



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DO LAPACHOL E ANÁLOGOS

ERICA VANESSA SOUZA COSTA

BELÉM-PA
2018

ERICA VANESSA SOUZA COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DO LAPACHOL E
ANÁLOGOS**

Autora: Erica Vanessa Souza Costa
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela
Co-Orientador: Prof. Dr. Martin Johannes Enk

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

COSTA, ERICA VANESSA SOUZA
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DO LAPACHOL E ANÁLOGOS / ERICA
VANESSA SOUZA COSTA. — 2018
104 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF),
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Me. MARIA FÂNI DOLABELA
Coorientação: Prof. Dr. MARTIN JOHANNES ENK.

1. Lapachol, beta-lapachona, alfa-lapachona, atividade esquistossomicida. I. DOLABELA,
MARIA FÂNI, *orient.* II. Título

CDD 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

ERICA VANESSA SOUZA COSTA

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DO LAPACHOL E ANÁLOGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela – Orientadora

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas -UFPA

Ass.: _____

Prof. Dr. Martin Johannes Enk - Co-orientador

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Ass.: _____

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Baetas Gonçalves

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas -UFPA

Ass.: _____

Dr^a. Flávia Fernanda Búbula Couto

Instituição: Centro de Pesquisas René Rachou – Fio Cruz Minas

Ass.: _____

RESUMO

Erica Vanessa Souza Costa. **Atividade Esquistossomicida do Lapachol e Análogos**. 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

A equistossomose mansônica é uma doença parasitária de abrangência mundial, causada pelo *Schistosoma mansoni*, sendo realizado o tratamento com o praziquantel, que possui algumas reações adversas. A busca de novos medicamentos para o tratamento desta enfermidade é importante e as plantas medicinais podem contribuir com novas moléculas promissoras, como por exemplo o lapachol. O presente trabalho avaliou a atividade esquistossomicida do lapachol e análogos. O lapachol foi isolado de *Handroanthus serratifolius*, através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando com fase móvel o diclorometano. Esta substância foi submetida ao tratamento com ácido sulfúrico, seguido de água destilada e diclorometano sendo obtido o β -lapachona. Para a obtenção da α -lapachona, solubilizou-se o lapachol e adicionou-se ácido acético glacial e ácido clorídrico concentrado. Para avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* foi realizado experimento frente a vermes adultos de *S. mansoni*, sendo avaliado alterações de morfologia, motilidade e mortalidade em microscopia óptica. A substância ativa foi submetida ao ensaio de peroxidação lipídica, Dosagem de Malondialdeído (MDA) e Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC). Além disso, a substância ativa foi submetida ao ensaio de viabilidade celular (MTT), utilizando as seguintes linhagens, epitelial gástrica (MNP01) e adenocarcinoma gástrico (ACP02). A amostra ativa foi submetida a estudo *in vivo*, em camundongos infectados, onde se avaliou mortalidade dos vermes, diminuição da oviposição, e dos danos causados pelos parasitas nos animais. Também, foi realizado estudo histológico de rim e fígado do camundongo infectado tratado com a β -lapachona. O lapachol (rendimento=2,9%) e α -lapachona (rendimento=52%) mostraram pouco promissores como esquistossomicida, sendo suas concentrações inibitórias 50% superior a 500 μ g/mL em vermes adultos, enquanto que β -lapachona (rendimento=58%) mostrou-se muito promissora contra os vermes adultos (CI₅₀< 31,25mg/mL). Análises em microscopia óptica demonstraram que os vermes tratados com β -lapachona apresentaram as seguintes alterações, o dorso estremecido, corpo enrolado, e ausência de movimento, estas alterações podem estar relacionadas a peroxidação lipídica da membrana do parasito. Este composto possui baixa capacidade antioxidante, baixa citotoxicidade para as linhagens MNP01 e ACP02, sendo o índice de seletividade superior a 10. Estudo *in vivo* demonstrou que a β -lapachona não reduziu o número de ovos nas fezes, logo não inibiu a ovoposição, também não houve alteração do número de vermes recuperados, sendo que análises microscópicas demonstraram que estes apresentavam motilidade e sua membrana estava íntegra. Estudos histológicos demonstraram que não houve alterações renais e hepáticas. Em síntese, *in vitro* a β -lapachona mostrou-se promissora como esquistossomicida e esta atividade pode estar relacionada a peroxidação lipídica da membrana do parasito. No entanto, estudo *in vivo*, não observou esta atividade, fatores farmacocinéticos podem estar influenciando na divergência dos resultados.

Palavras chaves: Lapachol, β -lapachona, α -lapachona, atividade esquistossomicida.

ABSTRACT

Erica Vanessa Souza Costa. **Schistosomicidal activity of Lapachol and Analogues. 2018.** 104 f. Dissertation (Master). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal doPará, Belém, 2018.

Mansonian schistosomiasis is a worldwide parasitic disease caused by *Schistosoma mansoni* and its treatment performed with praziquantel has some adverse reactions. The search for new drugs to treatment of this disease is important and medicinal plants can contribute with promising new molecules, such as lapachol. The present study evaluated the schistosomicidal activity of lapachol and analogues. Lapachol was isolated from *Handroanthus serratifolius* by silica gel chromatography column using dichloromethane as mobile phase. This substance was treated with sulfuric acid, followed by distilled water and dichloromethane to obtain β -lapachone. To obtain α -lapachone, lapachol was solubilized and glacial acetic acid and concentrated hydrochloric acid were added. In order to evaluate schistosomicidal activity *in vitro*, an experiment was carried out on adult worms of *S. mansoni*, and morphology, motility and mortality in optic microscopy were evaluated. The active substance was submitted to the lipid peroxidation test, Malondialdehyde Dosage (MDA) and Total Antioxidant Capacity (TEAC). In addition, the active substance was submitted to cell viability assay (MTT), using the gastric epithelial (MNP01) and gastric adenocarcinoma (ACP02) strains. The active sample was evaluated *in vivo* in infected mice, where worm mortality, oviposition decrease and damage caused by parasites in animals were evaluated. Also, a histological study of kidney and liver of infected mouse treated with β -lapachone was performed. Lapachol (yield = 2.9%) and α -lapachone (yield = 60%) were not promising as schistosomicide, with their inhibitory concentrations being 50% higher than 500 μ g/mL in adult worms, whereas β -lapachone (yield = 65%) was very promising against adult worms (IC₅₀ < 31.25 mg/mL). Analyses in optical microscopy showed that β -lapachone treated worms presented tremor back, curled body, and lack of movement, these alterations may be related to lipid peroxidation in parasite membrane. This compound has a low antioxidant capacity, low cytotoxicity for the MNP01 and ACP02 strains, and the selectivity index is higher than 10. *In vivo* study showed that β -lapachone did not reduce the number of eggs in the faeces, so it did not inhibit oviposition, and there were not alterations in the recovered worms number, and microscopic analysis showed they had motility and their membrane was integrated. Histological studies showed there were no renal and hepatic changes. In synthesis, β -lapachone is promising as an *in vitro* schistosomicide and this activity may be related to lipid peroxidation in parasite membrane. However, *in vitro* study did not observe this activity, pharmacokinetic factors may be influencing results divergence.

Key words: Lapachol, β -lapachone, α -lapachone, schistosomicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas do praziquantel e de naftoquinonas	16
Figura 2:Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 3:Estrutura química da Oxamniquina.....	20
Figura 4::Lapachol e seus metabólitos	24
Figura 5:Cascata de eventos dependentes da Tripanotionaredutase	28
Figura 6:Estrutura química de metabólitos do Lapachol	30
Figura 7:Conversão do Lapachol em β -lapachona e α -lapachona.....	31
Figura 8:Cascas dos troncos de <i>Handroanthus serratifolius</i>	43
Figura 9: Perfusão do sistema porta.	45
Figura 10:Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do lapachol e análogos.....	47
Figura 11: Síntese das atividades a serem desenvolvidas neste estudo.....	51
Figura 12:Espectro de RMN de ^1H do Lapachol (CDCl_3 , 200 MHz).	54
Figura 13: Esquema para obtenção da β -lapachona.....	56
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).	58
Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C da β -Lapachona (CDCl_3 , 50 MHz).....	59
Figura 16:Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).	62
Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C da α -Lapachona (CDCl_3 , 50 MHz).....	63
Figura 18:Atividade esquistossomicida de vermes adultos, lapachol e α -lapachona ...	69
Figura 19:Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> de vermes de β -lapachona.....	70
Figura 20: Processo redox de naftoquinonas	74
Figura 21: Ciclo redox induzido por quinonas.....	74
Figura 22: Análise histopatológica dos rins de camundongos infectados e submetido ao tratamento com praziquantel, β -lapachona e DMSO	77
Figura 23: Análise histopatológica dos rins de camundongos saudável	77
Figura 24: Lâminas de fígado de camundongo trataqdos com β -lapachona.....	78
Figura 25:Lâminas de fígado de camundongo saudável	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do lapachol isolada a partir do pó da casca de <i>H. Serratifolius</i> e dados da literatura.	53
Tabela 2: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de β -lapachona.	57
Tabela 3: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear da α -lapachona isolada.	61
Tabela 4: Atividade contra vermes adultos do lapachol e análogos.	68
Tabela 5: Dosagem do Malondialdeído presente nas amostras de β -lapachona e controles.	71
Tabela 6: Determinação da Capacidade Antioxidante total de β -lapachona e controles.	72
Tabela 7: Citotoxicidade e seletividade de β -lapachona.	73
Tabela 8: Avaliação da atividade <i>in vivo</i>	76
Tabela 9: Síntese dos resultados obtidos.	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

± - Mais ou menos

AIA - Artrite Induzida por Antígeno

β- Beta

°C - Graus Celsius

μg - Micrograma

μL - Microlitros

μM - Micromol

CC50 - Concentração citotóxica em 50% das células

CI50 – Concentração Inibitória em 50% das células

Cl - Cloro

cm – Centímetros

CIA - Artrite Induzida por Colágeno

CO₂ - Dióxido de carbono

COOH - Ácido carboxílico

DHODH -Diidroorotato Desidrogenase Humana

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBV - Vírus de Epstein-Barr

GR- Glutathione Redutase

HaCaT - Linhagem celular de queratinócitos humanos

HCl - Ácido clorídrico

HepG2 - *Liver hepatocellular carcinoma*

IS – Índice de seletividade

J - Constantes de acoplamento

mL - Mililitro

mm – Milímetro

mmol –milimol

MRPs - Proteínas Associadas à Resistência Multidrogas

OH – Hidroxila

NO – Óxido nítrico

P.A. - Padrão analítico

PLDR - Componente rápido de reparação dos danos ao DNA

PZQ - Praziquantel

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido Ribonucleico

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

rpm - Rotações por minuto

RPMI - Meio criado por *Roswell Park Memorial Institute*

THP-1 - *Cell Line human Leukemic monocyte*

T(S)2 - Tripanotiona Dissulfeto

T(SH)2 - Tripanotina Ditiol

TR- Tripanotiona redutase

TXN - Triparedoxina

TXNPx - Triparedoxina Peroxidase

VO – Via oral

v/v – Volume por volume

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível somente pelas parcerias, apoios, amizades e companheirismos feitos antes e durante os dois anos de elaboração da dissertação. À todos, os meus sinceros agradecimentos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À Deus, tudo por ele e à ele. Nos dias de maiores felicidades e dificuldades nunca estive só, pelo seu amor e compaixão.

À minha orientadora, Professora Maria Fâni Dolabela. Pela parceria firmada a mais de sete anos. Agradeço a oportunidade, confiança depositada e todos os conhecimentos repassados durante todos esses anos de trabalho. Fica aqui meu respeito, admiração e agradecimento por tudo que foi construído dentro e fora deste trabalho.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter tornado possível a execução deste trabalho, mesmo em meio a tantas dificuldades que a pesquisa vem enfrentado neste país. Em especial, as queridas Cliciane e Dona Brasília, que sempre ajudam e apóiam de todas as formas que encontram os alunos desesperado da pós-graduação. Obrigada por todo auxílio e carinho.

À CAPES como órgão fomentador desta pesquisa, pela bolsa concedida durante os dois anos de trabalho.

A todas parcerias firmadas para elaboração deste Trabalho. Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Instituto Evandro Chagas (IEC), Laboratório de Malária e Biologia Molecular, Laboratório de Malacologia e Esquistossomose; Fundação Oswaldo Cruz (Fio Cruz) – René Rachou, Belo Horizonte; Laboratório de Malacologia e Esquistossomose; Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo do ICB/UFPA.

À Universidade Federal de Ouro Preto, em especial ao Dr. Célio Brandão pela colaboração em realizar os espectros de RMN obtidos neste trabalho.

