

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE
EXTRATOS DE *Berberis* E DO CLORIDRATO DE BERBERINA PARA O
TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Gabriela Gonçalves Mendes Takarada

Uberlândia
Julho/2018

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE
EXTRATOS DE *Berberis* E DO CLORIDRATO DE BERBERINA PARA O
TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

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: Gabriela Gonçalves Mendes Takarada.
Orientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (ICBIM/UFU).
Co-orientadora: Dr^a. Renata Cristina de Paula (ICBIM/UFU).

Uberlândia

Julho/2018

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

T136a Takarada, Gabriela Gonçalves Mendes, 1992
2018 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade de extratos de Berberis e do cloridrato de berberina para o tratamento das leishmanioses [recurso eletrônico] / Gabriela Gonçalves Mendes Takarada. - 2018.

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.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.848>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Leishmaniose - Tratamento. 3. Berberina. 4. Doenças parasitárias. I. Silva, Sydnei Magno da, (Orient.). II. Paula, Renata Cristina de, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



Gabriela Gonçalves Mendes

"Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade de extratos de *Berberis* e do cloridrato de berberina para o tratamento das leishmanioses"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 24 de julho de 2018.

Prof. Dra. Sílvia Regina Costa Dias - CESJF/MG

Dra. Renata Cristina de Paula - PÓS DOC/UFU

Dra. Juliana Silva Miranda - ICBIM/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo (coordenador) - ICBIM/UFU

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Jaime e Rosana, e minha irmã Daniela, que lutaram para que esse sonho se tornasse realidade, obrigada por tudo que fizeram em prol de mim e da minha felicidade, serei eternamente grata por tudo.

Ao Cássio, meu marido, que manteve a paciência a compreensão e o companheirismo ao longo de todo o tempo, sempre pensando na minha felicidade e sucesso, me dando total apoio e amor em todos os momentos.

Ao meu orientador Sydnei Magno da Silva, exímio professor e pesquisador, que com sua orientação, sabedoria, dedicação e experiência, fez com que este trabalho fosse concretizado.

A minha Co-orientadora Renata Cristina de Paula, pelos ensinamentos, apoio, dedicação, e amizade durante toda a minha permanência no laboratório.

A técnica Juliana Silva Miranda pelos ensinamentos, apoio e amizade durante a execução do projeto.

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

Aos meus colegas de laboratório: Eliane, Iasmin, Karen e Marco que me ajudaram e auxiliaram ao longo desta jornada, além de toda amizade e apoio durante esse período. Os momentos que passamos juntos serão inesquecíveis.

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.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Obrigada!

Colaboradores do projeto

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

RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório que parasita a célula do sistema mononuclear fagocitário. As principais manifestações clínicas são a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). Na maior parte dos casos, os protocolos atuais de tratamento apresentam toxicidade e baixa efetividade. Além disso, esses parasitos estão se tornando cada vez mais resistentes aos métodos convencionais de tratamento. Devido a isso, a importância de encontrar novos tratamentos tornou-se crucial. Uma das alternativas é o uso de plantas medicinais. Sabe-se que plantas do gênero *Berberis* são utilizadas para tratar outras doenças como hipertensão e doenças gastrointestinais. Devido ao sucesso desta planta em outros tratamentos, o estudo de *Berberis* sp. na avaliação da atividade leishmanicida tornou-se importante para investigar abordagens fitoterápicas inovadoras para o tratamento da leishmaniose. Este trabalho estudou a eficácia *in vitro* e *in vivo* do cloridrato de berberina e extratos de *Berberis laurina* e *Berberis glazioviana* contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, analisando também a citotoxicidade em linhagem de células HepG2 A16 para ser determinado o índice terapêutico de cada substância. O cloridrato de berberina apresentou efeito mais citotóxico em altas concentrações nas células HepG2 ($CC_{50} = 88,20 \pm 19,30 \mu\text{g/mL}$), enquanto os extratos de berberina hidroetanólico, metanólico e etanólico apresentaram baixa citotoxicidade ($>1000 \mu\text{g/mL} 834,30 \pm 78,71 \mu\text{g/mL}$ e $557,85 \pm 69,75 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), além de apresentarem alta atividade leishmanicida e altos índices de seletividade para ambas as espécies de *Leishmania*. No estudo *in vivo*, utilizamos modelos murinos de leishmaniose visceral e tegumentar, demonstrando que o cloridrato de berberina a 10mg/kg e os extratos foram capazes de reduzir a carga parasitária no fígado e no baço. Em suma, este estudo apresentou resultados na atividade leishmanicida utilizando o cloridrato de berberina e extratos de *Berberis* contra cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis* associados a citotoxicidade moderada e baixa. Além disso, os resultados obtidos, sugerem que estas substâncias são fortes candidatas no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas derivadas de produtos naturais para o tratamento da leishmaniose com alta eficácia e reduzindo os efeitos colaterais.

Palavras-chave: Cloridrato de berberina, *Berberis laurina*, *Berberis glazioviana*, tratamento, *Leishmania*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by an obligate intracellular protozoal which parasite the phagocytic mononuclear system cell. The main clinic manifestations are cutaneous (CL) and visceral leishmaniasis (VL). In most cases the current treatment protocols present toxicity and poor effectiveness. Furthermore, these parasites are becoming more resistant against conventional treatment methods. Therefore, the importance of finding new treatments has become crucial. An alternative is to use, essentially, medicinal plants. It is known that plants of the genus *Berberis* are used to treat other diseases as hypertension and gastrointestinal disorders. Due to successes of this plant in other treatments, the study of *Berberis* sp. leishmanicidal activity has become crucial to investigate phytotherapeutic innovative approaches for the leishmaniasis treatment. This research studied the in vitro and in vivo efficacy of berberine chloride and extracts of *Berberis laurina* and *Berberis glazioviana* against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* along with the cytotoxicity against HepG2 A16 cells to determine the therapeutic index of each substance. Berberine chloride presented a more cytotoxic effect as an active constituent at high concentrations in the HepG2 cells ($CC_{50} = 88.20 \pm 19.30 \mu\text{g/mL}$), while the hydroethanolic, methanolic and ethanolic berberine extracts presented low cytotoxicity in HepG2 cells ($>1000 \mu\text{g/mL}$; $834.30 \pm 78.71 \mu\text{g/mL}$ and $557.85 \pm 69.75 \mu\text{g/mL}$) and high anti-*Leishmania* activity and selectivity indexes against promastigotes of both *Leishmania* species. In the in vivo study, we used murine models of visceral and cutaneous leishmaniasis, demonstrating that berberine chloride (10mg/kg) and the extracts were able to reduce the parasite load in the liver and spleen. In conclusion, this study presented outcomes of the leishmanicidal activity using berberine chloride and berberine extracts against *L. infantum* and *L. amazonensis* associated with moderate and low cytotoxicity. Furthermore, the results obtained, suggest that this substance is a promising candidate to develop new therapeutic alternatives derived from natural products to treat leishmaniasis with high efficacy, reducing side effects.

Keywords: Berberine chloride, *Berberis laurina*, *Berberis glazioviana*, treatment, *Leishmania*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-DAD para registro dos perfis exploratórios dos extratos de <i>B. laurina</i> , <i>B. glazioviana</i> e do cloridrato de berberina ..	29
Tabela 2 - Dados botânicos das plantas coletadas	36
Tabela 3 - Rendimento dos extratos dos galhos das espécies de <i>Berberis</i> sp.	36
Tabela 4 - Redução do crescimento dos parasitos com os extratos obtidos de <i>B. laurina</i> e <i>B. glazioviana</i> em percentual	41
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 o índice terapêutico (IT)	42

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	17
Figura 2 - Prevalência da leishmaniose visceral no mundo, 2015. Fonte: WHO (2018).....	19
Figura 3 - Prevalência da leishmaniose tegumentar no mundo, 2015. Fonte: WHO (2018). .	20
Figura 4 - Estrutura química da berberina.....	24
Figura 5A - Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras dos extratos de berberina e para o cloridrato de berberina padrão.....	37
Figura 5B - Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras dos extratos de berberina e para o cloridrato de berberina padrão.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 - Cromatogramas dos extratos metanólico de <i>B. laurina</i> (A), hidroetanólico acidificado de <i>B. laurina</i> (B), etanólico de <i>B. glazioviana</i> (C) e do cloridrato de berberina padrão (D).....	40
Figura 7 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) na pele de camundongos BALB/c infectados com 1×10^7 promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (MHOM/BR/1989/Ba199).....	43
Figura 8 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com 1×10^7 promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (MCAN/BR/2002/BH401)	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Antimoniato de meglumina

CC₅₀: Concentração citotóxica em 50%

CCD: Cromatografia em camada delgada

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade ótica

EtOH: Etanólico

MeOH: Metanólico

H₂O-EtOH: Hidroetanólico

ICB/UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

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*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão fosfato salino

PSG: *Promastigote Secretory Gel*

qPCR: *Polymerase chain reaction quantitative real time*

Rf: *Retention fator*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SFB: Soro fetal bovino

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

UPLC-DAD: *ultra high performance liquid chromatography – diode array detector*

WHO: *World Health Organization*

α-MEM: *Minimum Essential Medium Alpha modification*

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Leishmanioses	15
1.2.	Transmissão e ciclo biológico	16
1.3.	Leishmaniose visceral no Brasil.....	17
1.4.	Leishmaniose tegumentar americana no Brasil	19
1.5.	Tratamento das leishmanioses.....	21
1.6.	Etnofarmacologia	22
2.	JUSTIFICATIVA.....	25
3.	OBJETIVOS	26
3.1.	Objetivo Geral.....	26
3.2.	Objetivos Específicos.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1.	Coleta, identificação e preparo do material.....	27
4.2.	Preparo dos extratos de <i>Berberis laurina</i> e <i>Berberis glazioviana</i>	27
4.3.	Prospecção fitoquímica	28
4.4.	Análise das amostras por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD)	28
4.5.	Parasitos e células.....	29
4.6.	Animais	29
4.7.	Ensaios <i>in vitro</i>	30
4.7.1.	Eficácia <i>in vitro</i> do cloridrato de berberina e dos extratos de <i>B. laurina</i> e <i>B. glazioviana</i> sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i>	30
4.7.2.	Ensaio de citotoxicidade do cloridrato de berberina e dos extratos de <i>B. laurina</i> e <i>B. glazioviana</i> sobre a linhagem celular HepG2.....	31
4.7.3.	Índice terapêutico <i>in vitro</i>	32
4.8.	Ensaios <i>in vivo</i>	32
4.8.1.	Teste de eficácia em modelo visceral murino	32
4.8.2.	Teste de eficácia em modelo tegumentar murino.....	33
4.8.3.	Determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR).....	34
4.9.	Análise estatística.....	35
5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Coleta, identificação e preparo do material.....	36
5.2.	Prospecção fitoquímica	37
5.3.	Análise das amostras por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD)	38

5.4.	Ensaios de eficácia do cloridrato de berberina e dos extratos de <i>B. laurina</i> e <i>B. glazioviana</i> em modelo <i>in vitro</i> de leishmaniose.....	41
6.	Teste de eficácia em modelo murino de LTA	42
7.	Teste de eficácia em modelo murino de LV.....	44
8.	DISCUSSÃO.....	46
9.	CONCLUSÕES.....	50
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	Anexo 1	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por um protozoário intracelular obrigatório do sistema mononuclear fagocitário, pertencente a classe Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (MANSUETO et al., 2014; VALDIVIA et al., 2015). Atualmente, mais de 98 países são endêmicos para as leishmanioses e, dentre esses, o Brasil está como um dos principais em casos de leishmanioses (DESJEUX, 2004; WHO, 2018).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam diferentes formas evolutivas em seu ciclo de vida, sendo elas: amastigota, promastigota e paramastigota, sendo as duas últimas são móveis e apresentam flagelos. A forma amastigota se desenvolve e multiplica-se em um hospedeiro vertebrado, mais especificamente nas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), sendo elas imóveis e sem flagelo aparente, além disso, apresentam um núcleo oval e cinetoplasto pequeno, em forma de bastão (SONODA, 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença sistêmica grave que atinge diversos órgãos como, por exemplo, baço, fígado e linfonodos. A LV é causada por *Leishmania donovani* e *L. infantum* sendo esta última o agente etiológico no Brasil e em outros países da América, enquanto que a *L. donovani* é o agente etiológico nos países da Eurásia e África (GRIENSVEN e DIRO, 2012; WILSON et al., 2005). Os principais sintomas da LV são: febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, podendo levar ao óbito (BADARÓ, et al., 1996).

