in skin biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, using

quantitative nucleic acid sequence-based amplification. **Clinical and Experimental Dermatology**. v.33, p. 394 –399, 2008.

VILA NOVA, N. S. Alternativas fitoterápicas para o tratamento da leishmaniose. 2012 .147 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M.; Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 1. Berlim: Springer-Verlag, 1984. 320 p.

WORLD HEALTH ORGANIZAION (WHO). Leishmaniasis fact sheet. <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>, Acesso em 21/07/2017.

ZHANG, C.; YAN QU, Y.; NIU, B. Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, n.22, p. 5781-86, 2016.

ANEXOS

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 119/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 069/13

Projeto Pesquisa: "Formulação inovadora de lipossomas convencionais e furtivos contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral".

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013