À todos do Laboratório de Malária e Biologia Molecular, IEC. À Dra Giselle Rachid Viana, coordenadora do laboratório, qual permitiu que grande parte deste trabalho fosse executado no laboratório e ainda fez valiosas contribuições na correção deste trabalho, meu respeito e gratidão. Em especial as amizades feitas neste ambiente, Zé Mário, Zema, por todo auxílio técnico, momentos de descontrações e amizade, Jéssica Marvão pela amizade e carinho e ao Leandro Góes, por todo apoio, palavras amigas, incentivo e carinho.

Ao Laboratório de Malacologia e Esquistossomose Mansônica (IEC). Ao meu Co-orientador Martin Enk, pela parceria firmada e todo conhecimento

AGRADECIMENTOS

repassado. A Joyce Favacho, por todo esforço, apoio e carinho repassado desde o início deste trabalho. Aos meus grandes amigos, que com muito carinho me ajudaram na elaboração deste trabalho, e que sem eles este trabalho não seria possível, Carlos Silva, Fernando, Carlos Júnior e Edilson. Meu muito obrigada, a esta equipe maravilhosa, vocês foram um presente de Deus. Não tenho palavras e nem como mensurar o quanto vocês foram essenciais para este trabalho.

Ao Laboratório de Esquistossomose da Fundação Oswaldo Cruz (Fio Cruz). À Dra Neusa Araújo que me recebeu de braços apertos, e que me repassou muitos conhecimentos e técnicas com atenção e carinho. Ao Matheus Oliveira, que mesmo em pouco tempo, me ajudou com companhia e amizade durante a viagem a Belo Horizonte. À minha amiga Sueleny Teixeira, pela amizade carinho, atenção e apoio. À Dra Flávia Couto que foi essencial para elaboração deste trabalho, por todo reconhecimento repassado com muita atenção e carinho, e continuou a me apoiar mesmo de longe.

Ao Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo do ICB/UFGA. Ao Dr Sandro Percário que permitiu que parte deste trabalho fosse executado no laboratório, agradeço pela parceria e por todo reconhecimento repassado. Ao meu grande amigo Rafael Quadros, por todo auxílio na execução de técnicas, interpretação de dados e sem dúvida por todo apoio, carinho e amizade criada durante esses anos.

À todos do Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas, onde dividimos muitas horas de companhia, experiências e construímos amizade. Agradeço em especial aos amigos, Valdicley Vale, e João Victor, pela amizade, por todo ensinamento, e apoio seja em execução de técnicas quanto na correção deste trabalho. Aos amigos Luiz Antonio, Jhessica Peniche, Erica Patrícia, Amanda Roberta, Letícia Hiromi, Kelly Albuquerque, Dayse Nascimento, Analu Damasceno, Mírian Barros, Marcus Lima, Andreza Veiga, Rosana Sarmento e Alexandre Rosa, agradeço pela amizade e companheirismo firmado nesse ambiente.

Aos meus amigos de trabalho da Drogaria Globo, que me apoiaram na reta final, Elizabeth Borges, Willy Gonçalves, Joel Lucas, Felipe Caldas e José Pamplona, seja torcendo por mim, ou me incentivando a concluir este trabalho.

Às minha amigas de graduação, que eu levei para a vida, Lindalva Ferreira, Izabela Coelho e Thaís Coelho, que sempre acreditaram em mim, incentivaram, e apoiaram. Obrigada pela amizade e carinho de vocês.

Às minhas amigas Lara Vinhal e Milena Cristina, que foram extremamente importante para a conclusão deste trabalho. Ao Raphael Coelho, que pacientemente ajudou e apoiou a mim e a Lara a finalizarmos partes deste

AGRADECIMENTOS

trabalho. Tivemos várias momentos difíceis e principalmente na reta final vocês foram indispensáveis, seja com palavras amigas, com incentivo e com o auxílio na execução de técnicas. Para as pessoas que dormiram comigo no laboratório para terminar uma técnica, sem dúvida eu tenho muito amor e gratidão.

Ao meu amigo Heliton Brígido, meu eterno orientador. Um amizade que Deus me deu durante a graduação, e que se estendeu durante a pós e para vida. Agradeço por todo apoio em todos os momentos, carinho e amizade. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos Pedro Fernandes, Beatriz Vianna, Frank Marques, Jamilly Ramos e Filipe Fernandes, a amizade e o apoio de vocês foram indispensáveis na difícil fase final deste trabalho. Obrigada por acreditarem em mim, e por todo carinho.

À minha família, que sempre torceu por mim. À minha mãe e irmã que são meu pilar de apoio, minhas maiores incentivadoras, e que sempre acreditaram no meu potencial. Sem vocês nada disso seria possível.

A todos amigos e colegas que passaram na minha vida ao longo destes dois anos e que ajudaram de forma direta ou indireta, seja com pensamento positivo, com palavras de incentivo ou de qualquer outra forma, meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Lapachol e seus análogos.....	22
2.1.1. β -lapachona.....	31
2.1.2. α -Lapachona.....	36
3 OBJETIVO.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Material.....	38
4.1.1 EQUIPAMENTOS.....	38
4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO.....	39
4.1.2.1 Solventes e Reagentes.....	39
4.1.2.2 Meio de Cultura e Outros.....	39
4.1.2.3 Materiais plásticos, de metal e de vidro.....	40
4.1.2.4 Vidrarias.....	40
4.1.2.5 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO.....	41
4.1.2.5.1 Meio RPMI 1640 para cultivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
4.1.2.5.2 Meio RPMI para cultura de células.....	41
4.1.2.5.3. Solução salina 0,85% heparinizada.....	42
4.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
4.1.3.1 Coleta e identificação do material vegetal utilizado para a extração do lapachol.....	42
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 OBTENÇÃO DO LAPACHOL, α -LAPACHONA E β -LAPACHONA.....	43
4.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	44
4.2.2.1. Aspectos éticos e manutenção dos animais.....	44
4.2.2.2. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> em vermes adultos.....	45
4.2.2.3. Ensaio de viabilidade celular.....	48
4.2.2.4. Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	49
4.2.2.5. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC).....	49
4.2.2.6. Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vivo</i>	50
4.2.2.7- Análise Histológica.....	50

SUMÁRIO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. OBTENÇÃO DO LAPACHOL E ANÁLOGOS	52
5.2. ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	64
5.2.1. Atividade contra vermes adultos <i>in vitro</i>	64
5.2.2. Atividade Esquistossomicida <i>in vivo</i>	75
CONCLUSÃO	79
8 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, doença debilitante causada por parasitas do gênero *Schistosoma* spp. constitui um dos maiores problemas mundiais na saúde pública, sendo a segunda doença infecciosa mais prevalente em áreas tropicais e subtropicais (KING et al. 2010, WHO, 2016, COSTA et al. 2017). A esquistossomose é endêmica em 78 países, com um número de pessoas infectadas de mais de 200 milhões e pelo menos 200 mil mortes a cada ano (WHO, 2016). O Brasil é o país mais afetado nas Américas, com cerca de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (BRASIL, 2010; 2014).

O tratamento medicamentoso da esquistossomose é realizado com o praziquantel (PZQ; Figura 1a), pois este é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam seres humanos (HOTEZ et al. 2007). O mecanismo de ação não está completamente elucidado (SHAOHONG et al. 2006; TALLIMA & RIDI, 2007), porém, já se sabe que o praziquantel atua na homeostase do fluxo de íons cálcio causando espasmos, danos no tegumento e paralisia muscular em vermes adultos (JIRAUNGKOORSKUL et al. 2005; TALLIMA & RIDI, 2007).

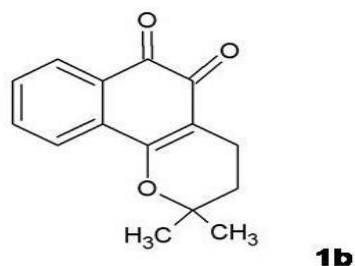
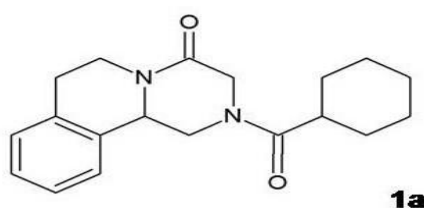
Vários eventos adversos têm sido notificados durante o tratamento de pacientes com esquistossomose com praziquantel, como: eosinofilia pode ser uma consequência de uma resposta imunológica induzida durante a morte dos vermes; urticária que pode, também, resultar de uma resposta imunológica; dor abdominal pode ser grave e pode ser associada a febre, transpiração e fezes sangrentas; alterações reversíveis das provas de função hepática (DYNAMED, 2017); arritmia cardíaca; tontura e convulsão (MICROMEDEX, 2017). Reações de hipersensibilidade cutânea têm sido relatadas para o praziquantel e, neste caso, o uso do fármaco é contraindicado (DYNAMED, 2017; MICROMEDEX, 2017).

A resistência do *Schistosoma* tem sido descrita, acarretando uma diminuição na eficácia do tratamento (STELMA et al. 1995; GUISSSE et al.

1997; ISMAIL et al. 1999). Devido à resistência do parasito ao praziquantel e persistência da infecção (MAGALHÃES et al. 2009, MIRANDA et al. 2012; ABDEL-HAFEEZ et al. 2012), associado a frequentes notificações de eventos adversos (LEITE et al. 1989, VIANA et al. 1990; FILHO PARISE & SILVEIRA 2001; VITORRINO, 2012), torna-se urgente buscar alternativas terapêuticas e de estudos que visem a busca de novos fármacos esquistossomicida (COUTO, 2014; ARAUJO, 2016).

Em relação a busca de compostos antiparasitários, as plantas possuem uma variedade de metabólitos secundários, sendo que várias classes mostraram-se promissoras para várias atividades biológicas, como antifúngica, microbiológica, e antiparasitária (ARAÚJO et al. 2007; MAGALHÃES et al. 2009), dentre estas destacam-se: os alcaloides e as naftoquinonas. Alcaloides (ROCHA, 2013; GUIMARÃES et al. 2015), terpenos (RAMALHETE et al. 2012) e naftoquinonas (FONSECA, BRAGA & SANTANA 2003; HUSSAIN et al., 2007) mostraram-se ativos em *S. mansoni*. Alcaloides e naftoquinonas também apresentaram atividades antiplasmódica (SACAU et al. 2005), leishmanicida (KAYSER et al. 2000; QUEIROZ et al. 1996) e tripanosomicida (BOURGUINHON et al. 2011).

A β -lapachona (Figura 1b), naftoquinona, apresentou atividade *in vitro* contra *S. mansoni* (100 μ M=100% morte dos parasitas em 24 horas; AIRES et al. 2014a, 2014b), sendo esta atividade associada a geração de espécies reativas de oxigênio, ocasionando o estresse oxidativo (SILVA et al. 2005; BOURGUIGNON et al. 2011). Outras naftoquinonas, por exemplo, lapachol (Figura 1c) e α -lapachona (Figura 1d), carecem de estudos para esta atividade.



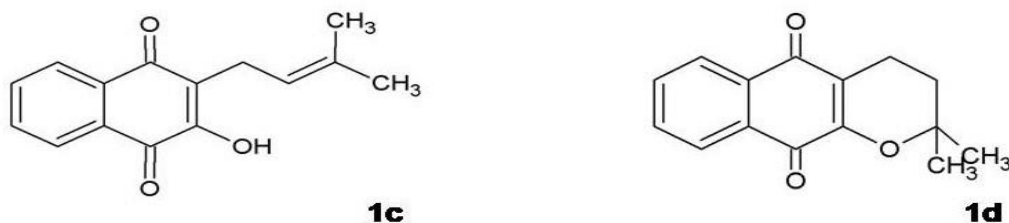


Figura 1: Estruturas químicas do praziquantel e de naftoquinonas

Legenda: 1a: Praziquantel, 1b: β -lapachona, 1c: Lapachol, 1d: α -lapachona.

Várias espécies pertencentes a família Bignoneaceae sintetizam lapachol e análogos, em especial as espécies pertencentes ao gênero *Handroanthus*. Também a β -lapachona e α -lapachona podem ser obtidos através do lapachol, sendo aquelas naftoquinonas isômeros conformacionais do lapachol (BARBOSA & NETO, 2013). Estudos tem relacionado as alterações conformacionais destas naftoquinonas com redução ou elevação de atividades biológicas (COSTA, 2012), no entanto existe uma carência de pesquisas que compararam a atividade esquistossomicida destas moléculas, justificando a realização deste trabalho. A hipótese deste trabalho é que o lapachol, α -lapachona e β -lapachona possuem atividades inibitórias contra os vermes adultos de *S. mansoni* e que a peroxidação lipídica pode estar relacionada nesta atividade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária, conhecida popularmente como "barriga d'água" ou "xistose", ocorrendo, principalmente, em locais com saneamento precário. Esta enfermidade é causada pelo *Schistosoma mansoni*, acredita-se que este agente tenha sido introduzido no Brasil através do tráfico de escravos africanos já infectados pelo parasito. Com o fluxo migratório interno, a endemia se distribui para as diferentes regiões do país, sendo que em todos os locais ocorriam os seus hospedeiros intermediários, o caramujo *Biomphalaria* (MILAN et al. 2007; PRATA et al. 2007; SOUZA, 2011).