A leishmaniose tegumentar (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 clinicamente em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa ou anérgica (LCD) (CHAPPUIS et al., 2007; RAMOS et al., 2015). Pacientes acometidos pela leishmaniose cutânea apresentam uma ou várias úlceras na pele; a leishmaniose cutânea mucosa ocasiona ulcerações nas mucosas como, por exemplo, na boca e nariz, podendo causar a mutilação da face. Já o indivíduo com a leishmaniose cutânea difusa apresenta feridas não ulceradas, porém com uma grande quantidade de parasitos no local (RIBAS-SILVA et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Houve, nos últimos anos, um grande avanço na prevenção e no diagnóstico da doença, sendo o tratamento dos doentes, a principal medida profilática. Porém, a mortalidade e morbidade das leishmanioses ainda apresentam uma taxa de crescimento alta, em torno de 20.000 a 30.000 casos de óbito anualmente no mundo (WHO, 2018).

1.2. Transmissão e ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxenos, pois precisam de dois hospedeiros para completar o seu ciclo, um vertebrado e outro invertebrado. Os hospedeiros vertebrados, podem ser mamíferos pertencentes às ordens Carnivora (cães e gatos), Xenarthra (tatus e preguiças), Marsupialia (gambás), Primata (humanos e não humanos), Rodentia (ratos) (LAINSON e SHAW, 1987) e o hospedeiro invertebrado, são insetos vetores da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, denominados flebotomíneos. Dentre as novecentas espécies de flebotomíneos descritos, cerca de 10% são potenciais vetores de *Leishmania*, sendo eles dos gêneros *Lutzomyia*, encontrado nas Américas, e *Phlebotomus*, na Eurásia e África (BRUSCHI e GRADONI, 2018).

O ciclo (**Figura 1**) se inicia quando fêmeas de flebotomíneos se infectam ao realizar o repasto sanguíneo em algum hospedeiro mamífero infectado, ingerindo formas amastigotas presentes em células do SMF (KAYE e SCOTT, 2011; WHO, 2018). A ingestão de formas amastigotas, ocorre a transformação em promastigotas procíclicas no intestino médio do vetor, que se multiplicam intensamente. Os estágios de diferenciação, determinados como metacilogênese, transformam-se posteriormente em promastigotas metacíclicas (forma infectante do parasito). As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do flebotomíneo e são regurgitadas em um novo hospedeiro vertebrado ao realizar novo repasto sanguíneo (KAYE e SCOTT, 2011; CDC, 2018). Acredita-se que a regurgitação das formas infectantes é garantida por meio da produção de uma glicoproteína, a PSG (*promastigote secretory gel*), que é secretada pelas promastigotas metacíclicas. A PSG consegue obstruir a passagem do alimento durante o repasto sanguíneo levando o flebotomíneo a regurgitar as leishmanias na saliva, composta por substâncias imunomoduladoras, anestésicas e vasoativas, juntamente com as formas infectantes, no local da picada (PIMENTA et al., 1992; COURAS, 2005; BATES, 2007).

Após o repasto sanguíneo, as formas infectantes do parasito (promastigotas metacíclicas) são liberadas no SMF do hospedeiro vertebrado e fagocitadas por macrófagos atraídos pela reação inflamatória local, uma vez internalizadas e formado o vacúolo fagolisossomal,

diferenciam-se em amastigotas, que se reproduzem por divisão binária até ocorrer o rompimento celular. Após o rompimento, as formas amastigotas são liberadas, permitindo que ocorra uma nova reinfecção de novos fagócitos locais. O ciclo se completa quando os fagócitos infectados são ingeridos pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (LAINSON e SHAW, 1987; KAYE e SCOTT, 2011; CDC, 2018).

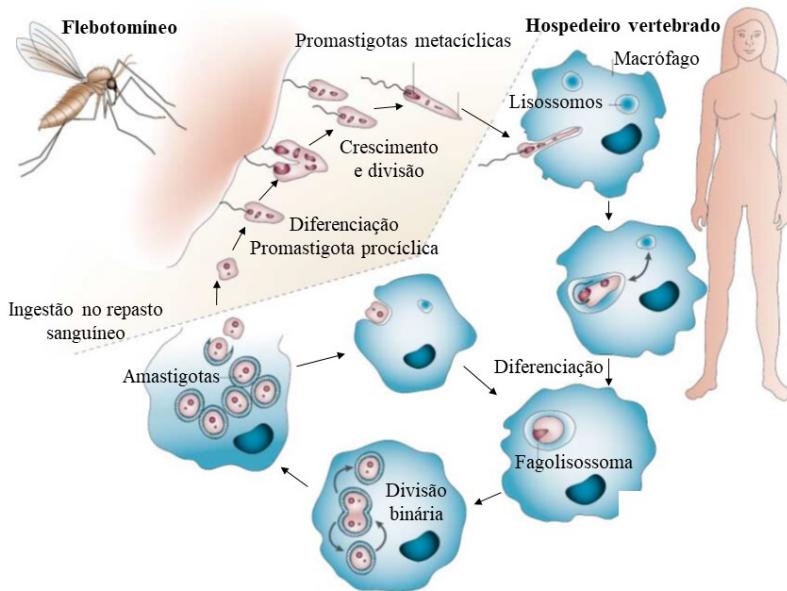


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de (SACKS e TRAUTH, 2002)). Os flebotomíneos ingerem células infectadas durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do vetor, formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, por divisão binária, se desenvolvem e migram para a probóscide como formas de promastigotas metacíclicas. Durante o repasto sanguíneo, as promastigotas metacíclicas são regurgitadas em hospedeiros mamíferos vertebrados. Nestes, são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas, onde se transformam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, até ocorrer o rompimento celular. Após o rompimento, passam a ser fagocitadas por outras células fagocíticas mononucleares ou serão ingeridas pelos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo.

1.3. Leishmaniose visceral no Brasil

A LV é considerada endêmica em 35 países, sendo que mais de 90% dos novos casos notificados ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (**Figura 2**). São notificados cerca de 300.000 novos casos de LV a cada ano, destes, de 20.000 a 30.000 casos chegam ao óbito. A LV é endêmica nas Américas, com o Brasil sendo

responsável por 96% dos casos (WHO, 2018), tendo sido notificados 3.200 novos casos em 2016 (265 óbitos) e 4.511 casos em 2017 (323 óbitos) (BRASIL, 2018).

A região Nordeste do Brasil, era a que apresentava o maior índice de casos de leishmaniose visceral na década de 90. No entanto, os dados epidemiológicos dos últimos dez anos apontam surtos ocorridos em diversas regiões do país, como no Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, principalmente em regiões urbanas. O aumento da prevalência da doença na região urbana pode estar associado principalmente devido a migrações entre populações, a adaptação de vetores ao meio urbano, ao desmatamento e às mudanças ambientais (ROCHA et al., 2005).

A LV consiste em uma infecção que pode ser causada por *L. donovani* e *L. infantum* sendo estas com ocorrências maiores de casos em países do Velho e Novo Mundo respectivamente (GRIENSVEN e DIRO, 2012). Até o momento, duas espécies de flebotomíneos, estão relacionadas com a transmissão do parasito no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, que é o principal vetor no país e possui alta capacidade adaptativa, e *L. cruzi*, na qual já foi encontrado infectado por *L. infantum* nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, porém, ainda não apresentou importância epidemiológica confirmada. No Brasil, os flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, entre outros (SANTOS et al., 1998; MISSAWA et al., 2011).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral dependem da resposta imune do hospedeiro, podendo ser assintomático ou apresentar sintomas como febre, esplenomegalia, anemia, hepatomegalia, astenia e tosse seca, e outras complicações respiratórias (BRASIL, 2006; WHO, 2018).

Na área urbana, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do parasito; no ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são os reservatórios mais comumente encontrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

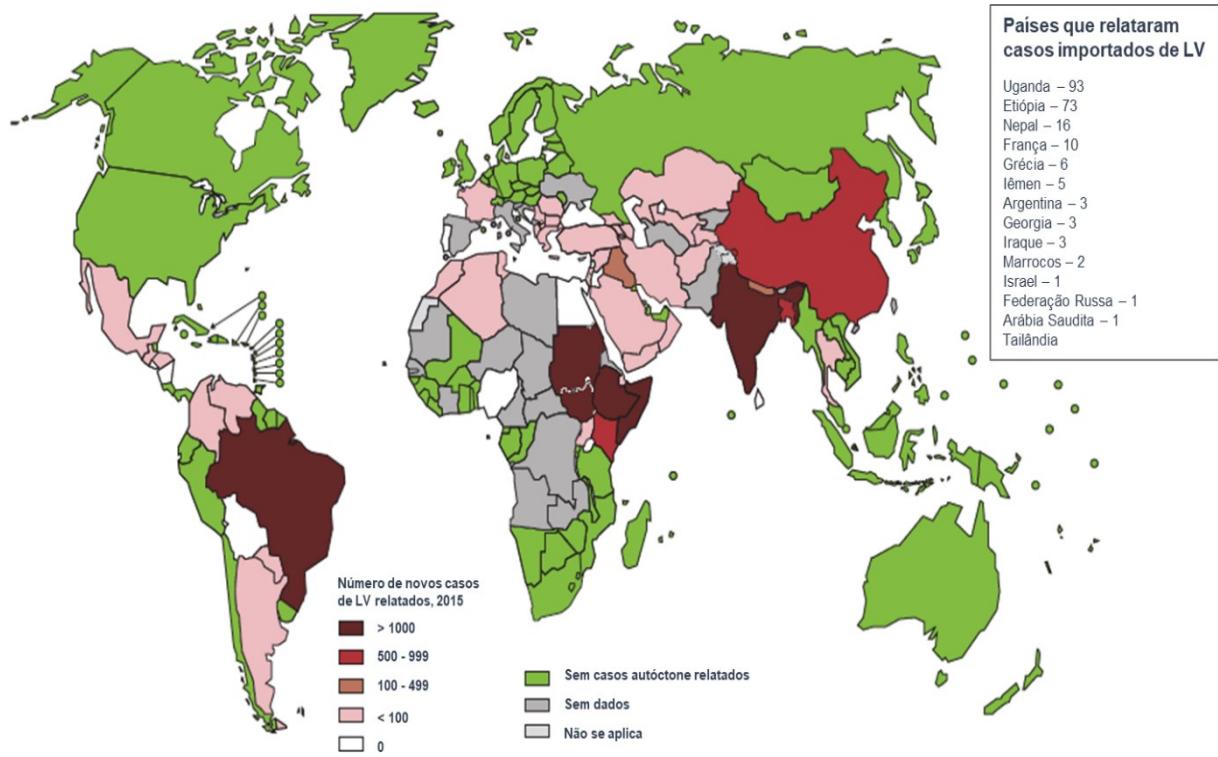


Figura 2 - Prevalência da leishmaniose visceral no mundo, 2015. Fonte: WHO (2018).

A grande importância da LV na saúde pública deve-se a expansão geográfica para áreas que eram consideradas livres da doença, a reemergência em focos endêmicos antigos e a alta letalidade em humanos, principalmente nos indivíduos não tratados ou com tratamentos tardios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Sendo que, quando não tratada, essa doença pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (WHO, 2018).

1.4. Leishmaniose tegumentar americana no Brasil

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma enfermidade de pele e mucosas, que é causada por algumas espécies de *Leishmania* em países da América. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1 milhão de casos de LT são notificados anualmente (**Figura 3**). No Brasil, a LTA é considerada endêmica no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste. No ano de 2015, de acordo com o SINAN, o Brasil confirmou 20.817 casos de LT (SINAN, 2017).

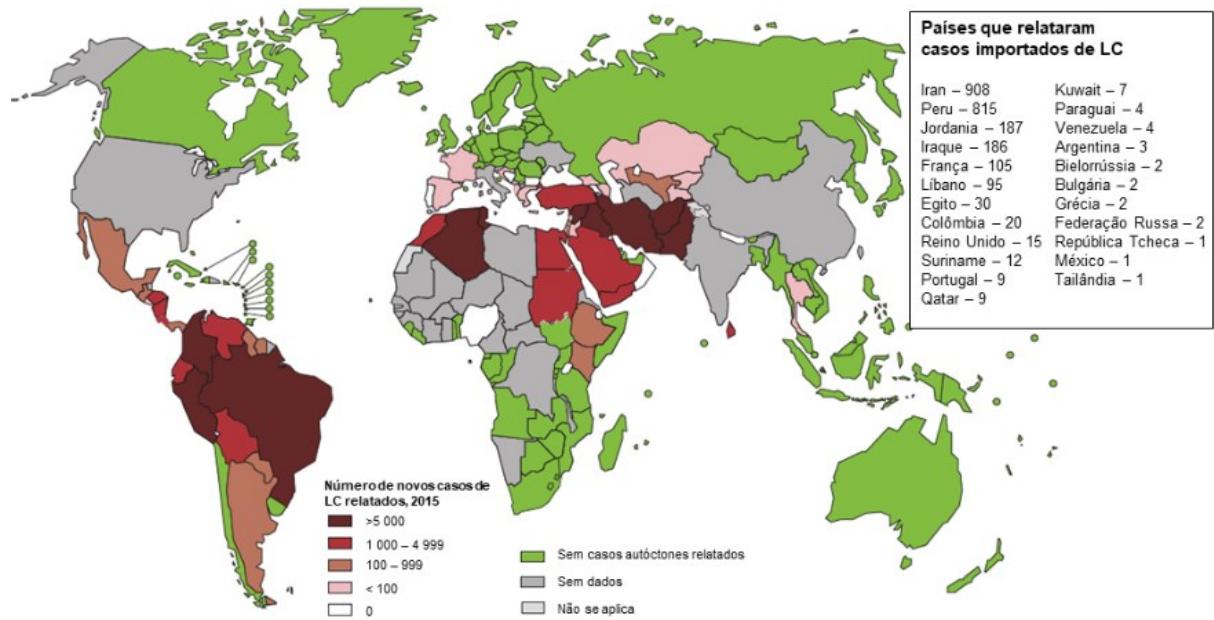


Figura 3 - Prevalência da leishmaniose tegumentar no mundo, 2015. Fonte: WHO (2018).

Lainson e Shaw (1987), subdividiram os subgêneros de *Leishmania* em: subgênero *Leishmania* e subgênero *Viannia*. No continente americano existem 11 espécies de *Leishmania* causadoras da LTA no homem, e oito espécies que acomete apenas animais. No Brasil, há sete espécies; seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi*; e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Entretanto, as que ocorrem com maior frequência no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (LAINSON e SHAW, 2005).

Os flebotomíneos mais descritos atualmente são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. Existem relatos do encontro das espécies de *L. neivai* e *L. fischeri* em ambientes domiciliares, em áreas de transmissão da doença, porém ainda não são vetores comprovados da LTA (LAINSON e SHAW, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Já os principais reservatórios do parasita são roedores, marsupiais e canídeos (LAINSON e SHAW, 2005).

No Brasil, podem ser destacados três padrões de transmissão de LTA: silvestre, rural e periurbano. A transmissão silvestre ocorre através de surtos epidêmicos associados à derrubada das matas (construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras) e à exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura, mineração). A transmissão rural ocorre através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. Nestes casos, a infecção tem lugar na interface da área peridomiciliar e nas áreas de

mata, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura, estando ligada às flutuações da densidade populacional dos flebotomíneos. Já a transmissão periurbana ocorre de forma endemo-epidêmica, em áreas de colonização antiga onde há suspeita da participação de animais domesticados (cães e equinos) como importantes reservatórios de parasito (BASANO e CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O controle de LTA no Brasil ainda é complexo e difícil de ser estabelecido devido aos padrões epidemiológicos e a variedade de vetores, reservatórios, ecossistemas, hospedeiros e agentes etiológicos da doença (SILVEIRA et al., 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Por isso, atualmente o controle passa diretamente pelo diagnóstico e tratamento dos doentes, sendo que várias estratégias de intervenção vêm sendo utilizadas para atuar no controle e prevenção das leishmanioses. A principal medida de controle no homem continua sendo a quimioterapia (WHO, 2017)

1.5. Tratamento das leishmanioses

Atualmente os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha mais utilizados atualmente, sendo eles o antimoniato de N-metil d-glucamina (AM) e o estibogluconato de sódio, sendo que este último não é comercializado no Brasil (ALVARENGA, et al., 2010; LIMA, et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2018).

O uso clínico de antimoniais pode ocasionar efeitos adversos, como náusea, vômito, fraqueza, cólica abdominal, mialgia, diarreia, hepatotoxicidade, erupções cutâneas e cardiotoxicidade (GUERIN et al., 2002). Além disso, os resultados obtidos utilizando estes produtos são considerados insatisfatórios, devido à sua alta toxicidade e falta de eficácia em alguns casos de LV (RIBEIRO et al., 2014).

A anfotericina b é uma droga alternativa indicada para o tratamento em gestantes, pacientes que apresentam contraindicações ao uso dos antimoniais pentavalente e pacientes com LV que não respondem ao tratamento com antimoniais (ROCHA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014; LIMA et al., 2015). Atualmente existem dois tipos de anfotericina b: o desoxicolato de anfotericina b e a anfotericina b lipossomal (AmBisome®, Gilead Sciences, Inc, EUA), sendo a eficácia dessas apresentações comparáveis, entretanto a forma lipossomal apesar de ter custo mais elevado apresenta uma menor toxicidade, do que a desoxicolato de anfotericina b (MEYERHOFF, 1998).

A anfotericina b é um antibiótico da classe dos poliênios, uma droga fungicida que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp., que age sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasito, sendo o seu mecanismo de ação, a ligação preferencial com ésteres que estão presentes na membrana plasmática da *Leishmania*, em especial o ergosterol, na qual irá provocar uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasita por lise osmótica (LEMKE et al.; 2005; FILIPPIN, 2006; WHO, 2018).

Apesar da anfotericina b ser considerada a droga leishmanicida mais eficaz atualmente, é também considerada tóxica, podendo apresentar efeitos colaterais, como febre, cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios, dor lombar, anorexia, comprometimento da função renal e distúrbios de comportamento (PELISSARI et al., 2011; RODRIGUES-SANTOS, 2013).

Atualmente, existe outro tipo de medicamento, a hexadecilfosfocolina (miltefosina) que foi incorporada ao grupo de medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses. É importante ressaltar que este é o primeiro medicamento administrado por via oral com eficácia no tratamento da doença. Entretanto, também apresenta efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e problemas gastrointestinais por ser administrado via oral (BHATTACHARYA et al., 2007).

Todos os agentes quimioterápicos citados para o tratamento das leishmanioses são considerados tóxicos, e podem provocar efeitos adversos (PELISSARI et al., 2011; RODRIGUES-SANTOS, 2013). Por isso, os pacientes em tratamento com algum fármaco devem ser acompanhados por equipe médica para monitorar esses efeitos mesmo após o fim da quimioterapia para verificar qualquer piora após o tratamento inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Assim, uma combinação de drogas ou o surgimento de novos fármacos, é considerado interessante, devido ao fato de poderem apresentar vantagens terapêuticas, como, uma maior eficácia em pacientes refratários à terapia convencional, menos efeitos colaterais, baixa toxicidade e menor tempo de tratamento (VAN GRIENSVEN, 2010). Devido a isso, se faz necessário novas opções de tratamento com a finalidade de atingir esses objetivos.

1.6. Etnofarmacologia

Nos últimos anos, plantas medicinais e produtos naturais vêm sendo muito utilizados para a prevenção e controle de diversas doenças e até como tratamentos (BATISTA et al., 2009; LIMA et al., 2015). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faz uso “experimental”

de plantas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OUÉDRAOGO et al., 2012; WHO, 2017). Entretanto, ainda existem muitas espécies vegetais que possuem substâncias que não foram ainda estudadas sobre as possíveis bioatividades, e que são utilizadas pela população como possível tratamento ou profilaxia de doenças infecciosas (RODRIGUES, 2006; ALVES, et al., 2007).

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, com mais de 46.000 espécies catalogadas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017). Entretanto, apenas 8% dessas espécies foram estudadas, e, por isso, os princípios ativos na maioria dos produtos vegetais encontrados no Brasil ainda são desconhecidos (VARANDA, 2006).

As plantas apresentam em sua composição metabólitos secundários, tais como: alcaloides, terpenoides, flavonoides, lignanas e naftoquinonas, sendo que várias dessas substâncias já são descritas na literatura como ativas na atividade leishmanicida (QUEIROZ et al., 1996; ROCHA et al., 2005).

As primeiras substâncias puras isoladas de plantas foram datadas no século XIX, extraíndo-se principalmente de ácidos e bases orgânicas. Na época, essas bases foram denominadas de alcaloides, por apresentarem propriedades semelhantes às substâncias alcalinas (SANTOS e PINTO, 2012). Tais substâncias podem ser muito potentes, quer na sua forma natural ou como seu derivado sintético (EVANS, 2009; SOUZA et al., 2012).

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas que pertencem ao grupo das aminas cíclicas, que podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos, na qual podem estar presentes compostos com um ou mais átomos de nitrogênio. Os alcaloides possuem estruturas complexas que permitem seus usos em medicamentos, podendo atuar, por exemplo, como estimulantes do sistema nervoso central. Entretanto, podem causar reações negativas, como a dependência física e psíquica, e, por isso, o seu uso depende de prescrição médica (DEWICK, 2001).

A Berberidaceae é uma família de plantas angiospérmicas, pertencente à ordem Ranunculales, que compreende 17 gêneros e cerca de 1.470 espécies (THE PLANT LIST, 2010). Sua distribuição ocorre nas regiões temperadas do Hemisfério Norte, e em alguns lugares da América do Sul (PONTIROLI, 1967; MARCHIORI, 1997). Plantas do gênero *Berberis* são nativas das matas de altitude e de pinhais. No Brasil, sua distribuição se dá a partir do sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (MATTOS, 1967).

Sobre a anatomia das berberidáceas, Metcalfe e Chalk (1972a), relacionam a presença de vasos muito pequenos, com elementos vasculares extremamente curtos, com placas de

perfuração simples, pontoações alternas e espessamentos espiralados na parede, de raios homogêneos, considerados altos e largos, e de fibras extremamente curtas, septadas em alguns gêneros e com pequenas pontoações simples na parede, sendo a sua principal característica a presença de berberina nos tecidos vegetais. As berberidáceas não apresentam parênquima axial e a estratificação de elementos vasculares. Sendo assim, por possuírem essas características anatômicas, pode considerá-las moderadamente evoluídas (MARCHIORI, 1997).