A esquistossomose mansônica é de abrangência mundial, presente em 78 países, com destaque na África e Leste do Mediterrâneo, atingindo as regiões do Delta do Nilo e países como Egito e Sudão. Também, ocorre na Ásia, em especial na China e ao longo do rio Mekongi. Cerca de 700 milhões de pessoas no mundo vivem em áreas endêmicas para essa doença, sendo que 243 milhões estão infectados (WHO, 2016). Nas Américas, atinge a América do Sul, destacando-se a região do Caribe, Venezuela e Brasil, sendo que a maior ocorrência é neste país (BRASIL, 2014).

No Brasil, entre 2013 a 2015, foram notificados cerca de 106.000 casos (BRASIL, 2015). No entanto, acredita-se que o número de pessoas acometidas seja maior, pois ainda existe subnotificação da doença (WHO, 2016). Atualmente, esta enfermidade ocorre em todas as regiões do país, sendo observado maiores ocorrências nos Estados das regiões Nordeste e Sudeste, tais como: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Maranhão, Piauí, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo. Também, foram notificados casos na região sul (Rio grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e na região Centro-oeste (Goiás e Distrito Federal). No Estado do Pará, a distribuição da doença é focal ocorrendo no nordeste paraense e em Belém, apresentando-se como foco de

baixa endemicidade, mas com potencial de expansão para seu entorno (BRASIL, 2014). Segundo o último Inquérito de Prevalência da Esquistossomose, realizado no Brasil em escolares de 7 a 17 anos o número de escolares infectados é alto, sendo que os maiores índices 1,27% e 2,35%, foram nas macrorregiões Nordeste e Sudeste. Na macrorregião Norte, a positividade foi de 0,01%, na Centro-Oeste de 0,02% e na Sul, nenhum caso foi diagnosticado. (BRASIL, 2018)

Além do *S. mansoni*, existem outras espécies do gênero *Schistosoma*, que podem infectar os humanos, como: *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. mattheei* e *S. malayensis*. No entanto, o *S. mansoni* é a espécie com maior distribuição global e a única espécie causadora da esquistossomose no Brasil (BERGQUIST, 2002; SALES, 2005; COUTO, 2008), pois as demais espécies não encontraram moluscos suscetíveis neste país (SILVA et al. 2012).

Em termos taxonômicos, o *S. mansoni* é um platelminto, da classe dos trematódeos, pertencente ao gênero *Schistosoma*. Estes parasitos são digenéticos, apresentam dimorfismo sexual na fase adulta e possuem o corpo achatado dorso-ventralmente. A fêmea mede cerca de 1,5 cm e possui tegumento liso e se abriga na época da reprodução, no canal ginecóforo do macho, que mede cerca de 1,0 cm e seu tegumento é coberto por tubérculos e espinhas (GRYSSELS, 2012).

O homem (principal hospedeiro definitivo) ao entrar em contato com águas contaminadas com cercárias, forma larval do *S. mansoni*, se infecta com o parasito. Durante a penetração na pele, as cercárias perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos que migram para o sistema porta hepático, onde se forma o verme adulto. Os helmintos adultos, machos e fêmeas, migram para as veias mesentéricas, onde acasalam e depositam seus ovos que são eliminados nas fezes, e/ou vão para os órgãos. Estes ovos, após contato com a água, liberam os miracídios que penetram no hospedeiro intermediário, evoluindo para esporocistos I, que irão evoluir para esporocistos II, dando origem as cercárias que serão liberadas na água, sendo a forma infectante para o homem (COUTO, 2014; Figura 2).

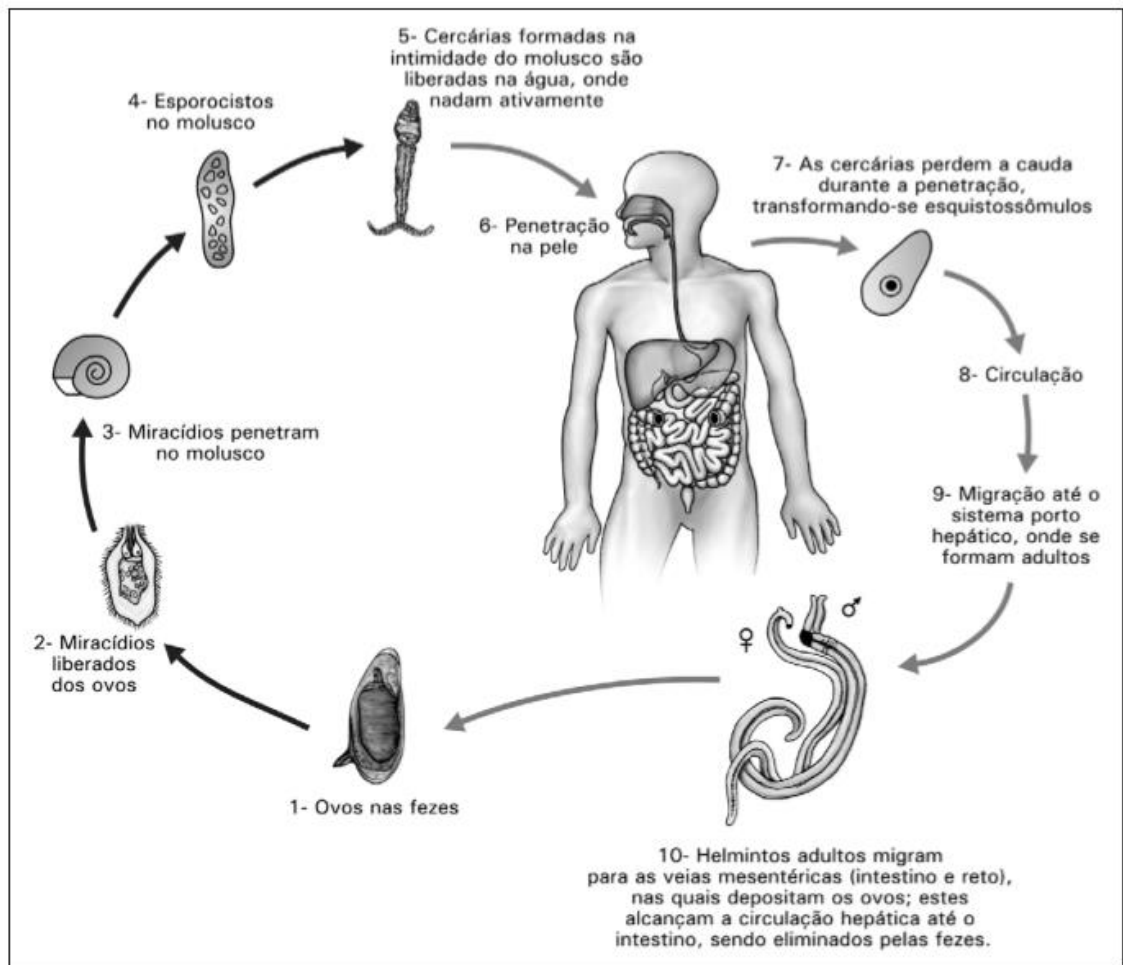


Figura 2:Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*
Fonte:Souza et al. 2011.

A maioria das pessoas infectadas, que moram em áreas endêmicas, apresentam sintomas leves, sendo que estes podem variar dependendo da fase da infecção. Na fase da penetração pode ocorrer: dermatite cercariana causada pelas cercárias na pele. Após dez dias, pode-se iniciar a forma aguda que dura em média de 50 a 120 dias, com febre, calafrios, fadiga, dor de cabeça, no abdômen e articulações e apatia. A forma crônica se divide em três formas; inicialmente a forma hepática, seguida pela fase hepatointestinal e finalmente a forma mais grave da doença a forma hepatoesplênica, mostrando a fibrose periportal, resultando em hipertensão do sistema porta, ascite e hepatoesplenomegalia, podendo evoluir para óbito (COUTO et al. 2008; SALES et al. 2009; COUTO, 2014).

Quando realizado o diagnóstico laboratorial precoce, e tratamento medicamentoso adequado, ocorre a cura, redução da morbidade, mortalidade e controle da transmissão. Inicialmente, o tratamento foi realizado com os antimonais lucantona, hincantona, niridazol, porém estes fármacos são muito tóxicos, por isso foram substituídos (KATZ & ALMEIDA, 2003) pela oxamniquina (Figura 3) e Praziquantel (Figura 1a).

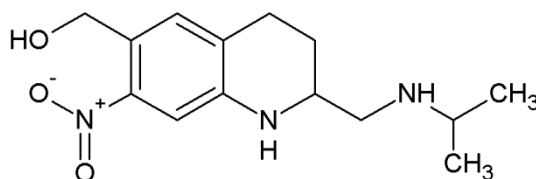


Figura 3: Estrutura química da Oxamniquina

O uso da oxamniquina como esquistossomicida iniciou nos anos 70 (séc. XX; FENWICK et al. 2003), sendo este fármaco efetivo em todos os estágios do *S. mansoni* (COUTO, 2014). O uso de oxamniquina pode ocasionar diferentes reações adversas, tais como: *rash* cutâneo, febre, dor abdominal, náusea, vômito, diarreia, eosinofilia, alterações das enzimas hepáticas, mialgias, tonturas, dor de cabeça, amnésia, alucinações e distorções da realidade, convulsões e alteração na coloração da urina (MICROMEDEX, 2017). O relato de resistência ao medicamento (ARAUJO et al. 1996; COELHO et al. 1997), associado ao estreito espectro de ação, inúmeros eventos adversos, produção cara e complexa culminaram com a substituição da oxamniquina pelo praziquantel. (COUTO, 2014).

O praziquantel é efetivo contra *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mattheei* (GÖNNERT & ANDREWS, 1977; ANDREWS et al. 1983; DOENHOFF et al. 2002), atua em diferentes formas clínicas, no entanto é pouco efetivo em vermes jovens, sendo mais eficaz em vermes adultos fêmeas, (GÖNNERT & ANDREWS, 1977). Conforme dito anteriormente, vários eventos adversos têm sido associados ao uso do praziquantel a frequência das reações adversas está diretamente ligada a intensidade da infecção (DAYAN, 2003).

A resistência do *S. mansoniae* praziquantel foi descrita em diferentes estudos (FALLON & DOENHOFF, 1994; STELMA et al. 1995; ARAÚJO et al. 1996; IISMAIL et al. 1999; BONESSO-SABADINI & DIAS, 2002; COUTO et al. 2011; COELI et al. 2013), os parasitos resistentes podem apresentar redução da produção de cercarias e aumento da virulência (LAMBERTON, 2005). Um dos mecanismos supostos e estudados de resistência do *S. mansoni* ao praziquantel envolve as MRPs (proteínas associadas à resistência multidrogas), onde o PZQ pode interagir com as MRPs de diferentes formas, como um substrato ou como um inibidor de transporte mediado pelas proteínas transportadoras ABC, sendo possível que estas proteínas possam estar envolvidas na resistência do *Schistosoma* ao PZQ, ou seja, por mecanismo de bomba de efluxo que jogam o fármaco para fora (JAMES et al. 2009).

Em virtude do praziquantel ser, a única opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose mansônica e a resistência do parasito ao fármaco ser crescente, torna-se necessário buscar alternativas terapêuticas (FENWICK & WEBSTER, 2006). O artemeter e artesunato apresentam propriedades esquistossomicida, sendo mais ativos nos vermes imaturos do que nos vermes maduros de *S. mansoni* e *S. japonicum*. No entanto esses medicamentos são utilizados em outras terapêuticas, como o tratamento da malária, podendo contribuir para a propagação da resistência das pessoas co-infectadas com malária e esquistossomose (BOTROS et al. 2005).

Neste cenário, torna-se importante buscar outras alternativas terapêuticas. A atovaquona é uma naftoquinona, sendo um análogo lipofílico do lapachol (EL HAGE et al. 2009), e sua atividade antiparasitária tem sido relacionada com a interferência no transporte de elétrons nas mitocôndrias do parasito (ZHOU et al. 2009). Vale ressaltar que o lapachol e seu análogo isolapachol apresentaram atividade contra cercarias e ovos de *S. mansoni* (LIMA et al. 2002). Outro análogo do lapachol, a β -lapachona também se mostrou promissora como esquistossomicida (AIRES et al. 2014a, 2014b). Entretanto, estudos que visem compreender se mudanças conformacionais interferem nesta atividade, se existem uma relação direta entre a atividade e a peroxidação lipídica e estresse oxidativo precisam ser realizados.