A berberina (**Figura 4**) é considerada um alcaloide quaternário. Além disso, é um alcaloide oxigenado, inodoro, não volátil e que se cristaliza facilmente, sendo muito utilizada em chás, para diferentes tratamentos de doenças, como hipertensão, arritmia e problemas gastrointestinais (DERMARDEROSIAN, 2001; FATEHI-HASSANABAD et al., 2005; MOHSEN IMANSHAHIDI e HOSSEIN HOSSEINZADEH, 2008).

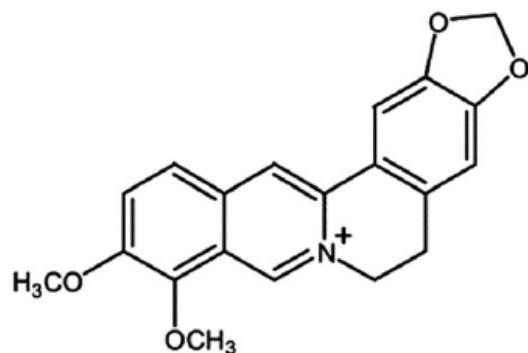


Figura 4 - Estrutura química da berberina.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças parasitárias que causam muitas mortes anualmente no mundo e os métodos de tratamento além de serem completamente eficazes, são considerados tóxicos aos pacientes. Também tem sido observado crescente número de casos de resistência dos parasitos aos fármacos leishmanicidas já existentes. Devido a isso, há uma necessidade de estudar novos métodos de tratamento para combater as leishmanioses, e dentre eles está o uso de produtos naturais.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o estudo de substâncias extraídas da flora que possam ser empregadas na obtenção de fármacos para o tratamento das leishmanioses (WHO, 2018). E, apesar do Brasil ser um país com grande variedade de espécies de plantas, poucas são estudadas com a finalidade medicinal.

A literatura relata que já existem substâncias provenientes de plantas medicinais para o tratamento de leishmanioses, como aquelas obtidas de plantas do gênero *Berberis*, que apresentam alcaloides com potente atividade leishmanicida (MAHMOUDVAND et al., 2014). Além disso, *Berberis* sp. é utilizada em tratamentos de outras doenças, como hipertensão, arritmia e problemas gastrointestinais (MOHSEN IMANSHAHIDI e HOSSEIN HOSSEINZADEH, 2008). Portanto, justifica-se o estudo das propriedades medicinais das espécies do gênero *Berberis*, com caracterização fitoquímica, padronização dos extratos e avaliação de sua citotoxicidade e eficácia terapêutica *in vitro*, com a finalidade de propor o uso dos mesmos como medicamentos fitoterápicos para o tratamento das leishmanioses.

Assim, o objetivo deste estudo é proporcionar resultados para o avanço no tratamento das leishmanioses, promovendo aumento em sua eficácia e reduzindo o custo do tratamento, limitando a resistência aos fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida, *in vitro* e *in vivo*, do cloridrato de berberina e de extratos de *Berberis laurina* e *Berberis glazioviana* em *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

3.2. Objetivos Específicos

- Coletar galhos de *B. laurina* e *B. glazioviana* e realizar identificação das espécies coletadas;
- Preparar extratos a partir dos galhos de *B. laurina* e *B. glazioviana*;
- Realizar a caracterização fitoquímica preliminar dos metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos dos galhos de *B. laurina* e *B. glazioviana*;
- Avaliar a atividade leishmanicida dos extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana* e do cloridrato de berberina; por meio de testes *in vitro* em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana* e do cloridrato de berberina; por meio de testes *in vitro* em culturas de células derivadas de um hepatoblastoma primário humano (HepG2);
- Avaliar a eficácia dos extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana* e do cloridrato de berberina em modelo murino de leishmaniose tegumentar e visceral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta, identificação e preparo do material

As coletas dos materiais vegetais utilizados foram realizadas nas regiões de Camanducaia e Espera Feliz, localizadas no estado de Minas Gerais. Exemplares foram encaminhados ao herbário do ICB/UFMG 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. Após trituração, o material vegetal foi submetido a diferentes processos de extração.

A metodologia dos itens 4.2. 4.3. 4.4. e 4.5 foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Minas Gerais, sob supervisão da Profª. Drª. Alaíde Braga de Oliveira.

4.2. Preparo dos extratos de *Berberis laurina* e *Berberis glazioviana*

Para a obtenção da berberina, diferentes metodologias (BRASIL, 2010) foram utilizadas para o preparo dos extratos de caules de *B. laurina* e *B. glazioviana*:

- Extrato metanólico de *Berberis laurina*: 50g de pó foram colocados em 200 mL de metanol e deixou-se em repouso no freezer a -20°C por 48h. Em seguida, esta mistura foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador, sendo o seu rendimento de 1,46g.

- Extrato hidroetanólico com HCl 0,1% de *Berberis laurina*: 200g de pó foram colocados em 650 mL de uma solução hidroetanólica (1:1 v/v) acidificada com 0,1% de HCl 2N. Foi realizado o processo de maceração por 4 dias, ou seja, deixou-se o pó em contato com o solvente por 4 dias em temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo foi filtrado e concentrado em um rotaevaporador, sendo o seu rendimento de 42,07g.

- Extração etanólica de *Berberis glazioviana*: 50g de pó foram colocados em 250 mL de etanol comercial 96%. Esse material foi submetido à sonicação em banho de ultrassom durante 30min. Este procedimento foi repetido seis vezes, para obter uma melhor extração de metabólitos secundários. Em seguida, passou-se pelo processo de filtração e concentração em rotaevaporador, sendo o seu rendimento de 1,74g.

4.3. 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 berberina empregando as fases móveis de clorofórmio/metanol (7:3) e como reveladores foram utilizados Dragendorff e Anisaldeído sulfúrico (WAGNER, et al., 1984).

4.4. Análise das amostras por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD)

Após o registro por CCD dos perfis obtidos dos extratos dos galhos de *B. laurina* e *B. glazioviana*, os extratos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD), para melhor caracterização dos componentes presentes no mesmo (HOSTETTMANN et al., 1997; SASIDHARAN et al., 2011). Para isto, 10 mg de cada extrato e 1 mg do padrão de cloridrato de berberina (Sigma Aldrich Inc., EUA) foram solubilizados em 1mL de metanol P.A. grau UPLC-DAD (Tedia Company Inc., Ohio, EUA). Em seguida foram sonicadas em banho de ultrassom por 15 min. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 r.p.m. seguido de filtração em filtros de seringa com membrana 0,22 µm. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos tipo *vial* e analisados por UPLC-DAD.

Para registro dos perfis cromatográficos, foi utilizado um perfil o qual teve como fase estacionária coluna Acquit C-18 (partículas de 1,7 µm, 100 x 2,1 mm d.i. – Waters[®]), e fase móvel um gradiente linear constituído por uma mistura de água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e acetonitrila acidificada a 0,1% de ácido fórmico, conforme **Tabela 1**. O fluxo manteve-se em 0,3 mL/min., tempo de varredura de 28 min e com o forno da coluna em uma temperatura constante de 40°C. O detector fez uma varredura em 200-400 nm, com registro em 280 nm e volume de injeção de 2 µL.

Os cromatogramas dos extratos foram comparados ao do cloridrato de berberina padrão, que foi utilizado como referência para as análises que constam neste trabalho.

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-DAD para registro dos perfis exploratórios dos extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana* e do cloridrato de berberina.

Tempo	Água Mili-Q 0,1% ácido fórmico (%)	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico (%)
0	95	5
24	5	95
26	5	95
28	95	5

Fluxo de 0,3 ml/min; Temperatura: 40°C; Fase estacionária: coluna Acquit C-18 (partículas de 1,7 µm, 100 x 2,1 mm d.i. – Waters®); volume de injeção: 2 µL; Fase móvel: gradiente linear composto por água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (B): 0 min: 95% A e 5% B, 24 min.: 5% A e 95% B; 26 min.: 5% A e 95% B e 28 min.: 95% A e 5% B.

4.5. Parasitos e células

Nos ensaios realizados nesse projeto utilizamos as cepas *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) e *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199), referências da OMS, e células derivadas de um hepatoblastoma primário, HepG2 A16 provenientes do criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* - Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia/ICBIM-UFU, coordenado pelo 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 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 Bioensaio em *Leishmania* do ICBIM/UFU.

Para a realização dos testes *in vitro*, os extratos foram diluídos em DMSO e o cloridrato de berberina foi diluído em metanol, em concentração estoque de 50mg/mL e 25mg/mL respectivamente.

4.7.1. Eficácia *in vitro* do cloridrato de berberina e dos extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* sobre formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*

Primeiramente, foi realizada uma triagem nas concentrações de 100 e 200 µg/mL com o extrato metanólico e hidroetanólico acidificado obtidos da *B. laurina* e o extrato etanólico obtido da *B. glazioviana*, para avaliar a redução do crescimento dos parasitos promovida pelos extratos. Em seguida, avaliou-se a concentração inibitória (CI₅₀) dos extratos obtidos de espécies do gênero *Berberis* para promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonenses*, sendo 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 plaqueadas em 96 poços com meio α-MEM completo (Minimum Essential Medium Eagle - Sigma Aldrich Inc., EUA), suplementado com 20mM de HEPES, 10% de soro bovino fetal (SFB), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e incubadas a 26°C em atmosfera de 5% de CO₂ (CO₂ Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). Os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* foram diluídos em meio α-MEM completo em diferentes concentrações, e a anfotericina b foi usada como controle positivo de tratamento. Parasitos não submetidos aos extratos foram utilizados para comparação de viabilidade (controle negativo). Os extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana* e a anfotericina b em contato com os parasitos foram incubados durante 48h. Vinte e quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada solução de resazurina a 10% v/v (Sigma-Aldrich Inc., EUA) nos poços. 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 concentração inibitória (CI_{50}) do cloridrato de berberina para promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer com solução de azul de tripan (0,4% p/v). Em se tratando de um corante vital, ao observar microscopicamente, as formas do parasito que apareceram coradas foram consideradas mortas, enquanto que as vivas não reagiram com o corante, permanecendo descoloradas.

A CI_{50} é a concentração dos compostos teste 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 cloridrato de berberina e dos extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* 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 5×10^5 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 desejadas. As culturas de células permaneceram expostas ao cloridrato de berberina e aos extratos de *Berberis* sp. durante 48 horas (37°C, 5% de CO₂). Após o período de incubação, os poços foram esgotados, e foi adicionada solução MTT {brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazol)} (Sigma Aldrich Co, EUA) 50µg/poço. As células viáveis com metabolismo ativo, convertem o MTT em cristais de formazan (MARSHAL et al., 1995; RISS et al., 2016). Em seguida, 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 a 570nm (MOSMANN, 1983; DUTTA et al., 2005).

Cada experimento foi realizado em triplicata, 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 (CC_{50}) 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).

4.8. Ensaio *in vivo*

4.8.1. Teste de eficácia em modelo visceral murino

Para os ensaios *in vivo* de eficácia terapêutica do cloridrato de berberina e para os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana*, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, 8 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g. Os animais foram infectados com $2,5 \times 10^7$ promastigotas em fase estacionária de crescimento (ricas em formas metacíclicas) de *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), via intraperitoneal (dia 0).

Os animais foram tratados durante 10 dias com intervalo de 24h entre as aplicações. Vinte dias após a infecção (dia 20), os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, de acordo com a proposta terapêutica, conforme descrito a seguir:

Grupo 1: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, cloridrato de berberina (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 2: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, cloridrato de berberina (10mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 3: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato metanólico de *B. laurina* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 4: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato hidroetanólico acidificado de *B. laurina* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 5: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato etanólico de *B. glazioviana* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 6: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, anfotericina b (5mg/kg/dia) solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 7: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, solução salina estéril em volume correspondente ao Grupo 1.

Durante todo o experimento os parâmetros de ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas foram monitorados. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e foram coletados o baço e o fígado dos camundongos para determinar a carga parasitária por qPCR.

4.8.2. Teste de eficácia em modelo tegumentar murino

Para os ensaios *in vivo* de eficácia terapêutica do cloridrato de berberina e para os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana*, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, 8 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g. Os animais foram infectados com $2,5 \times 10^7$ promastigotas em fase estacionária de crescimento (ricas em formas metacíclicas) de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199), na base da cauda (dia 0).

Os animais foram tratados durante 10 dias com intervalo de 24h entre as aplicações. 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: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, cloridrato de berberina (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 2: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, cloridrato de berberina (10mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 3: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato metanólico de *B. laurina* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 4: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato hidroetanólico acidificado de *B. laurina* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 5: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, extrato etanólico de *B. glazioviana* (20mg/kg/dia), solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 6: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, anfotericina b (5mg/kg/dia) solubilizado em PBS (pH = 8);

Grupo 7: Cinco animais que receberam, por via intraperitoneal, solução salina estéril em volume correspondente ao Grupo 1.

Durante todo o experimento os parâmetros de ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas foram monitorados. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e foram coletadas as lesões da cauda dos camundongos para determinar a carga parasitária por qPCR.

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

Após a eutanásia, as lesões da pele dos camundongos que estavam com LT e o baço e o fígado dos camundongos que estavam com LV foram coletados, pesados e transferidos para tubos de microcentrífuga estéreis, e congelados a -20°C até o uso para a determinação da carga parasitária por qPCR. As extrações de DNA genômico foram realizadas em amostras de 20mg de lesão de pele, baço e fígado, utilizando o kit RealiapPrep™ 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 CAA CCC 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* e *L. infantum* 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) e *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), 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' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCA 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 estatísticos GraphPad® Instat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e Origin® Pro 8.5 (OriginLab Corp, EUA).

Para calcular os valores de CI_{50} e CC_{50} , foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes em triplicata.

Na análise da carga parasitária, foram procuradas diferenças entre os extratos de *B. laurina*, *B. glazioviana*, o cloridrato de berberina e a anfotericina b utilizando o teste de ANOVA one-way, seguido do teste de Dunnett como pós-teste.

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

5. RESULTADOS

5.1. Coleta, identificação e preparo do material

A coleta do material vegetal utilizado foi realizada na região de Camanducaia e Espera Feliz, localizados no estado de Minas Gerais. Após a coleta foi preparada exsicata das espécies para identificação e posteriormente as mesmas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Dados botânicos das plantas coletadas

Nome científico	Família / Nome popular	Número de registro	Data da Coleta	Região da Coleta	Local da coleta
<i>Berberis laurina</i>	Berberidaceae / Espinho-de-são-jão	BHCB 183702	18/11/16 Stehmann, J.R.	Camanducaia MG	22°52'11" S, 46°02'42" W
<i>Berberis glazioviana</i>	Berberidaceae / Uva-de-espinho	BHCB 182758	12/09/16 Stehmann, J.R.	Espera Feliz MG	20°28'45.5" S, 41°49'46.5" W

De acordo com a metodologia proposta para o preparo dos extratos foram obtidas massas diferentes para cada espécie. O extrato com o maior rendimento foi o hidroetanólico acidificado da espécie *B. laurina*. O rendimento da extração para cada espécie e a massa final obtida constam na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Rendimento dos extratos dos galhos das espécies de *Berberis* sp.

Espécie	Tipo de extrato	Massa em pó	Massa obtida	Rendimento
		utilizada (g)	de extrato (g)	(%)
<i>B. laurina</i>	Metanólico	50	1,45	2,90
	Hidroetanólico acidificado	200	42,07	21,03
<i>B. glazioviana</i>	Etanólico	50	1,73	3,46

Método de extração ver item 4.2.

5.2. Prospecção fitoquímica

Para identificar a presença de berberina nas espécies de *B. laurina* e *B. glazioviana* foi realizada a prospecção fitoquímica por CCD. Nas **Figuras 5A e 5B** pode-se observar a presença de berberina que aparece como manchas de cor amarelada após a revelação com o reagente anisaldeído sulfúrico e dragendorff, respectivamente; além disso, a presença de outras manchas mais escuras são indicativos de outros metabólitos secundários, como, por exemplo, os terpenos. O padrão de cloridrato de berberina foi utilizado como referência.

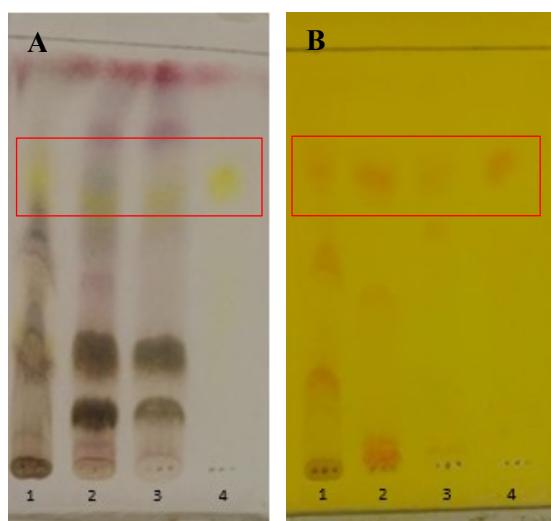


Figura 5A - Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras dos extratos de berberina e para o cloridrato de berberina padrão. Revelador utilizado: Anisaldeído sulfúrico. 1- Extrato hidroetanólico acidificado de *B. laurina*; 2- Extrato metanólico de *B. laurina*; 3- Extrato etanólico de *B. glazioviana*; 4- Cloridrato de berberina padrão.

Figura 5B - Perfil fitoquímico obtido em CCD para as amostras dos extratos de berberina e para o cloridrato de berberina padrão. Revelador utilizado: Dragendorff. 1- Extrato hidroetanólico acidificado de *B. laurina*; 2- Extrato metanólico de *B. laurina*; 3- Extrato etanólico de *B. glazioviana*; 4- Cloridrato de berberina padrão.

Todas as espécies apresentam manchas amareladas com o fator de retenção (R_f) semelhante ao apresentado pelo padrão de cloridrato de berberina, sugerindo que o composto berberina está presente nos extratos das espécies de *B. laurina* e *B. glazioviana* que foram coletadas. A placa de sílica gel utilizada na CCD, proporciona a separação, após eluição, de compostos e/ou frações de maneira qualitativa (GOCAN, 2002).

5.3. Análise das amostras por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD)

As análises foram realizadas com detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD), com varredura de 200 a 400 nm e detecção nos comprimentos de onda (λ) de 280 nm.

Os cromatogramas dos extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* são de média complexidade, já o do cloridrato de berberina é simples, como podem ser observados na **Figura 6**, apresentando as seguintes características:

Extrato metanólico de *B. laurina* (cromatograma A): apresenta picos mais intensos em tempos de retenção muito próximos. No tempo de retenção (TR) de 7,7min há um pico majoritário (36,53% de área) com máximos de absorção no espectro de UV em λ_{max} 228,1; 263,6 e 346,6 nm, sugerindo tratar-se de berberina, já que apresenta o mesmo cromóforo e tempo de retenção que o padrão. No tempo de retenção (TR) de 4,3min há outro pico de menor intensidade (22,37% de área) com máximos de absorção em λ_{max} 222,2; 268,4 e 301,7 nm, que pode tratar-se de um derivado da berberina, visto que apresenta cromóforo parecido, ambos com detecção no comprimento de onda de 280nm.

Extrato hidroetanólico de *B. laurina* (cromatograma B): apresenta picos mais intensos em tempos de retenção muito próximos. No tempo de retenção (TR) de 7,7min há um pico majoritário (25,30% de área) com máximos de absorção no espectro de UV em λ_{max} 228,1; 263,6 e 346,6 nm, sugerindo tratar-se de berberina, já que apresenta o mesmo cromóforo e tempo de retenção que o padrão. No tempo de retenção (TR) de 4,3min há outro pico de menor intensidade (18,25% de área) com máximos de absorção em λ_{max} 221,1; 268,4 e 301,7 nm, que pode tratar-se de um derivado da berberina, visto que apresenta cromóforo parecido com esta. Ambos com detecção no comprimento de onda de 280nm.

Extrato etanólico de *B. glazioviana* (cromatograma C): apresenta picos mais intensos em tempos de retenção muito próximos. No tempo de retenção (TR) de 7,6min há um pico majoritário (29,29% de área) com máximos de absorção no espectro de UV em λ_{max} 228,1; 263,6 e 346,6 nm, sugerindo tratar-se de berberina, já que apresenta o mesmo cromóforo e tempo de retenção que o padrão. No tempo de retenção (TR) de 6,8min há outro pico de menor intensidade (32,19% de área) com máximos de absorção em λ_{max} 273,1 e 344,3 nm, que pode tratar-se de um derivado da berberina, visto que apresenta cromóforo parecido com esta. Ambos com detecção no comprimento de onda de 280nm.

Cloridrato de berberina padrão (cromatograma D): possui um pico majoritário (96,04% de área) no TR = 7,5min e absorção máxima no UV de λ_{max} 228,1; 263,6 e 346,6 nm, o que é esperado para essa substância (SRINIVASAN et al., 2008; PASRIJA et al., 2010).

A análise do perfil cromatográfico por HPLC, demonstrou que os cromatogramas se apresentaram possivelmente livres de detecção do eluente, posto que a coluna foi eluída previamente para interação da fase móvel com a fase estacionária. Observou-se que em todos os cromatogramas dos extratos houve a presença de um pico majoritário, semelhante ao do cloridrato de berberina que foi utilizado como padrão. Este resultado é sugestivo da presença do alcaloide berberina. Entretanto, a presença de outros picos semelhante ao pico majoritário, demonstra serem indicativos da presença de outros compostos que são semelhantes a berberina.