2.1 Lapachol e seus análogos

O lapachol, hidroxi-naftoquinona, foi isolado pela primeira vez da espécie *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. (Bignoniaceae; PATERNO et al. 1882), sendo posteriormente isolada de outras espécies pertencentes a família Bignoniaceae (SAGRERO-NIEVES et al. 1986; TESSIER et al. 1988; OLIVEIRA et al. 1990; SAIZARBITORIA et al. 1997; DUARTE et al. 2000; ITO et al. 2000; SHETGIRI et al. 2001; HUSSAIN et al. 2007). Várias atividades biológicas têm sido atribuídas ao lapachol, dentre estas destacam-se: antitumoral (RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968; SANTANA et al. 1980; MURRAY & PIZZORNO, 1998), antimicrobiana (LIMA et al. 1962; ANTUNES, 2006), antiparasitária (WENDEL, 1946; GOULART et al. 1997; PINTO et al. 2000) e anti-inflamatória (ALMEIDA, 1990).

Na maioria dos estudos realizados, o lapachol mostrou-se promissor como anti-inflamatório (WANICK, 1970; ALMEIDA et al. 1990) e imunomoduladores (FONSECA, BRAGA & SANTANA 2003; BARBOSA-FILHO et al. 2006). A atividade anti-inflamatória do lapachol foi avaliada nos modelos de indução de edema de pata pela carragenina e indução de abscesso por carragenina em ratos, sendo demonstrado uma ação anti-edematogênica significativa nas doses de 100 e 500mg/Kg (76 e 85%, respectivamente). Também foi observado uma redução no peso do abscesso induzido pela carragenina (150mg/kg= 57%; ALMEIDA et al. 1990).

A atividade do lapachol sobre a artrite foi avaliada em 2 modelos: 1) a artrite induzida por colágeno (CIA), um modelo pré-clínico dependente de células T bem estabelecido para a artrite reumatoide. Os camundongos foram tratados com lapachol (V.O= 3 mg/kg e 10 mg/kg, uma vez ao dia durante 4 semanas), sendo bem tolerado pelos ratos e sem efeitos colaterais aparentes, também não houveram alterações significativas nas provas de função hepática. Esta substância atenuou a gravidade da artrite, reduziu todas as características histopatológicas da gravidade da artrite quando comparadas ao grupo tratado com veículo. Além disso, na dose de 10 mg/kg, reduziu significativamente os

níveis de IL-17a. 2) Os efeitos imunomoduladores foram avaliados onde se observou uma resposta promissora (RAMACHANDRAN et al. 2011). Ainda existe carência de estudos que avaliem a atividade antinociceptivo lapacholem modelos de câncer. Os estudos realizados, em geral, visam avaliar o efeito antitumoral do lapachol.

Visando potencializar a atividade do lapachol, foram realizadas alterações estruturais obtendo uma série de compostos e estes foram avaliados, *in vitro*, em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT). O lapachol e α -lapachona apresentaram efeito inibitório inferior ($CC_{50} > 10 \mu M$ e $10 \mu M$) ao fármaco utilizado para o tratamento da psoríase, antelina ($CC_{50} = 0,7mM$). No entanto, a β -lapachona apresentou atividade semelhante a este fármaco ($CC_{50} = 0,7\mu M$). Os derivados do lapachol ativos também causaram danos significativos na membrana de células e aumentaram a liberação da lactato desidrogenase, devido à sua potente atividade contra o crescimento de queratinócitos humanos, a β -lapachona parece ser promissora como antipsoríase (MULLER; SELLMER; WIEGREBE, 1999)

O primeiro estudo para atividade antitumoral do lapachol foi realizado em ratos em tumor de Walker 256e demonstrou que esta substância era promissora (RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968). Então, foram realizados os estudos clínicos de Fase I, que não observaram uma resposta clinica satisfatória e nem efeitos colaterais significativos, neste contexto a pesquisa foi interrompida (BLOCK et al. 1974). Alguns anos depois, foi realizado um novo estudo clínico com 9 pacientes com diferentes tipos de câncer (fígado, rim, mama, próstata e colo do útero), sendo observado redução significativa do tumor e da dor, e em três pacientes houve a completa remissão do tumor (SANTANA et al. 1980).

O lapachol é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal em ratos com tumor de Walker 256, porém parece que absorção intestinal desta substância no homem é consideravelmente menor que a dos ratos (NAYAK et al. 1968). Os pacientes, com tumor de Walker, foram tratados com lapachol, (doses=0,5g/6 horas/5 dias), sendo observado concentrações plasmáticas na faixa subterapêutica em ambos esquemas ($< 30\mu g/mL$; BLOCK et al. 1974).

O Lapachol é ativado, *in vivo*, pelas enzimas hepáticas do citocromo P450 NADPH-redutase (P450 redutase), então as espécies reativas promovem a fragmentação do DNA através da geração do redox ciclismo (KUMAGAI et al. 1997). No metabolismo de fase I do lapachol, são obtidos metabólitos hidroxilados, com hidrogenação na posição de oxigênio ou um rearranjo de cadeia lateral. Os metabólitos da fase II são produtos da conjugação com o ácido glicurônico (BAI et al. 2014), então estes produtos são excretados por via renal ou fecal (Figura 4). Vale ressaltar que estudos *in silico* demonstraram que o lapachol inibe enzimas do citocromo P450 (CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4; FERREIRA, 2016).

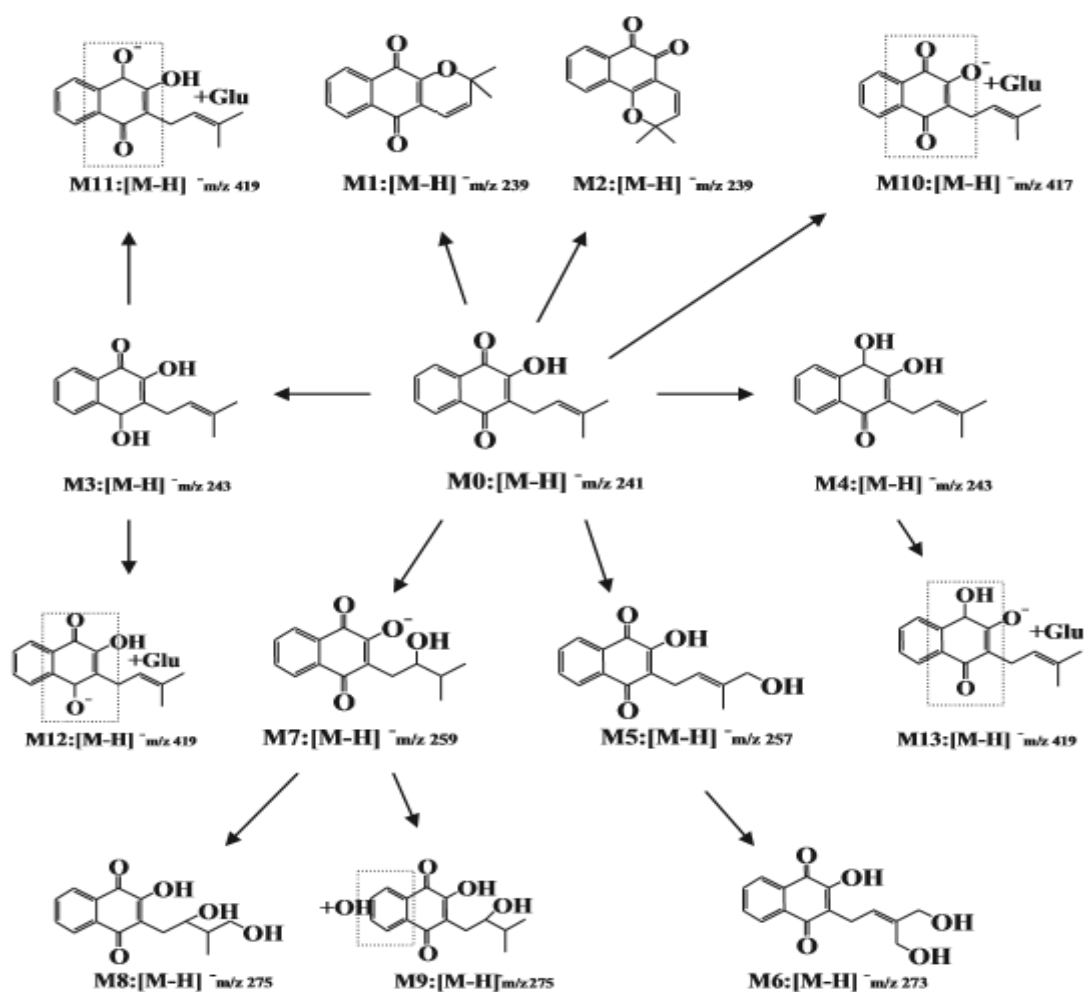


Figura 4: Lapachol e seus metabólitos

Legenda: M2: identificado como sendo um diidro- β-lapachona (2,2-dimetilnafto [1,2-b] piran-5,6-diona); M3 e M4: isômeros hidrogenados do lapachol(semiquinona); M5: hidroxilapachol, com a hidroxilação na porção de cadeia lateral de prenil do Lapachol; M6: formado a partir da hidroxilação de M5; M7: 2-hidroxi-3-(3-metil-2-hidroxibutil)-1,4-naftoquinona; M8 e M9: metabólitos hidroxilados do Lapachol; M10: conjugação de Lapachol com ácido glicurônico no grupo 2-hidroxilo do Lapachol; M11, M12 e M13: conjugados glicuronídeos de M3 e M4.

Fonte: BAI et al. 2014.

O lapachol distribui-se por todos os tecidos, exceto para o SNC, sendo rapidamente metabolizado em β -lapachona. Quando administrado IV, em camundongos (dose de 40mg/Kg), o tempo de meia-vida é de 33 minutos e a excreção é, prioritariamente, pelas fezes (NAYAK et al. 1968).

Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol deve estar relacionada a interação com ácidos nucleicos, ligando-se entre os pares de bases do DNA, com inibição subsequente da replicação do DNA e síntese de RNA (MURRAY & PIZZORNO, 1998). Apesar de tudo isso, esta substância não parece ser promissora como antitumoral, devido ser necessário altas doses deste fármaco para obter o efeito antitumoral, o que pode elevar ao risco de eventos tóxicos (HUSSAIN et al. 2007).

A diidroorotato desidrogenase humana (DHODH) tem uma estrutura monomérica e está associada com a membrana interna das mitocôndrias, sua inibição bloqueia a síntese de ácidos nucleicos, impedindo a sua proliferação, pode ocasionar efeitos imunossupressivos e possuir efeito antiparasitário (VICENTE, 2013). Estudos *in silico* demonstraram que o lapachol se liga ao grupo prenil (Phe98) do bolsão hidrofóbico da diidroorotato desidrogenase humana (DHODH), também ocorrem ligações de hidrogênio adicionais com os resíduos Arg136 e Tir356. Em seguida, foi determinado *in vitro* a atividade inibitória da atividade DHODH do lapachol, indicando que esta substância é um potente inibidor da enzima (PERES et al. 2017).

Atividade antiproliferativa do lapachol foi avaliada células T CD4 murinas, sendo observada resposta antiproliferativa de forma dose dependente (>100mM), enquanto que em concentrações inferiores, o lapachol pode induzir apoptose em células T CD4. Então, investigou-se o possível mecanismo envolvido neste efeito, as células T CD4 humanas foram com lapachol na presença de diferentes concentrações de uridina e observou a reversão do efeito antiproliferativo. Estes resultados suportam a hipótese que o lapachol atue na DHOH. A uridina sozinha teve um efeito mínimo sobre a resposta proliferativa de células T estimuladas com anti-CD3 (PERES et al. 2017).

Algumas espécies vegetais ricas em lapachol são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças ocasionadas por bactérias (ALMEIDA

,1993; CARVALHO, 2003), por isso, estudos avaliaram esta atividade da planta e de seus metabólitos (ARAUJO, et al. 2012). Desde os primeiros (LIMA et al. 1956, 1962a, 1962b, 1971 e 1972), o lapachol mostrou-se mais ativo em bactérias gram positivas, porém foi observado sua atividade frente a algumas bactérias gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Brucella* (ANTUNES et al. 2006).

A atividade antibacteriana pelo método de difusão em placas do lapachol e alguns análogos (α -Lapachona, β -Lapachona, β -nor-lapachona, α -norlapachona, β -l-lapachona, α -l-lapachona), foi avaliada frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Saccharomices cerevisiae* (achados clínicos). O lapachol e todos seus análogos apresentaram halo de inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com exceção da α -Lapachona que não apresentou halo de inibição para esta última cepa, e apenas a β -lapachona e β -nor-lapachona apresentaram halo de inibição para *Saccharomices cerevisiae* (ANTUNES et al. 2006).

A atividade antiplasmódica do lapachol (CI_{50} = 24 μ M), β -lapachona (CI_{50} = 4,1 μ M) e seus derivados foi avaliada. No caso do lapachol, a adição de grupos OH, acil e alcóxil não contribuiu para a atividade, mas observou-se que mudanças estruturais em outras naftoquinonas podem aumentar a atividade antiplasmódica e seletividade, mantendo a segurança. (PEREZ-SACAU et al. 2005). Outro trabalho avaliou a atividade de derivados da β -lapachona contra *P. falciparum*, apresentando atividade moderada. No entanto, quando administrado por via subcutânea em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, estes compostos foram ativos (ANDRADE-NETO et al., 2004). No organismo, o lapachol é reduzido formando um ânion semiquinona, que por sua vez, reduz o oxigênio molecular ao ânion radical superóxido e este na presença da enzima superóxido dismutase é transformado em peróxido de hidrogênio (SILVA et al. 2003). O ciclo redox das naftoquinonas, na presença de agente redutor, gera espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, que podem ocasionar a peroxidação lipídica (FERREIRA, 2008).

A geração de espécies reativas de oxigênio pode levar estresse oxidativo e/ou a alquilação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, podendo levar ao dano parasitário (DOS SANTOS et al. 2004; VILAMIL-FERNANDEZ et al. 2004). Outras naftoquinonas podem colapsar o potencial da membrana mitocondrial (SRIVASTAVA et al. 1997; SCHUCK et al. 2013), podendo levar a apoptose ou necrose (SOUZA et al. 2014).

Além da atividade antiplasmódica, estudos avaliaram a atividade leishmanicida do lapachol apresentaram resultados controversos, isto é, *in vitro* o lapachol foi ativo contra amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVb; 0.0125-4.0 µg/mL). No entanto, em camundongos tratados com lapachol (VO, 300 mg/kg/dia durante 42 dias), infectados com LVb, observou-se que a presença de lesões induzidas pelo parasito. O lapachol demonstrou ter atividade leishmanicida *in vitro*, porém baixa atividade *in vivo*, sugerindo que o lapachol, *in vivo*, pode inibir a atividade microbicida de macrófagos. Outras possibilidades para explicar esta divergência são: que o metabolismo do lapachol origina metabolito (s) inativo (s) ou na dose utilizada não foi possível alcançar o nível plasmático na faixa terapêutica de forma sustentada (TEIXEIRA et al. 2001).

Outros estudos avaliaram a atividade antipromastigota do lapachol em *L. Amazonensis* (CI₅₀= 5,2µg/mL e CI₅₀> 500µg/mL; LIMA et al. 2004; COSTA et al. 2017) e *L. braziliensis* (CI₅₀= 11,9 µg/mL; LIMA et al. 2004).

Os efeitos do lapachol sobre promastigotas foram avaliados por citometria de fluxo e respirometria, observando a perda do potencial de membrana mitocondrial e a redução do consumo de oxigênio pelos parasitos. Análises de microscopia eletrônica de transmissão mostraram danos no complexo de Golgi e na bolsa flagelar, formação de vesículas e perfil de autofagia, além disso havia alterações ultraestruturais nas mitocôndrias. Em conjunto, os resultados permitem propor que a mitocôndria seja um importante alvo para o lapachol (TUNES, 2005). Além da leishmania, o lapachol foi ativo em tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (SANTOS et al. 2001).

A tripanotona redutase (TR) é uma flavoproteína dissulfeto redutase que depende de NADPH e apenas é encontrada *T. cruzi* e *Leishmania*. Tem função antioxidante, sendo a principal forma de controle de espécies reativas de oxigênio (ROS) nesses parasitas, essa proteína substitui a glutathiona redutase (GR) que é encontrada nos seres humanos (FAIRLAMB & CERANI, 1992; MÜLLER et al. 2003). A TR é importante na redução da tripanotona dissulfeto [T(S)₂] em tripanotinaditiol [T(SH)₂], pois catalisa esse processo, consequentemente desencadeia uma cascata de eventos que neutralizam ROS (Figura 5). A ausência ou diminuição de TR permite a elevação da ROS dentro do parasito podendo levar a morte ou impedindo o crescimento (FAIRLAMB, 2001). Então, avaliou-se a atividade inibitória da TR pelo lapachol, *in silico*, sendo observado que esta ligação é favorável (Energia de interação=109,643 KJ/mol), também se liga aos seguintes resíduos Ala 159, Thr 51, Thr 51 e Gly 15 (FERREIRA, 2016). Estes resultados fortalecem a hipótese que o lapachol é promissor como leishmanicida e o mecanismo de ação, provavelmente, envolve a TR.

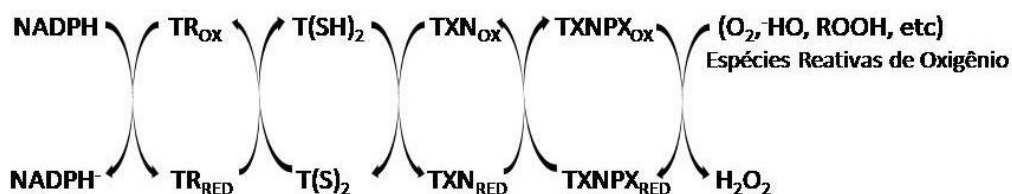


Figura 5: Cascata de eventos dependentes da Tripanotionaredutase
Fonte: Adaptado de Oliveira et al. 2008.

Além das atividades antiplasmódica (FONSECA, BRAGA & SANTANA 2003; Hussain et al., 2007), leishmanicida (COSTA, et al 2017) e tripanosomicida (HIRSCHMANN E PAPASTERGIOU, 2003), o lapachol parece ser promissor como esquistossomicida. Camundongos infectados com *S. mansoni* foram tratados com lapachol e apresentou, após 24h de tratamento, uma redução na taxa de infecção de 80%. O aumento do tempo de tratamento levou a redução na taxa de infecção para 96,6% (após 3 dias de tratamento). Outra observação importante foi: o lapachol é secretado pelas glândulas sebáceas, na pele atua como uma barreira tópica para a penetração (AUSTIN, 1974). Os sais de potássio de isolapachol e lapachol apresentaram atividade

moluscicida significativa contra o caramujo adulto ($LC_{90} < 7$ ppm) e massas de ovos de caracol ($CL_{90} < 3$ ppm), também apresentaram atividade cercaricidas revelaram fortes atividades para ambos os compostos (LIMA et al. 2002).

Devido seu potencial antitumoral do lapachol, vários estudos têm avaliado sua citotoxicidade e toxicidade. A citotoxicidade do lapachol foi avaliada em diferentes linhagens celulares: HepG2 (*liver hepato cellular carcinoma*), Macrófagos murinos, THP-1 modificado (*Cell Line human Leukemic monocyte*). Em células HepG2 ($CC_{50} = 201.77 \pm 5.32 \mu\text{g/mL}$) e em macrófagos murinos ($CC_{50} = 184.65 \pm 6.58 \mu\text{g/mL}$) observou-se moderada citotoxicidade (ROCHA et al. 2013), enquanto para as células THP-1 não foi observado citotoxicidade ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$; COSTA et al. 2017).

Os efeitos tóxicos do lapachol foram avaliados em roedores, cães e macacos. A dose única oral, em camundongos, a DL_{50} foi 0,621g/kg e em ratos albinos observou menor toxicidade ($DL_{50} = 2,4 \text{ g / kg}$). Os cães Beagle (V.O, doses diárias 0,25, 0,50, 1,0 ou 2,0g/kg, totalizando 24 doses) apresentaram alterações clínicas significativas, porém não foi observado efeito letal. Os macacos *Cynomolgus* foram tratados (0,5 ou 1,0 g / kg / dia/ 6 dias), e após a 6ª dose observou-se que 60% haviam falecidos. Sinais de toxicidade em cães e macacos incluíram: anemia moderada a grave, reticulocitose, normoblastose, palidez das mucosas, bilirrubinúria, proteinúria, trombocitose transitória e leucocitose, e atividade elevada de fosfatase alcalina sérica e tempos de protrombina ocorreram em cães. Leucopenia, trombocitopenia e azotemia foram observadas apenas em macacos. A anemia foi mais pronunciada durante as primeiras 2 semanas de tratamento (MORRISON et al. 1970).

Ratos Sprague Dowley foram tratados com lapachol (V.O, 150mg/kg/dia) por 30 dias e não foram observadas alterações significativas, no entanto, animais tratados com 500mg/Kg/dia morreram na 10ª dose e estudos patológicos não revelaram alterações significativa nos diversos órgãos destes animais analisados (MORRISON et al. 1970). Ratos Wistar adultos foram tratados com solução hidroalcoólica de lapachol (100 mg/kg de peso corporal), sendo observado uma redução significativa no peso da vesícula seminal, porém não foi detectada alteração significativa da produção de gameta, do peso corporal e

do peso dos outros órgãos analisados. Os resultados sugerem um efeito de toxicidade do lapachol na reprodução dos ratos, sendo a vesícula seminal um possível órgão alvo (SÁ & GUERRA, 2007).

O potencial teratogênico do lapachol foi avaliado em ratas prenhas (V.O 100mg/Kg), sendo observado grande incidência de reabsorção do ovo por ação bastocistotóxica-antizigótica e atividade abortiva, levando a má formação. A ação do Lapachol ocorre no início do período da divisão do ovo. (ALMEIDA et al. 1988). Outro estudo confirmou a embriofetividade do lapachol em ratas grávidas, mostrando que as mães não foram afetadas, porém ocorreu 99,2% de mortes fetais (GUERRA et al. 1999), considerando então o lapachol como, não tóxico para ratas prenhas, confirmado em um terceiro estudo (SOUZA et al. 2005). Estudos *in silico* do lapachol sugerem mutagenicidade e carcinogenicidade para rato (FERREIRA, 2016).

O Lapachol quando administrado por via oral, em pacientes com câncer, na dose de 4,0mg/Kg/6 horas/7 dias é metabolizado parcialmente em xiloidona (Figura 6a), sendo este metabolito e o lapachol excretado por via renal. Outros metabólitos excretados por via renal são α - e β -Lapachona, outros metabólitos do Lapachol são o Lomatiol (Figura 6b) e o Metabólito A (NAYAK et al. 1968; SHETGIRI et al. 2001).

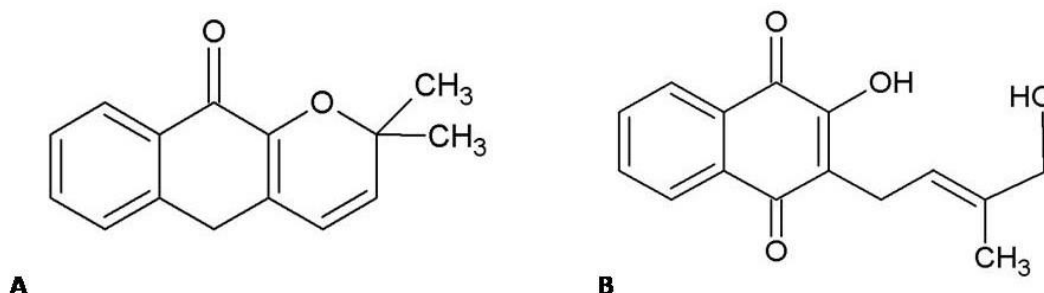


Figura 6: Estrutura química de metabólitos do Lapachol
Legenda: A= Xiloidona, B=Lomatiol

2.1.1. β -lapachona

Paterno (1882) obteve sinteticamente, pela primeira vez, a β -lapachona (Figura 1b), um isômero constitucional da lapachol. Nesta síntese foi realizado o tratamento ácido do lapachol (Figura 7). Posteriormente, outra naftoquinona foi identificada neste processo de transformação, a α -lapachona (HOOKER, 1936).

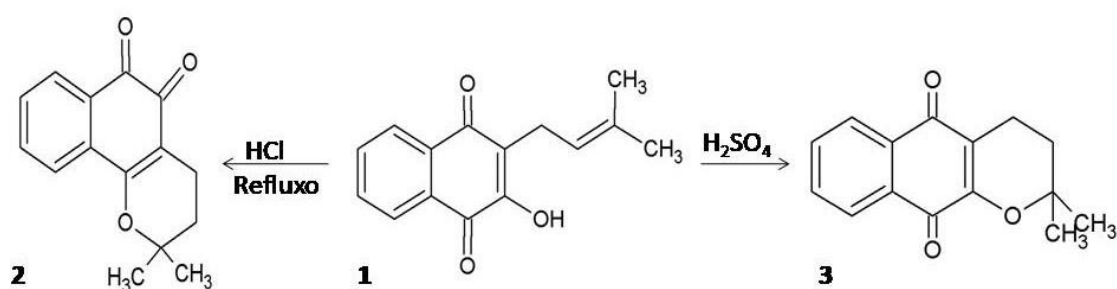


Figura 7: Conversão do Lapachol em β -lapachona e α -lapachona

Legenda: 1= Lapachol, 2= β -lapachona, 3= α -lapachona

Fonte: Adaptado de BARBOSA & NETO 2013.