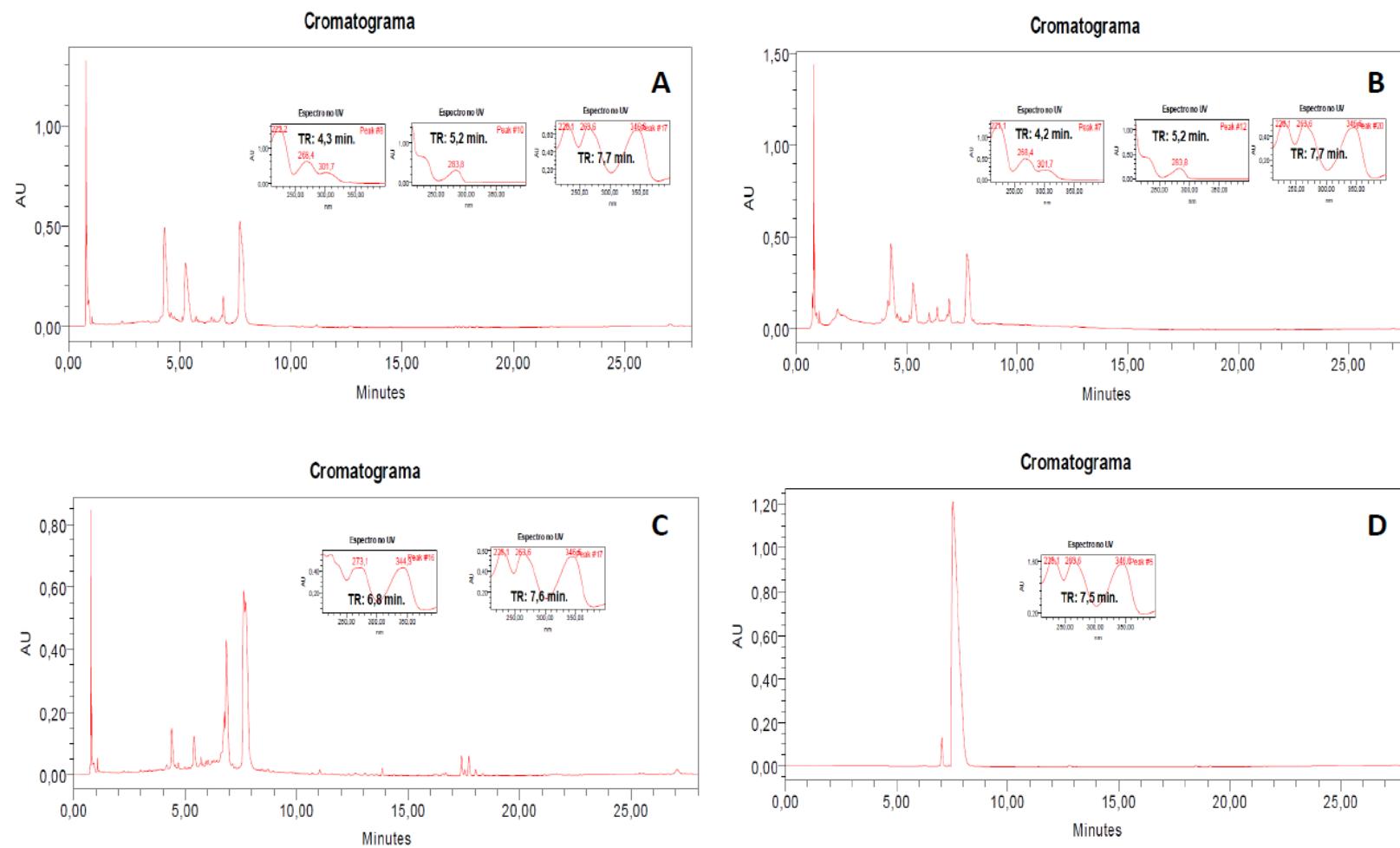


Figura 6 - Cromatogramas dos extratos metanólico de *B. laurina* (A), hidroetanólico acidificado de *B. laurina* (B), etanólico de *B. glazioviana* (C) e do cloridrato de berberina padrão (D), com ênfase para os picos majoritários. Detecção em 280 nm. Fluxo de 0,3 ml/min; Temperatura: 40°C; Fase estacionária: coluna Acquit C-18 (partículas de 1,7 µm, 100 x 2,1 mm d.i. – Waters®); volume de injeção: 2 µL; Fase móvel: gradiente linear composto por água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (B): 0 min: 95% A e 5% B, 24 min.: 5% A e 95% B; 26 min.: 5% A e 95% B e 28 min.: 95% A e 5% B.

5.4. Ensaios de eficácia do cloridrato de berberina e dos extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* em modelo *in vitro* de leishmaniose

Foi realizada, inicialmente, uma triagem em duas concentrações (100 e 200 µg/mL) com o extrato metanólico e hidroetanólico acidificado obtidos da *B. laurina* e o extrato etanólico obtido da *B. glazioviana*. A redução do crescimento dos parasitos promovida pelos extratos foi expressa em percentual na **Tabela 4**. Nesses testes, todos os extratos apresentaram redução maior que 50% na maior concentração.

Tabela 4 - Redução do crescimento dos parasitos com os extratos obtidos de *B. laurina* e *B. glazioviana* em percentual.

Extrato	Redução (%) 200 µg/mL		Redução (%) 100 µg/mL	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
MeOH <i>B. laurina</i>	74,60	70,77	64,11	59,89
H₂O-EtOH <i>B. laurina</i>	75,66	74,13	62,42	68,26
EtOH <i>B. glazioviana</i>	79,79	77,57	73,62	73,81

Foi avaliado a eficácia desses extratos e do cloridrato de berberina sobre cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, avaliando posteriormente a citotoxicidade em linhagem de células HepG2, por MTT. Este ensaio, permitiu avaliar a viabilidade celular e analisar estudos de proliferação em biologia celular. Devido ao fato do cloridrato de berberina conseguir se cristalizar com facilidade e seus cristais apresentarem baixa solubilidade em diversos solventes, foi utilizado o método de contagem em câmara de Neubauer com auxílio do corante vital azul de tripan, sendo considerada neste caso a metodologia mais viável para analisar a viabilidade celular do cloridrato de berberina em cepas de *Leishmania*.

Na **Tabela 5** observam-se os valores de CC₅₀, CI₅₀ e o índice terapêutico (IT) dos extratos obtidos de *B. laurina*, *B. glazioviana*, do cloridrato de berberina padrão e da anfotericina b para as cepas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Tabela 5 - Valores de CC₅₀ determinados para células HepG2, valores de CI₅₀ determinados para formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* e o índice terapêutico (IT).

	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>
MeOH <i>B. laurina</i>	834,30 \pm 78,71	61,50 \pm 16,52	58,20 \pm 10,36	13,56
H₂O-EtOH <i>B. laurina</i>	>1000	80,56 \pm 16,42	15,90 \pm 3,76	>12,41
EtOH <i>B. glazioviana</i>	557,85 \pm 69,74	41,82 \pm 4,71	39,65 \pm 6,32	13,34
Cloridrato de berberina	88,20 \pm 19,30	0,51 \pm 0,06	12,56 \pm 2,14	172,90
Anfotericina b	287,36 \pm 45,91	0,08 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	3592
				4105,14

DP: desvio padrão

CI₅₀ - promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

CC₅₀ – linhagem celular HepG2

IT – razão entre CC₅₀ e IC₅₀

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que todos os extratos de *Berberis* testados, apresentaram boa atividade contra as formas promastigotas e baixa citotoxicidade, resultando em IT \geq 10. Para o teste com o cloridrato de berberina padrão, pode-se inferir que sua ação foi melhor quando analisada a cepa *L. amazonensis*, com um IT muito maior que 10. Entretanto, ao analisar a cepa *L. infantum*, o resultado do IT foi inferior a 10, sugerindo que essa substância poderia ser tóxica na concentração necessária para eliminar essa espécie.

6. Teste de eficácia em modelo murino de LTA

Foi realizada a eutanásia dos camundongos 24h após a última dose do tratamento com os extratos, cloridrato de berberina, anfotericina b e PBS. Não foram observadas alterações macroscópicas importantes durante a coleta da pele. Além disso, observou-se que houve boa tolerância ao regime terapêutico, não havendo mudança no comportamento durante todo o tratamento. A **Figura 7** mostra o efeito do tratamento com os extratos, com o cloridrato de berberina, com a anfotericina b e com o PBS sobre a carga parasitária na pele, determinada por qPCR.

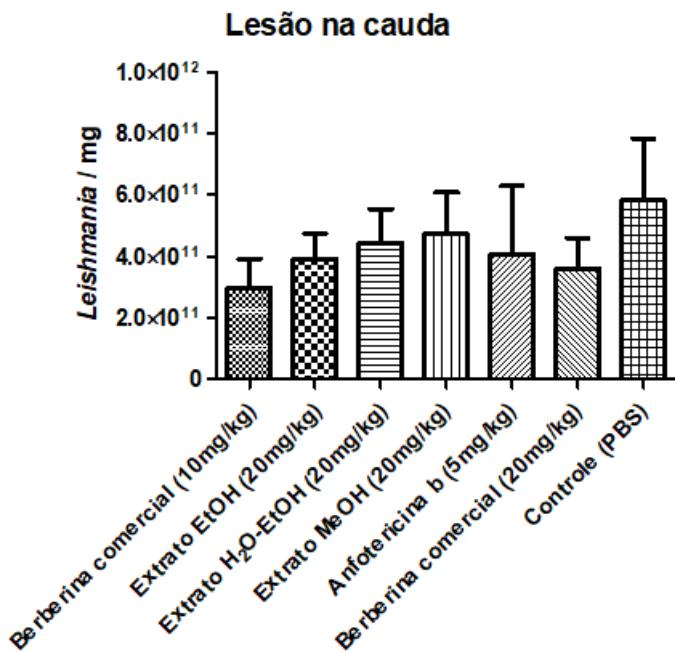


Figura 7 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) na pele de camundongos BALB/c infectados com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199), logo após o tratamento com cloridrato de berberina (10mg/kg/i.p./24h/10dias); extrato EtOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); Extrato H₂O-EtOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); extrato MeOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); cloridrato de berberina (20mg/kg/i.p./24h/10dias). Anfotericina b (5mg/kg/i.p./24h/10dias) foi usada como tratamento de referência. PBS em volume correspondente ao do cloridrato de berberina (20mg/kg/24h/IP/10dias) foi usado como controle negativo. Os dados são apresentados como mediana \pm SEM de cada grupo ($n = 5$). $p = 0.8298$, conforme determinado pelo teste de One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett como pós-teste. Eficiência da reação = 102,84%; slope = -3.256; Y-intercepts = 29.861; $R^2 = 0.973$. Limite de detecção = 1 parasito/mg de pele.

O grupo controle tratado com PBS apresentou carga parasitária média de $5,82 \times 10^{11}$ parasitos/mg de tecido. Os resultados demonstram que os animais tratados com extratos de berberina, cloridrato de berberina e com anfotericina b não apresentaram redução significativa da carga parasitária na pele, quando comparadas ao grupo controle. Os resultados sugerem que o tratamento não foi capaz de induzir redução média da carga parasitária da pele para nenhum grupo tratado, inclusive para o grupo tratado com anfotericina b, que é usado como tratamento de referência.

7. Teste de eficácia em modelo murino de LV

Foi realizada a eutanásia dos camundongos 24h após a última dose do tratamento com os extratos, cloridrato de berberina, anfotericina b e PBS. Não foram observadas alterações macroscópicas durante a coleta do baço e fígado. Além disso, observou-se que houve boa tolerância ao regime terapêutico, não havendo mudança no comportamento durante todo o tratamento. A **Figura 8** mostra o efeito do tratamento com os extratos, o cloridrato de berberina, anfotericina b e com o PBS sobre a carga parasitária no baço e fígado, determinada por qPCR.

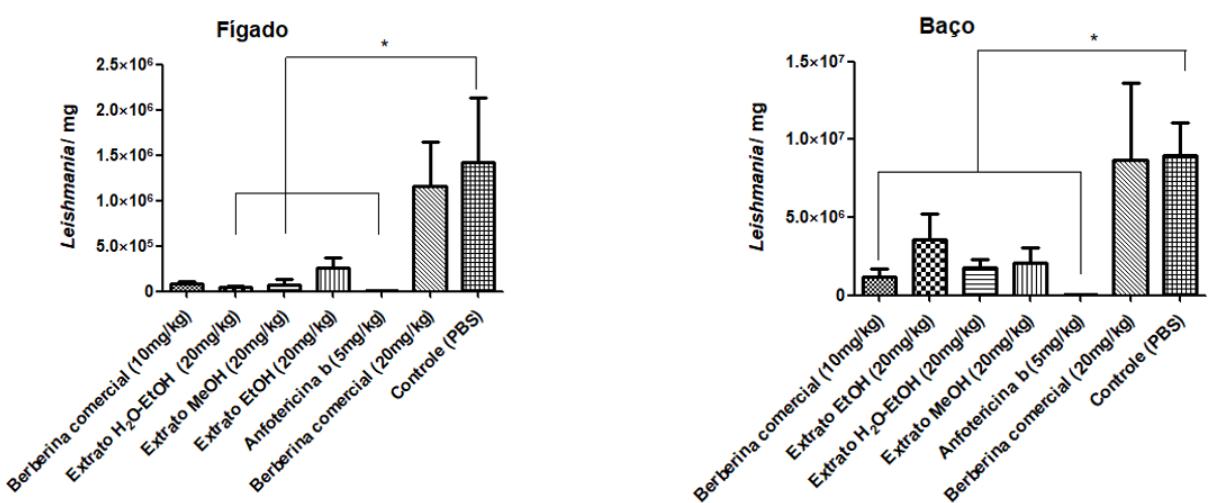


Figura 8 - Carga parasitária determinada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), logo após o tratamento com cloridrato de berberina (10mg/kg/i.p./24h/10dias); extrato EtOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); Extrato H₂O-EtOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); extrato MeOH (20mg/kg/i.p./24h/10dias); cloridrato de berberina (20mg/kg/i.p./24h/10dias). Anfotericina b (5mg/kg/i.p./24h/10dias) foi usada como tratamento de referência. PBS em volume correspondente ao do cloridrato de berberina (20mg/kg/24h/IP/10dias) foi usado como controle negativo. Os dados são apresentados como mediana \pm SEM de cada grupo ($n = 5$). * $p < 0.05$, conforme determinado pelo teste de One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett como pós-teste. Eficiência da reação = 90.01%; slope = -3.587; Y-intercepts = 32.826; R² = 0.995. Limite de detecção = 1 parasito/mg de baço ou fígado.