A β -lapachona pode ser útil como agente anti-inflamatório, pois atenua doenças inflamatórias, inibiu, significativamente, a liberação de NO e PGE2. A inibição de iNOS e COX-2 também foi observada sugerindo o bloqueio dos níveis de transcrição. Além disso, o β -lapachona atenuou a expressão de mRNA e proteínas de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) α de uma maneira dependente da dose (MOON et al. 2007).

As alterações estruturais do lapachol, levando a síntese de β -lapachona contribuíram de forma significativa para a atividade antitumoral, sendo esta ativa contra uma variedade de células de câncer humano, incluindo câncer de mama, próstata e pulmão, bem como células de leucemia promielocítica (PLANCHON et al. 1995). Estudos mostraram que a ação do β -lapachona depende da expressão de NAD (P) H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1), sendo esta enzima superexpressa (até 20 vezes em tumor) em tumor do pâncreas (OUGH et al. 2005), pulmão (BEY et al. 2007), mama (BENTLE et al. 2006) e próstata (PINK et al. 2000). Foram observados níveis endógenos

elevados de NQO1, em 70% dos cânceres de próstata humana, no estágio inicial e final. NQO1 induz redox cíclico na célula, levando a uma quantidade substancial de espécies reativas de oxigênio que causam danos ao DNA. Aumento, concomitante, do Ca^{2+} no citosol derivado da hiperativação da poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1); NAD⁺/ Depleção de ATP; estimulação de uma resposta apoptótica, fragmentação do DNA e morte celular (TAGLIARINO et al. 2001). Além disso, a β -lapachona possui citotoxicidade seletiva para as células tumorais (DONG et al. 2009), pois estas possuem NQ1 que reduz a quinona em hidroquinona, iniciando um ciclo redox com uma perda concomitante de NADPH reduzido (PINK et al. 2000; OUGH et al. 2005).

Os efeitos da β -lapachona no crescimento do hepatoma humana (HepG2) foi avaliado, os resultados mostraram inibição da viabilidade e indução de apoptose, com formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA. Este estudo indicou que o tratamento de células com β -lapachona resultou em queda - regulação do Bcl-2 anti-apoptótico e Bcl-XL e *up regulation* da expressão pro-apoptótica. No entanto, o tratamento com β -lapachona não afetou o inibidor da família de proteínas de apoptose e o sistema Fas / FasL. Em conjunto, este estudo indicou que a β -lapachona pode ter potencial como agente quimiopreventivo para câncer de fígado (WOO et al. 2006).

A β -lapachona e seus derivados induziram apoptose (via mitocondrial) em células HL-60, através de ensaios de análises morfológicas e de citometria de fluxo, induzindo também a formação de EROS, assim como quebras das fitas da molécula de DNA em células HL-60 (NQO1⁻) e DU-145 (NQO1⁺), mais uma vez ressaltando suas propriedades antitumorais e de seus derivados que eles podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer (CAVALCANTI, 2010).

A neovascularização é um processo essencial no desenvolvimento de tumores, na angiogênese o óxido nítrico (NO) é um fator importante para o crescimento e a migração de células endoteliais vasculares. A β -lapachona induziu a morte de células endoteliais, incluindo a linha celular endotelial vascular humana e células endoteliais vasculares umbilicais humanas. O N.O pode atenuar o efeito apoptótico da β -lapachona em células endoteliais

humanas e, portanto, ter potencial como um fármaco antiangiogênico (KUNG et al. 2007).

Além disso, a β -lapachona inibe a atividade catalítica da topoisomerase I de células humanas, porém não estabiliza o complexo clivagem. A β -lapachona interage diretamente com a topoisomerase I, não afetando a montagem do complexo enzima-DNA, mas inibindo a formação de complexo clivagem (LI, AVERBOUKH; PARDEE, 1993).

Estudos demonstraram que β -lapachona aumentou a letalidade dos raios-X contra as células do carcinoma epidermóide da laringe humana em pós-tratamento de 4 horas com $4\mu\text{M}$ (HEp-2; BOOTHMAN et al. 1987). Esta substância também ativou a ação de desencadeamento de DNA da topoisomerase I, inibiu o componente rápido do Reparo de Danos Potencialmente Letal (PLDR) realizado por células HEp-2, e aumentou de forma específica e sinérgica os efeitos citotóxicos de agentes prejudiciais para o DNA que induzem incisões de cadeia de DNA (BOOTHMAN et al. 1989).

A associação de β -lapachona e taxol, dois compostos de massa molecular baixa (LI et al. 1999), apresentaram efeito sinérgico para a morte de células de câncer de ovários, mama, próstata, melanoma, pulmão, cólon e pancreático., estudaram o tratamento combinado de genisteína e β -lapachona, examinando o papel do NQO1 e apoptose, na resposta inibitória em células de carcinoma de próstata humano PC3 (KUMI-DIAKA et al. 2004).

Além da atividade antitumoral da β -lapachona, foram realizados estudos com objetivo de avaliar a atividade antiparasitária. A β -lapachona possui propriedades tripanocidas (forma epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*) e esta atividade tem sido relacionada ao estresse oxidativo. Este composto ($4\mu\text{M}$) foi capaz de estimular a produção de H_2O_2 em homogeneizado de epimastigota, na presença de NADH como redutor. O mesmo efeito foi observado com a fração mitocondrial, suplementada com NADH, onde o β -lapachona aumentou a geração de O_2 (4,5x) e H_2O_2 (2,5x; BOVERIS et al. 1978).

A β -lapachona inibiu em 100% a forma epimastigota *T. cruzi* (concentração de 3,1 μM), sendo que esta atividade não foi observada para a α -lapachona (concentração= 50 μM ; JORQUEIRA et al. 2006). Outros estudos avaliaram a atividade destasnaftoquinonas em formas epimastigota e tripomastigota, sendo o observado que, na maioria dos casos, a β -lapachona foi mais promissora (SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA 2007; SALAS et al. 2008).

Opré-tratamento de células de musculo liso com β -lapachonaoualil- β -lapachona, reduziu a infecção destas células pelas formas tripomastigotas *T. cruzi*. Conforme dito anteriormente que naftoquinonas podem inativar tripanotiona reductase, avaliou-se o efeito da β -lapachonaoualil- β -lapachona nesta enzima na presença de oxigênio, porém estes compostos não a inativaram, mas produziram alterações em sua função protetora de regeneração de radicais livres. Estes resultados sugerem que naftoquinonas possam atuar nesta enzima e constituir agentes antitripanossoma e antileishmania promissores (CASTRO, 1993; SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA, 2007).

A atividade leishmanicida da β -lapachona foi avalidade contra promastigota de *L. (infantum) chagasi* (cepas sensível e resistente ao antimonial pentavalente) e *L. amazonensis* (cepas sensível e resistente ao antimonial pentavalente). Este composto foi mais ativo em *L. chagasi*, em especial no isolado sensível (CI_{50} = 0,67 μM). No caso da *L. amazonensis*, a β -lapachona parece ser mais promissora para os parasitos resistentes aos antimonaispentavalentes (CI_{50} = 1,39 μM ; GUIMARÃES et al. 2013).

A β -lapachona mostrou-se ativa contra o clone de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (W2), sendo que a adição de halogênios ou ácido sulfônico neste composto favorece a atividade antimalárica (ANDRADE-NETO et al. 2004). Em outro estudo, a β -lapachona foi ativa contra cepas de *P. falciparum* F32 (CI_{50} = 4,1 μM ; PÉREZ-SACAU et al. 2005).

A β -Lapachona também bloqueia a penetração cercariana quando aplicados topicamente e atua como cercaricida; inibindo a glicólise aeróbica de vermes adultos; alterando a motilidade e superfície do tegumento dos vermes e

atuando como moluscicida contra caramujo adulto de *Biomphalaria glabrata*. Em modelo murino, a β -lapachona possui efeitos esquistossomicida sobre esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos. *In vitro*, a morte do parasito foi precedida por progressivo dano na superfície da membrana, caracterizado por descamação do tegumento, redução dos espículos, formação de bolhas, ruptura e aparecimento de erosão na superfície tegumentar. Além disso, intenso edema generalizado, áreas de rachaduras com superfície rugosa, sulcos e aparente fibrose, também foram visualizadas na porção anterior do verme. Em todos os grupos, houve redução significativa no número de ovos e granulomas no tecido hepático. A intervenção, realizada durante a fase de vermes adultos, reduz o tamanho dos granulomas hepático e percentual de ovos imaturos, além de aumentar a porcentagem de ovos maduros e mortos (AIRES, 2013).

Estudos de toxicidade aguda oral demonstraram que a β -lapachona é bem tolerada em animais como, cães (100mg/kg), ratos (200mg/kg), camundongos e galinhas. Observou-se também que altas doses levam a reações adversas como gastrite ulcerativa, redução no número de eritrócitos, no entanto não promove supressão medular (LI et al. 2000).

A β -lapachona possui baixa solubilidade em água (0,038 mg/mL ou 0,16 mmol/L; NASONGKLA et al. 2003), isto dificulta a sua administração por via intravenosa (TEWARI et al. 2006). Além disso, pode resultar não apenas em baixas concentrações de fármaco no tumor, mas também na possível toxicidade em células normais a altas doses e exposição prolongada (BEY et al. 2007). Estudos *in silico* sugerem que a β -lapachona seja bem absorvida no trato gastrointestinal (biodisponibilidade= 94,97%), liga-se fortemente a albumina (98,28%), distribui para o SNC, sofre metabolismo de fase 1 (CYP3A4) e pode inibir as enzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 (FERREIRA, 2017).

2.1.2. α -Lapachona

Das 3 naftoquinonas, a α -lapachona parece ser a menos promissora em termos biológicos. A α -lapachona liga-se ao complexo DNA-topoisomerase I acelerando o desenrolamento de DNA topoisomerase I, também inibe o componente rápido de reparação dos danos ao DNA (PLDR), dessa forma pode atuar de forma sinérgica a outros antineoplásicos (BOOTHMAN et al. 1989).

A atividade antibacteriana, pelo método de difusão em agar, da α -lapachona foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichiacoli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Saccharomices cerevisiae*, porém não foram observados halos de inibição (ANTUNES et al. 2006).

Sua atividade antiviral foi testada e comparada quanto aos seus efeitos inibitórios na ativação do antígeno precoce do vírus Epstein-Barr (EBV-EA) induzida por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), a fim de verificar possíveis agentes quimiopreventivos para câncer, a α -lapachona apresentou uma atividade moderada ao ser comparada com outras naftoquinonas (SACAU et al. 2003).

Como antiparasitário, em epimastigota de *T. cruzi*, a α -lapachona mostrou-se inativa (GOIJMAN; FRASCH; STOPPANI, 1984). Apresentou moderada atividade contra *L. (infantum) chagasi* (sensível ao antimônio: 13,88 μ M) e *L. amazonensis* (sensível: 16,08 μ M; resistente: 15,15 μ M; GUIMARÃES et al. 2013). Em estudos *in vitro*, o efeito da α -lapachona foi avaliado na replicação de *Toxoplasma gondii*, utilizando culturas de fibroblastos 2C4 infectados com a cepa RH, que demonstrou inibição do crescimento intracelular de *T. gondii* em concentrações de 1 e 5 μ g/mL (FERREIRA et al. 2002)

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade esquistossomicida do lapachol, α -lapachona e β -lapachona.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade *in vitro* frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* de lapachol, α -lapachona e β -lapachona;
- Avaliar a atividade a capacidade de inibir a ovoposição e redução da recuperação dos vermes adultos em camundongos infectados com *S. mansoni*;
- Investigar se a atividade esquistossomicida tem relação com a peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total.
- Avaliar a viabilidade celular

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento - Quimis;
- Agitador Vortex – Kasvi;
- Autoclave 75 L - Phoenix;
- Balança analítica – modelo FA2104 N Eletronic Balance, Bioprecisa;
- Banho-maria – SOLAB Científica, modelo SL 150;
- Banho de Ultrassom – modelo 2210 Branson, Tecnal Equipamentos para laboratório;
- Bomba de perfusão – Masterflex;
- Cabine de fluxo laminar vertical – modelo PA 310, Pachane;
- Capela – Quimis;
- Contador manual de células – DIGETIMER;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água;
- Estufa Demanda Bioquímica de Oxigênio – modelo HF212 UV, SPLABOR;
- Estereomicroscópio, GSM-CARL ZEISS;
- Estufa de esterilização e secagem – modelo Md 1.2, Medicate Produtos Médicos;
- Evaporador rotatório, Fisatom;
- Geladeira – Electrolux;
- Incubadora CO₂ – modelo Hf212 UV, Ultrasafe;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Microscópio óptico, modelo E200-NIKON, Eclipse;
- Microscópio invertido, modelo TCM400-ANALÍTICA;

- Percolador;
- pHmetro de bancada – Q400RS, Quimis;
- Sistema de filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm- TPP;

4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO

4.1.2.1 Solventes e Reagentes

- Acetato de etila P.A - Isofar Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos;
- Álcool Metílico (Metanol) – CAQ (CASA da Química Indústria e Comércio LTDA);
- Ácido clorídrico– SYNTH;
- Álcool grau 96°GL (Álcool Etílico hidratado) – Santa Cruz LTDA;
- Diclorometano P.A – IsofarIndústriae Comércio de Produtos Farmacêuticos;
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Sigma-Aldrich;
- Hexano P.A – CAQ (CASA da Química Ind. e Com. LTDA);

4.1.2.2 Meio de Cultura e Outros

- ABTS - A1888, Sigma-Aldrich;
- Bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich;
- Cloreto de sódio P. A – Cromoline química fina Ltda;
- Gentamicin (Sulfato de Gentamicina) 80 mg/2mL solução injetável – NovaFarma Indústria Farmacêutica LTDA;
- Heparina Sódica 1.000 UI/mL – ROVI;
- Maravalha para Camundongos Mercol N°02;
- Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) com glutamina e HEPES, isento de bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich;

- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolium 500 mg - Sigma-Aldrich;
- Penicilina G - Sigma-Aldrich;
- Persulfato de potássio (K₂S₂O₈; Sigma-Aldrich 60490);
- Ração para Camundongos, Presence;
- Sílica gel para cromatografia em coluna fina – Macherey-Nagel®;
- Soro bovino fetal – Gibco;
- Trolox - 23881-3, Sigma-Aldrich;

4.1.2.3 Materiais plásticos, de metal e de vidro

- Algodão hidrófobo;
- Espátulas de metal;
- Estantes plásticas;
- Garrafas para cultura de células 75 cm² – TPP;
- Garrafas para cultura de células 25 cm² – SPL Life Sciences;
- Placas de cultura de células de 24 poços - TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços, – TPP;
- Placas de Petri descartáveis/poliestireno 90x15 mm – Labware;
- Ponteira 200 µL amarela, tipo universal – Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µL, azul, tipo universal – Kartell S. P. A.;
- Tubo cônico de 1,5 mL e 2,0 mL – Eppendorf;
- Tubo cônico graduado 15 mL estéril (Tipo Falcon) - Becton-Dicknson;
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) – Becton-Dicknson;

4.1.2.4 Vidrarias

- Balão volumétrico de 250 mL, 500 mL, 100 mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600, 1000 mL – Satelit;
- Erlenmeyes de 250, 2000 mL – Vidrolabor;

- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL – Vidrolabor;
- Placa Petri;
- Proveta de 50 mL, 200 mL, 500 mL, 100 mL – Vidrolex;

4.1.2.5 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

4.1.2.5.1 Meio RPMI 1640 para cultivo de *Schistosoma mansoni*

O conteúdo de um frasco (10,4 g) em pó do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) foi dissolvido em água ultrapura (1000 mL) sob agitação, adicionado de bicarbonato de sódio (2 g), tampão HEPES (5g), penicilina 10.000 U/L/e 50 mg/L de gentamicina, e glicose (4,5g).O pH do meio foi verificado e ajustado sempre quando não se encontrava em pH neutro (pH= 7,2). O meio foi esterilizado em membrana de 0,22 µm e acondicionado em frascos estéreis a 4°C (VEIGA, 2013).

4.1.2.5.2 Meio RPMI para cultura de células

O meio (10,4g) foi reconstituído em água deionizada (1000 mL) e adicionado de 12,5 mM de tampão HEPES, 2 mM Glutamina, 1mM de Piruvato de Sódio, 100.000 U/L de penicilina, 50 µg/L de gentamicina e glicose (4,5 g), pH ajustado a 7,4. Então, foi esterilizado por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22 µme acondicionado em frascos estéreis a 4°C.

4.1.2.5.3. Solução salina 0,85% heparinizada

Em 6 litros de água destilada foi adicionada 1 mL de heparina sódica, e 51g de NaCl. Esta solução foi agitada, por 2 minutos. Alguns minutos antes da perfusão esta solução foi aquecida até 37°C por 5 minutos.

4.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, infectados com cercárias de *Schistosoma mansoni* foram coletados no município de Belém nos bairros Montese, Guamá e Sacramenta.

Os camundongos utilizados neste estudo foram da linhagem BALB/c, com mais ou menos 2 meses de idade, peso médio entre 20g e 22g do sexo feminino, cedidos pela Seção Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas.

4.1.3.1 Coleta e identificação do material vegetal utilizado para a extração do lapachol

No presente estudo foram utilizadas cascas dos troncos da espécie *Handroanthus serratifolius* (Figura 8), coletada no Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará, Brasil (S 01° 27'3.031' ', W 48°26'40.2 ").

O material foi coletado e identificado pela Dra. Márlia R. F. Coelho e a exsicata encontra-se no herbário do referido museu sob o registro – (MG 206637). A exsicata encontra-se depositada no Herbário João Murça Pires.



Figura 8:Cascas dos troncos de *Handroanthus serratifolius*.

4.2 Métodos

4.2.1 OBTENÇÃO DO LAPACHOL, α -LAPACHONA E β -LAPACHONA

As cascas de *Handroanthus serratifolius* foram secas à temperatura ambiente durante sete dias, em uma estufa de ar circulante. O material foi moído em moinho de facas. O pó das cascas foi imerso na solução de bicarbonato de sódio a 2,5%, por 24h, a solução foi filtrada e acidificada com HCL 6M, sendo ajustado o pH para 3. Neste pH a solução muda de cor (vermelho) e obtem-se um precipitado amarelo. Então, esta foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm, o precipitado foi armazenado em dessecador, até peso constante (FERREIRA, 1996). Depois disso, este foi submetido ao fracionamento numa coluna (altura de 49 cm, diâmetro de 4 cm e volume de 615,44 mL) utilizando sílica gel como fase fixa cromatográfica, e diclorometano como fase móvel, sendo o composto amarelo submetido a análise em RMN para confirmar tratar-se do lapachol.

A síntese da β -lapachona foi realizada da seguinte forma: o lapachol (500mg) foi mantido em banho de gelo, e acrescido ácido sulfúrico concentrado (1,5mL). Esta solução foi agitada por, aproximadamente, 10 min e verteu-se

água destilada gelada (50mL). Esta solução foi filtrada, e obteve-se um sólido laranja, qual foi recristalizado com etanol, sendo este submetidas a RMN, a fim de confirmar a estrutura da β -lapachona.

A síntese da α -lapachona foi realizada da seguinte forma: o lapachol (500mg) foi solubilizado em ácido acético glacial (0,5mL) e ácido clorídrico concentrado (1,3mL). Esta solução foi aquecida (100°C/1:30 h) sob agitação, então se adicionou água até visualizar a precipitação de sólido amarelo escuro, qual foi filtrado, recritstalizado com etanol (SOUZA et al. 2008), o sólido foi identificado através de RMN. Todos os espectros de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C foram obtidos utilizando-se 20 mg de cada amostra solubilizada em clorofórmio deuterado, a temperatura de 25° C e referência interna otetrametilsilano (TMS).

4.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

4.2.2.1. Aspectos éticos e manutenção dos animais

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas (IEC), e aprovado, com o nº de certificado 18/2017 (Anexo 1). Os procedimentos com animais seguiram as mais rígidas normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as normas da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), da Lei N° 11.794 publicada no Diário Oficial da União de 08/10/2008.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com tampa metálica, com um número máximo de 5 animais por caixa, alimentados com ração e água *ad libitum*, à temperatura controlada (23 ± 3 °C), umidade em torno de 50 a 70%, ciclo de luz/escuro de 12 horas, com baixos níveis de ruídos e contínua exaustão de ar. Os animais foram acomodados em maravalha com duas trocas semanais.

4.2.2.2. Avaliação da atividade *in vitro* em vermes adultos

Os vermes adultos (machos e fêmeas acasalados) de *S. mansoni* foram obtidos por meio da perfusão no sistema porta hepático dos camundongos, após 60 dias da infecção (Figura 9). Após a remoção, os mesmos foram lavados com RPMI 1640 (2 vezes), acondicionados em placas de cultura de 24 poços, 3 pares por poços, e adicionado RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino (10%).



Figura 9: Perfusão do sistema porta.

As substâncias foram testadas em diferentes concentrações (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62, 5 µg/mL e 31, 25 µg/mL) diluídas em RPMI 1640 e DMSO (0,2% v/v). Como controle positivo foi utilizado Praziquantel (8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL); como controle negativo meio de cultura contendo parasitos; no controle do solvente o parasito foi exposto a solução utilizada para solubilizar as amostras (RPMI 1640 e DMSO a 0,2%). Após a diluição, as amostras foram distribuídas nas placas (Figura 10), incubadas por um período de 24h em 37°C, atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24h, lavou-se todos os poços com as substâncias testadas e o controle positivo, e realizou-se a análise microscopia após 24h até 120 h (5° dia), sendo avaliado: as alterações na morfologia dos vermes; atividade motora (motilidade); contração muscular; capacidade reprodutiva; mortalidade dos vermes adultos e alterações de tegumento.

As alterações no tegumento e a atividade motora dos parasitos foram avaliadas qualitativamente, sendo classificadas como “leve”, as alterações que

não causem mudanças na motilidade do parasito, ou “significativa” as alterações que causem mudanças na motilidade do parasito, ou leve a morte do mesmo. Para avaliar a capacidade reprodutiva dos vermes foi contado o número de ovos postos pelas fêmeas com o auxílio de um estereomicroscópio. No caso de ausência de ovos isto será registrado (RAMIREZ et al. 2007; ABDULLA et al. 2009).

Para a determinação da Concentração letal de 50% (CL₅₀) para os vermes adultos será quantificada a quantidade de morte dos vermes com ajuda de um estereomicroscópio, e verificado qual a menor dose que consegue matar 50% dos vermes. Serão considerados os critérios do quadro 1. afim de verificar se a substância foi considerada ativa ou não.

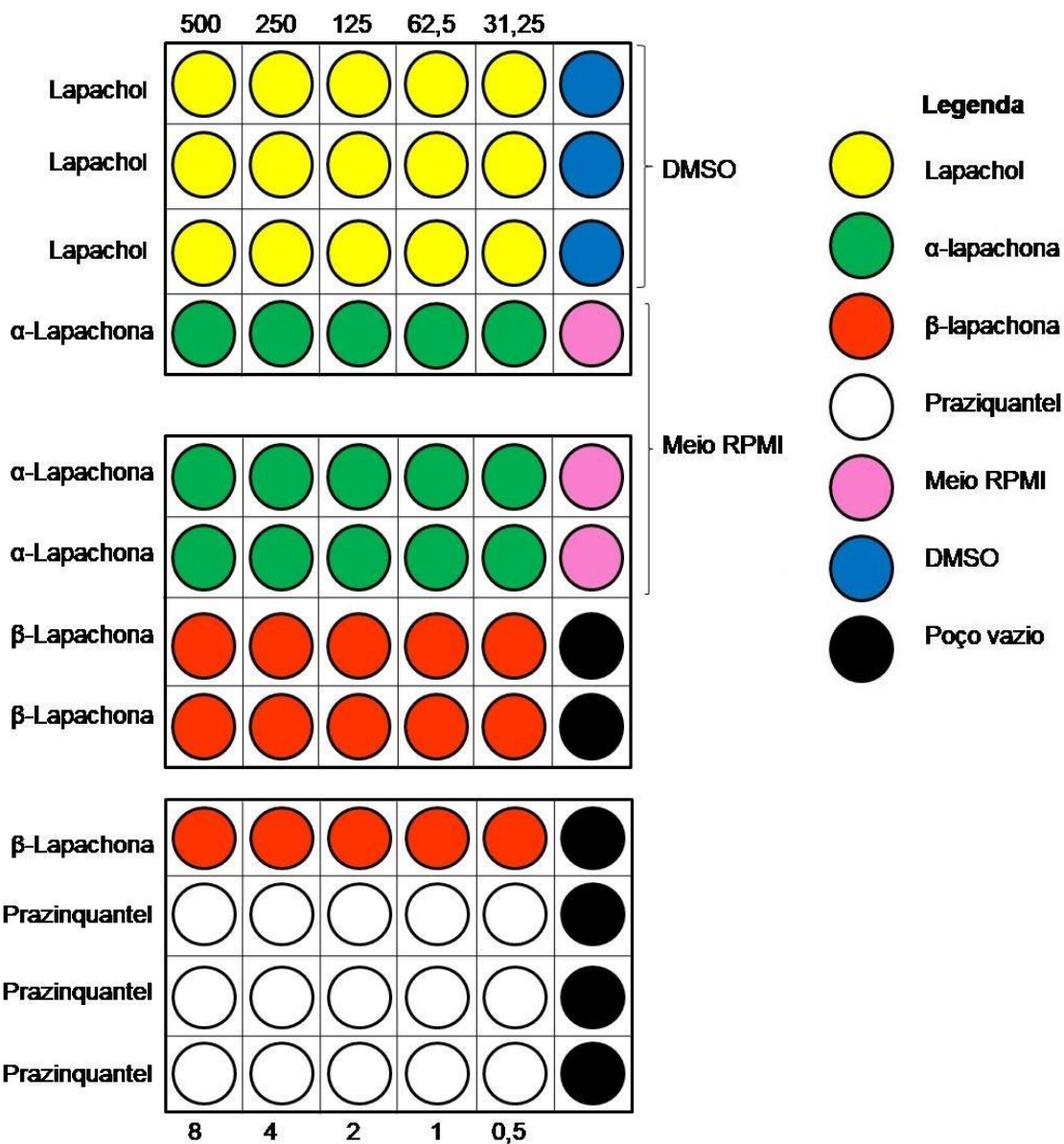


Figura 10: Atividade esquistossomicida *in vitro* do lapachol e análogos
Legenda: Concentrações em $\mu\text{g}/\text{mL}$

Quadro 1: Interpretação dos resultados baseado na faixa de CL_{50}

$\text{CL}_{50} \mu\text{g}/\mu\text{L}$	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-250	Moderadamente ativo
Acima de 250	Inativo

4.2.2.3. Ensaio de viabilidade celular

Para os testes citotóxicos foram utilizadas as linhagens: epitelial gástrica (MNP01) e adenocarcinoma gástrico (ACP02). Estas células foram cedidas pelo Laboratório de Citogenética Humana (LCH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA.