Os animais do grupo controle tratados com PBS, apresentaram alta carga parasitária no fígado ($1,42 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^5$ Leishmania/mg) e no baço ($8,98 \times 10^6 \pm 4,68 \times 10^6$ Leishmania/mg). Houve diferença significativa entre a carga parasitária no fígado com os extratos hidroetanólico (96,8% de redução) e metanólico (94,6% de redução), e no baço com o cloridrato de berberina a 10mg/kg (87,2% de redução) quando comparados com o grupo

controle. No grupo tratado com a anfotericina b houve redução significativa da carga parasitária do baço (99,3%) e fígado (99,7%) ($p <0,05$) em relação aos animais do grupo controle. Os resultados sugerem que o tratamento com a anfotericina b, os extratos de *Berberis* e o cloridrato de berberina a 10mg/kg foram capazes de induzir redução média da carga parasitária do baço e do fígado quando comparados com o grupo controle tratado com PBS.

8. DISCUSSÃO

As leishmanioses estão classificadas entre as seis parasitoses mais importantes no mundo, sendo a segunda doença parasitária que mais mata atualmente, ficando atrás apenas da malária (WHO, 2018). É uma das doenças mais negligenciadas do mundo, acometendo populações mais carentes economicamente (ALVAR et al., 2006).

A OMS, assim como o Ministério da Saúde do Brasil, orienta que sejam feitos o diagnóstico e o tratamento precoces nos pacientes infectados. Apesar do controle não se basear em uma única medida, a principal estratégia ainda continua sendo o tratamento dos doentes, embora haja limitações nos tratamentos atuais (ALVAR et al., 2006; PACE, 2014; ANDRADE et al., 2016).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses pertencem à classe dos antimoniais pentavalentes, como o antimoníato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), entretanto, para algumas regiões endêmicas, este tratamento vem sendo abandonado pelo fato de estarem apresentando falhas, tanto por resistência de algumas cepas do parasito quanto pela descontinuidade do tratamento por parte do paciente devido aos efeitos colaterais (CROFT et al., 2006; CHOUSHAN et al., 2014).

Os fármacos de segunda escolha, como o desoxicolato de anfotericina b, são usados em pacientes que não são responsivos ao tratamento com os antimoniais ou que apresentam alguma contraindicação. Entretanto, este tratamento é considerado tóxico, tanto quanto aos fármacos de primeira escolha. Algumas limitações do uso da anfotericina b foram contempladas pela sua formulação lipossomal (AmBisome®), que, apesar do alto custo, consegue reduzir a toxicidade da droga (MARTINEZ, 2006).

Todos estes motivos tornam necessárias outras estratégias terapêuticas que sejam mais eficazes que as atuais. E, neste contexto, a OMS recomenda a utilização de substâncias extraídas da flora que possam atuar no desenvolvimento de novas terapias, afim de obter uma melhor eficácia no tratamento das leishmanioses (BRASIL, 2014; CHOUSHAN et al., 2014; ORYAN, 2015). Substâncias ou extratos obtidos de plantas tem se tornado cada vez mais usuais em pesquisas que buscam novas alternativas de tratamento, com estudos demonstrando atividade de alguns produtos naturais contra algumas cepas de *Leishmania* spp. (NDJONKA et al., 2013; SINGH et al., 2014; ANDREWS et al., 2014).

Estudos prévios mostram que plantas do gênero *Berberis* sp. tem demonstrado atividade no tratamento de hipertensão, arritmia e problemas gastrointestinais de alcaloides isolados (DERMARDEROSIAN, 2001; FATEHI-HASSANABAD et al., 2005; MOHSEN

IMANSHAHIDI e HOSSEIN HOSSEINZADEH, 2008). Além disso, já existem estudos sobre algumas espécies de *Leishmania* demonstrando serem responsivas quando tratadas com extratos de algumas espécies de *Berberis* sp. (MAHMOUDVAND et al., 2014a).

Neste trabalho foram coletadas duas espécies de *Berberis* (*B. laurina* e *B. glazioviana*) para realizar um estudo do perfil fitoquímico, a avaliação da atividade contra *L. infantum* e *L. amazonensis*, a citotoxicidade destes compostos e avaliar sua eficácia no tratamento de camundongos infectados com leishmaniose tegumentar e visceral.

Através da CCD foi possível observar que em todos os extratos obtidos haviam manchas de coloração amarelada, sugestivas da presença de alcaloides como a berberina, quando reveladas com dragendorff ou anisaldeído sulfúrico, além disso, foi realizada a análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD), na qual pode-se observar que em todos os cromatogramas dos extratos houve a presença de um pico majoritário, semelhante ao do cloridrato de berberina que foi utilizado como padrão, sendo sugestivo da presença de berberina. Os resultados deste trabalho, corroboram com Srinivasan e colaboradores (2008), que encontraram tempo de retenção muito semelhante ao do cloridrato de berberina, sendo 8,6min em comprimento de onda de 266nm. O trabalho de Shigwan e colaboradores (2013), encontrou valores de absorção máxima no UV de λ_{max} 230,0; 265,0 e 347,2 nm, valores considerados próximos deste trabalho (228,1; 263,6 e 346,6 nm), entretanto, ao analisar extratos de *B. aristata* e *B. tinctoria*, o tempo de retenção foi mais baixo em relação aos já citados, obtendo valores de aproximadamente 3,6 min para ambas as espécie de *Berberis*, mas vale ressaltar que foram utilizadas diferentes condições cromatográficas dos utilizados neste trabalho. Além das diferenças cromatográficas, as diferenças também podem ser atribuídas a própria composição dos extratos.

Em estudos que avaliaram extratos de *Berberis* sp. em cepas de *Leishmania* sp., como o de Mahmoudvand e colaboradores (2014a,b), mostram toxicidade moderada do cloridrato de berberina em células de macrófagos peritoneais ($27,3 \pm 2,08 \mu\text{g/mL}$) e baixa citotoxicidade em extratos aquoso, metanólico e clorofórmico obtidos de plantas do gênero *Berberis* ($362,6 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$; $203,3 \pm 3,08 \mu\text{g/mL}$ e $297,6 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Neste estudo, o cloridrato de berberina, apresentou CC₅₀ no valor de $88,20 \mu\text{g/mL}$, sendo moderadamente tóxicos para esta linhagem celular, já o CC₅₀ para o os extratos metanólico, hidroetanólico e etanólico foram de $834,30 \mu\text{g/mL}$, $>1000 \mu\text{g/mL}$ e $557,85 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, desta forma as concentrações utilizadas ($200 \mu\text{g}$ a $3,12 \mu\text{g}$ para o cloridrato de berberina e $1000 \mu\text{g}$ a $15,62 \mu\text{g}$ para os extratos) não apresentaram comprometimento e/ou modificação nas células estando de acordo com a literatura, que sugere baixos níveis de toxicidade dos extratos em outras linhagens celular

(MAHMOUDVAND et al., 2014a; MAHMOUDVAND et al., 2014b; SALEHABADI et al., 2014).

Os extratos de *Berberis* obtidos nesse trabalho, assim como o cloridrato de berberina, apresentaram valores de CI_{50} baixos, mostrando ter um papel importante na atividade leishmanicida. Mahmoudvand e colaboradores (2014a,b), mostraram que extratos metanólico e aquoso de *Berberis* foram eficazes contra formas promastigotas de *Leishmania*, tendo um CI_{50} de $13,2 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ e $21,6 \pm 2,08 \mu\text{g/mL}$ para *L. infantum*; $16,1 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ e $26,6 \pm 2,51 \mu\text{g/mL}$ para *L. tropica* e $12,8 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ e $22,3 \pm 2,51 \mu\text{g/mL}$ para *L. major*. Além disso, a berberina padrão utilizada teve um valor de $2,7 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, o que sugere que extratos obtidos de espécies de *Berberis* e o cloridrato de berberina, tenham atividades contra formas promastigotas. Saha e colaboradores (2011), encontraram em amastigotas de *Leishmania donovani*, o valor de CI_{50} de $2,64 \mu\text{g/mL} \pm 0,94 \mu\text{g/mL}$ para o cloridrato de berberina, corroborando com os dados citados neste trabalho. No trabalho de Krivogorsky e colaboradores (2012), realizaram-se o estudo com *Toxoplasma gondii*, na qual obteve-se um valor de dose de inibição de $0,21 \mu\text{g/mL}$.

Após a realização dos testes de citotoxicidade e da atividade leishmanicida em promastigotas, os extratos de *Berberis* e o cloridrato de berberina foram avaliados em modelos murinos para LV e LT com a finalidade de avaliar a carga parasitária por qPCR de *Leishmania* no fígado, baço e pele dos camundongos infectados (MARY et al., 2006; VAN DER MEIDE et al., 2008; ROMERO et al., 2010). A técnica de qPCR permite realizar várias cópias de um segmento específico de DNA com rapidez e precisão em um tempo muito menor, sendo amplamente utilizada em pesquisas e diagnóstico (LIN et al., 2000; CUMMINGS et al., 2003; KAMAU et al., 2011). Desta forma, é possível identificar o ciclo mais próximo do início da fase de amplificação logarítmica da sequência alvo, chamado *threshold* (Ct), e assim obter o número de cópias da sequência alvo e a carga parasitária da amostra em estudo, sendo muito adequada para diagnóstico e monitoramento da carga parasitária em modelos murinos de leishmaniose (MORTARINO et al., 2004; MAIA e CAMPINO, 2008).

Neste estudo, detectamos a carga parasitária em amostras de fígado, baço e pele dos camundongos infectados por qPCR, obtendo uma eficiência de 90,01% para o baço e o fígado dos camundongos com LV e de 102,84% para a pele dos camundongos com LT, sendo o limite de detecção de 1 parasito/mg de fígado, baço e pele. Os tratamentos realizados com os extratos e com o cloridrato de berberina a 10mg/kg para os camundongos com LV, apresentaram redução na carga parasitária do fígado e do baço. Existem estudos, que já analisaram o tratamento *in vivo* em camundongos para outras parasitoses, como o realizado por

Mahmoudvand e colaboradores (2017), que demonstraram a diminuição da carga parasitária em camundongos com toxoplasmose aguda, tratados por 14 dias com 1g/kg/dia e 2g/kg/dia de extrato metanólico de *Berberis vulgaris*, obtendo os valores de $1,3 \times 10^6$ e $7,9 \times 10^5$ respectivamente, sendo que o grupo controle apresentou carga parasitária de $2,88 \times 10^6$.

Nossos resultados sugerem que os extratos de *Berberis* e o cloridrato de berberina, quando testado tanto *in vitro* como *in vivo* para *L. infantum*, causam redução no número de parasitos. Em relação aos ensaios com *L. amazonensis*, os experimentos *in vitro* tiveram ótimos resultados de índice de seletividade, demonstrando que os produtos naturais utilizados são seletivos e eficazes para esta cepa, porém, ao analisar o *in vivo*, os resultados foram inconclusivos, pois nem mesmo o tratamento padrão foi eficaz no modelo experimental utilizado. O modelo experimental ideal para o estudo das leishmanioses, é o hamster, pois ele reproduz as características clínico patológicas semelhantes à da LV e LT humana (LORIA-CERVERA, 2014). Outros animais, como a linhagem de camundongos BALB/c são utilizados ocasionalmente, mas eles não são uniformemente susceptíveis as espécies de *Leishmania*, como o hamster (WHO, 2018). O CBEA/UFU não cria e nem mantém hamster, somente camundongos para serem utilizados como modelo experimental, limitando assim, o desenvolvimento deste estudo.

Sobre o mecanismo de ação do composto berberina não há informação disponível na literatura. Sendo assim, mais pesquisas são necessárias com objetivo de verificar a dose ideal e o mecanismo de ação dessas substâncias, afim de propor uma nova terapia para o tratamento da LV e LT, atuando de forma mais eficaz e com um menor custo quando comparados com os tratamentos atuais.

9. CONCLUSÕES

- Foi possível extrair e confirmar a presença do composto berberina de *B. laurina* e *B. glazioviana*;
- O cloridrato de berberina e os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- O cloridrato de berberina apresentou citotoxicidade moderada, enquanto que os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* apresentaram baixa citotoxicidade;
- O cloridrato de berberina e os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* apresentaram um IT maior que 10 para a cepa de *L. amazonenses* e para a cepa de *L. infantum* todos os extratos de *Berberis* demonstraram um IT maior que 10;
- O cloridrato de berberina a 10mg/kg e os extratos de *B. laurina* e *B. glazioviana* reduziram a carga parasitária do baço e fígado de camundongos infectados com *L. infantum* após 10 dias de tratamento em relação ao grupo controle e ao tratamento com o cloridrato de berberina a 20mg/kg.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-7, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>

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.4 3, n. 2, p. 194-197, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200017>

ALVES, R.R.N.; SILVA, A.A.G.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA R.R.D. Utilização e comércio de plantas medicinais em campina grande, PB, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 2007. <https://doi.org/10.5216/ref.v4i2.3060>

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. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>

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

BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.7, n.3, 2004. BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BATISTA, R.; SILVA JUNIOR, A.J.; OLIVEIRA, A.B. Plant-derivad antimalarial agentes: News leads and eficiente phytomedicines. **Molecules**, v. 14, p. 3037-3072, 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules14083037>

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. <https://doi.org/10.1078/09447110322331458>

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., SINDERMANN, 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. <https://doi.org/10.1086/519690>

BRASIL. DATASUS-SVS - Sistema de Agravos de Notificação - SINAN NET. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>>. Acesso em: 28 de maio de 2018.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira 5.ed. Volume I e II / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos – Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 148, 2006.

_____. 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.

_____. 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, p. 120, 2014.

BRUSCHI, F.; GRADONI, L. The leishmaniases: old neglected tropical diseases. **Springer**, 1st ed, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>

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.; WITTWER., 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. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

CDC. **Parasites – Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 23 de maio de 2018.

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? **Nature's review Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.012>

COURA, J.R. Identificação de *Leishmania*. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, p. 733-738, 2005.

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. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8)

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. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300032>

DERMARDEROSIAN A. **The Review of Natural Products**. Facts and Comparisons: St. Louis, Missouri, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products. 2ed. Londres. **John Wiley & Son LTD**. p. 507, 2001. <https://doi.org/10.1002/0470846275>

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. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>

EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 16th ed., Edinburg, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, Elsevier- Saunders (W.B.) Co. Ltd., p. 603, 2009.

FATEHI-HASSANABAD Z, JAFARZADEH M., TARHINI A., FATEHI M. The antihypertensive and vasodilator effects of aqueous extract from *Berberis vulgaris* fruit on hypertensive rats. **Phytotherapy Research** v. 19, p. 222–225, 2005. <https://doi.org/10.1002/ptr.1661>

FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Santa Catarina (SC), v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200003>

GOCAN, S. **Stationary Phases for Thin-Layer Chromatography**. Journal of Chromatographic Science. 2002. <https://doi.org/10.1093/chromsci/40.10.538>

GRIENSVEN J. van; DIRO, E. Infectious Disease Clinics of North America, v. 26, p. 309–322, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>

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. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X)

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. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957592>

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. <https://doi.org/10.1128/JCM.00276-11>

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

KRIVOGORSKY, B.; PERNATKELSI, J.A.; NIKOLAS, A.D.; GRUNDT, J.C.P. Structure–activity studies of some berberine analogs as inhibitors of *Toxoplasma gondii*. **Bioorganic &**

Medicinal Chemistry Letters. v. 22, n. 8, p. 2980-2982, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.038>

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. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.038>

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. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>

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. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.012>

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.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>

MAHMOUDVAND, H., SHARIFIFAR, F., RAHMAT, M.S., TAVAKOLI, R. Evaluation of Antileishmanial Activity and Citotoxicity of the Extracts of *Berberis vulgaris* and *Nigella sativa* against *Leishmania tropica*. **Journal of Vector Borne Diseases**. 2014b.

MAHMOUDVAND, H.; AYATOLLAHI, M.S.A.; SEPAHVAND, A.; SHARIFIFAR, F.; EZATPOUR, B.; GOROHI, F. Antifungal, antileishmanial, and cytotoxicity activities of various extracts of *Berberis vulgaris* (berberidaceae) and its active principle berberine. **International Scholarly Research Network Pharmacology**; (2014a).
<https://doi.org/10.1155/2014/602436>

MAHMOUDVAND, H.; KARESHK, A.T.; KEYHANI, A.; ZIA-ALI, N.; AFLATOONIAN, M.R. In vivo evaluation of *Berberis vulgaris* extract on acute toxoplasmosis in mice. **Marmara Pharmaceutical Journal.** v. 21, n. 3, p. 558-563, 2017.
<https://doi.org/10.12991/marupj.319220>

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology.** v. 158, n. 4, p. 274-87, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>

MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease,** v. 12, p. 563-581, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.09.007>

MARCHIORI, N.C. **Dendrologia das Angiospermas: das Magnoliáceas às Flacurtiáceas.** Santa Maria: UFSM, p. 91-95, 1997.

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.

MATTOS, J.R. 1967. Berberidáceas. In R. Reitz & R.M. Klein (eds.) *Flora Ilustrada Catarinense*, parte I, fasc. Berb. Itajaí, **Herbário ‘Barbosa Rodrigues’**, v. 5, p. 15, 1967.

METCALFE, C.R., CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons.** Oxford: Clarendon Press, v. 1, p. 59, 1972a.

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. <https://doi.org/10.1086/515085>

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. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100017>

MOHSEN IMANSHAHIDI E HOSSEIN HOSSEINZADEH. Pharmacological and Therapeutic Effects of *Berberis vulgaris* and its Active Constituent, Berberine. **Phytotherapy Research.** *Phytother.* v. 22, p. 999–1012, 2008. <https://doi.org/10.1002/ptr.2399>

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitologia.** v. 46, n. 1-2, p. 163-7, 2004.

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. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

OUÉDRAOGO, M.; KONATÉ, K.; LEPENGUÉ, A.N.; SOUZA, A.; BATCHI, B.M.; SAWADOGO, L.L. Free radical scavenging capacity, anticandidal effect of bioactive compounds from *Sida Cordifolia* L., in combination with nystatin and clotrimazole and their effect on specific immune response in rats. **Annals of Clinica Microbiology and Antimicrobials**. 2012.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. 10–18, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

PASRIJA, A.; SINGH, R.; KATIYAR, C.K. Validated HPLC-UV method for the determination of berberine in raw herb Daruharidra (*Berberis aristata* DC), its extract, and in commercially marketed Ayurvedic dosage forms. **International Journal of Ayurveda Research.** v. 1, n. 4, p. 243–246, 2010. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.76789>

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. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000100012>

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. <https://doi.org/10.1126/science.1615326>

PONTIROLI, A. Berberidaceae. In: Cabrera, A. L. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires: **Colección Científica del I.N.T.A.** v. 3, p. 257-260, 1967.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M.D.Q.; FOURNET, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 438–440, 1996. <https://doi.org/10.1021/np960223w>

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. <https://doi.org/10.1111/tid.12380>

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. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-198>

RIBEIRO, T.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.G.; VALADARES, D.G.; FRANCA, J.R.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; ARRUDA, A.L.A.; FARACO, A.A.G; COELHO, E.A.F.; CASTILHO, F.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**. v. 143 p. 60–68, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>

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. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.006>

RODRIGUES, E. Plants and Animals Utilized as Medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 5, p. 387-391, 2006. <https://doi.org/10.1002/ptr.1866>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.040>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000819>

SACKS, D.; TRAUTH, N.N. "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice," **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri933>

SAHA, P.; BHATTACHARJEE, S.; SARKAR, S.; MANNA, A.; MAJUMDER, S.; CHATTERJEE, M. Berberine Chloride Mediates Its Anti-Leishmanial Activity via Differential Regulation of the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway in Macrophages. **PLoS ONE**. v. 6, n. 4, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018467>

SALEHABADI, A.K.M.; FARZAD, M.H.; NAMAEI, M.H. Effect of root bark extract of *Berberis vulgaris* on *Leishmania major* on BALB/c mice. **Parasitology Research** v. 113, n. 3, p. 953-957, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3727-2>

SANTOS, N.P.; PINTO, A.C. "A Mata é sua Farmácia" - A Pesquisa de Plantas Brasileiras para o Combate de Doenças Tropicais no Século XIX. **Revista Virtual de Química**, v. 4 n. 2, p. 162-172, 2012. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120013>

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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00104.x>

SASIDHARAN, S., CHEN, Y. SARAVANAN, D; SUNDARAM, 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.

SHIGWANB, H.; SAKLANIA, A.; HAMRAPURKARB, P.D.; MANEA, T.; BHATTB, P. HPLC Method Development and Validation for Quantification of Berberine from *Berberis aristata* and *Berberis tinctorial*. **International Journal of Applied Science and Engineering**. v. 11, n. 2, p. 203-211, 2013. <https://doi.org/10.1556/AChrom.21.2013.1.11>

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. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>

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

SINGH, N.; MISHRA, B.B.; BAJPAI, S.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22, n.1, p. 18–45, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. <https://doi.org/10.11606/D.10.2007.tde-12122007-171752>

SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ed. UFOP, 2012.

SRINIVASAN, G.V.; UNNIKRISHNAN, K.P.; BALACHANDRAN, I. HPLC Estimation of berberine in *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. **Indian Journal Pharmacy Science**. v. 70, n. 1, p. 96-99, 2008.

THE PLANT LIST. A working list of all known plant species. Version 1, released in December, 2010.

VALDIVIA, H.O.; SCHOLTE, L.S.; OLIVEIRA, G.; GABALDÓN, T.; BARTHOLOMEU, D.C. The *Leishmania* metaphylome: a comprehensive survey of *Leishmania* protein phylogenetic relationships. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, p. 887-900, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2091-2>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2007.02680.x>

VAN GRIENSVEN, J. BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70011-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70011-6)

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27 n. 1, p. 1-7, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M.; Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 1. Berlim: Springer-Verlag, p. 320,1984. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02398-3>

WHO. Weekly epidemiological record. **World Helth Organization**, v. 38, n. 92, p. 557–572, 2017.

WHO. Leishmaniasis fact sheet. < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>, Acesso em 15/06/2018.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**. v. 38, p. 147-160, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.micpat.2004.11.002>

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