As células foram cultivadas em garrafas, em meio RPMI -1640 completo e mantidas em estufa de gás CO₂ a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram soltas das garrafas de cultivo através da exposição à tripsina por 3 minutos, coletadas em tubos de 15mL, centrifugadas a 1500 – 2000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, ressuspensas em meio RPMI-1640, quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas ou garrafas, conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. As células foram expostas às amostras testes e realizados os procedimentos experimentais.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSSMAN et al. (1983). Utilizando-se placas de 96 poços, foram semeadas as células. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Depois de 24h de incubação as células foram expostas ao tratamento em triplicata com cinco concentrações decrescentes (500µg/mL; 250µg/mL; 125µg/mL; 62,5µg/mL; 31,25µg/mL) da β-lapachona. Também foi realizada uma triplicata para controle negativo, contendo apenas meio a 10% SFB. As placas foram novamente incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24h de tratamento foi adicionado 10µL da solução brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, 5mg/mL; Figura 12) para 100 µL de meio contido nos poços. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ durante 4 horas. Foi então desprezado o sobrenadante e adicionado 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido) a todos os poços para dissolver os cristais de formazan. As placas foram homogeneizadas para a completa dissolução dos cristais. Após aproximadamente 1 hora, as

absorbâncias dos poços foram quantificadas em leitor espectrofotômetro de microplacas, utilizando um comprimento de onda de referência de 570nm.

4.2.2.4. Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Para a substância ativa investigou se a peroxidação lipídica estava relacionada a atividade. Este método avalia a peroxidação lipídica e foi utilizado como um indicador do estresse oxidativo. Esta técnica baseia-se na reação do malondialdeído (MDA) e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich T5500), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorbância em 535 nm.

O procedimento técnico foi realizado de acordo com fundamentos propostos por Khon & Livesedge (1944), adaptados por Percário et al. (1994), método que consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 500 ml de amostra à 1000ml da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C x 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente; adiciona-se 4,0 mL de álcool 1-butílico, homogeneiza-se bem em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 175 x g (15 min); coleta-se 3,0 mL do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. Utilizou-se como padrão o 1,1,3,3, tetrahidroxipropano para a realização da curva padrão.

4.2.2.5. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)

Foi determinada de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller et al. (1993) modificado por Re et al. (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS com persulfato de potássio, produzindo diretamente o radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical

cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante cinco minutos. Assim, foi determinada a atividade antioxidante total da amostra, sendo calculada a sua relação com a reatividade do Trolox como padrão, através da realização de curva padrão sob as mesmas condições.

4.2.2.6. Avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo*

Os camundongos (5 animais, 4 grupos, tratados com β -lapachona, Praziquantel e DMSO) foram infectados subcutaneamente com cerca de 150 cercárias. (PELLEGRINO & KATZ, 1968), então foram tratados em dose única, (400mg/kg, V.O). Diariamente foi realizada a avaliação clínica dos animais.

Após 15 dias do início do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia para a obtenção dos vermes e recolhimento de material como intestino e fígado, para avaliação dos mesmos. A atividade *in vivo* do composto foi avaliada através da determinação da carga parasitária; carga de ovos. Também será feita a observação de alterações do tegumento dos vermes coletados através da perfusão do sistema porta, ao comparar com o grupo controle não tratado. (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

Também o fígado e rins dos animais foram retirados e submetidos a análises histopatológicas.

4.2.2.7- Análise Histológica

Ao final do tratamento os animais foram submetidos à eutanásia e nesse momento foram obtidos fragmentos de órgãos, fígado e rins e foram fixados diretamente em formol tamponado a 10%, e posteriormente, submetidos ao método convencional de preparação de lâminas histológicas e à coloração por

hematoxilina-eosina. A leitura das lâminas histológicas foi realizada em microscopia óptica.

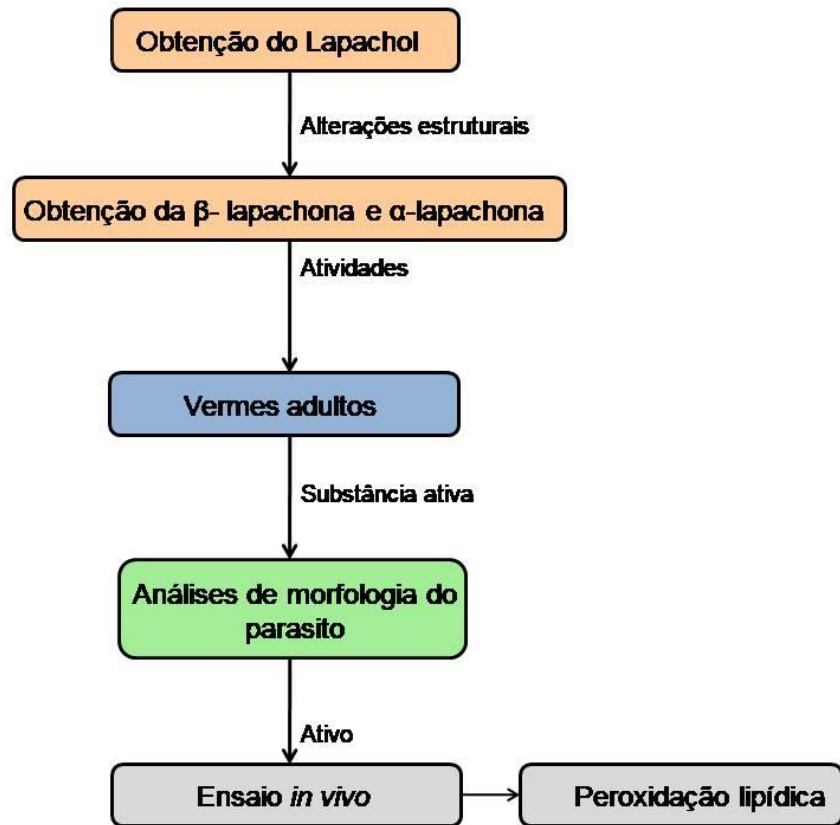


Figura 11: Síntese das atividades a serem desenvolvidas neste estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DO LAPACHOL E ANÁLOGOS

O lapachol foi extraído de *H. serratifolius*, sendo obtido o rendimento de 2,9%, o que está dentro da média esperada dessa substância, como em outros estudos obtiveram cerca de 2% de rendimento (ROSA, 2000; BARBOSA, 2014). A média do rendimento do lapachol pode variar de 1 a 7%, dependendo da espécie da planta utilizada, e de fatores como clima, região e sazonalidade (BURNET & THOMSON, 1967). Outro fator que pode alterar o rendimento da extração dessa substância é a alteração do solvente, devido as diferenças de polaridades, sendo que o aumento de polaridade pode resultar em um aumento de rendimento (TAVARES et al. 2013).

No processo de conversão do lapachol em β -lapachona, observou-se um rendimento de 58%, enquanto que a conversão para a α -lapachona este rendimento foi de 52%. Este rendimento é um pouco a baixo de outros valores encontrados na literatura (Barbosa e Neto, 2013; Liebert e Klier, 2014/2015).

Todas as amostras foram submetidas a estudos espectrofotométricos, com o objetivo de confirmar se os compostos isolados e/ou sintetizados foram o Lapachol, β -lapachona e α -lapachona. No caso do lapachol, os sinais dos espectros de RMN obtidos do o Hidrogênio (H), foram: δ 8,13-8,05 MHz , corresponde a um duplete e um triplete, com integrais para 2 hidrogênios, localizados na posição 5 e 8 da molécula; δ 7,78-7,63 MHz corresponde um duplete e um triplete localizados na posição 6 e 7; δ 7,34 MHz é um simpleto, localizado na hidroxila da molécula; δ 5,21 MHz é de um triplete, localizado nas posições 1 e 12; δ 3,30 MHz um duplete, com integral para 2 hidrogênios, localizados na posição 11; δ 1,79 MHz a um simpleto, com integral para 3 hidrogênios (metila), localizados na posição 15; δ 1,68 MHz simpleto, com integral para 3 hidrogênios (metila), localizados na posição 14 (Figura 12; Tabela 1). Estes dados foram comparados com resultados obtidos em outro trabalho (DAWSON et al, 1989; ROSA, 2000; tabela 1) e indicaram tratar-se do lapachol.

Além disso, este composto foi submetido a análise em RMN de Carbono, sendo obtidos os seguintes sinais: δ 184,46 MHz carbono na posição 4; δ 181,71 MHz na posição 1; δ 152,72 MHz na posição 2; δ 134,77 MHz na posição 6; δ 133,73 MHz a posição 13; δ 126,04 MHz é da posição 8; δ 132,78 MHz a posição 7; δ 129,54 MHz a posição 9 do carbono; δ 126,78 MHz a posição 5; δ 129,54 MHz a posição 9; δ 123,57 MHz a posição 3; δ 119,73 MHz a posição 12; δ 25,67 MHz a posição 14; δ 22,65 MHz a posição 11; δ 17,85 MHz corresponde a posição 15 (Figura 13). A tabela 2 mostra que, forma semelhante a outro estudo, o lapachol apresentou sinais semelhantes. Em síntese, o composto isolado de *H. serratifolius* foi o lapachol.

Tabela 1:Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de 1H e 13C do lapachol isolada a partir do pó da casca de *H. Serratifolius* e dados da literatura.

Posição	Lapachol		Lapachol ^a (Rosa, 2000)		Lapachol ^b (Dawson et al. 1989)	
	δ H (ppm) (m, J em Hz)	δ C (ppm) (multiplicidade)	δ H (ppm)	Δ c (ppm)	δ H (ppm)	δ C ppm)
1	-	181,7	-	181,6	-	181,6
2	-	152,7	-	152,6	-	152,6
3	-	123,5	-	123,4	-	123,4
4	-	184,4	-	184,5	-	184,5
5	8,13 d	126,7	8,12 d	126,7	8,12 d	126,6
6	7,78 d	134,7	7,76 t	134,8	7,75 t	134,7
7	7,63 t	132,7	7,67 t	132,8	7,67 t	132,7
8	8,05 t	126,0	8,07 d	126,0	8,07 d	125,9
9	-	129,5	-	129,4	-	129,3
10	-	132,7	-	132,9	-	132,8
11	3,30 d	22,6	3,30 d	22,6	3,31 d	22,5
12	5,21 t	119,7	5,19 t	119,6	5,21 t	119,6
13	-	133,7	-	133,8	-	133,7
14	1,68 s	25,6	1,68 s	25,7	1,68 s	25,6
15	1,79 s	17,8	1,79 s	17,8	1,79 s	17,8
OH-2	7,34 s		7,32 s		7,29 s	

Legenda:Lapachol= dados obtidos no presente trabalho (200 MHz, CD₃OD). Lapachol^a = dados relatados por Rosa, (2000) (300 MHz, CD₃OD). Lapachol^b = Dados relatados por Dawson et, (1989)(300 MHz, CD₃OD). s: simpleto; d: dupleto; t: tripleto. J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

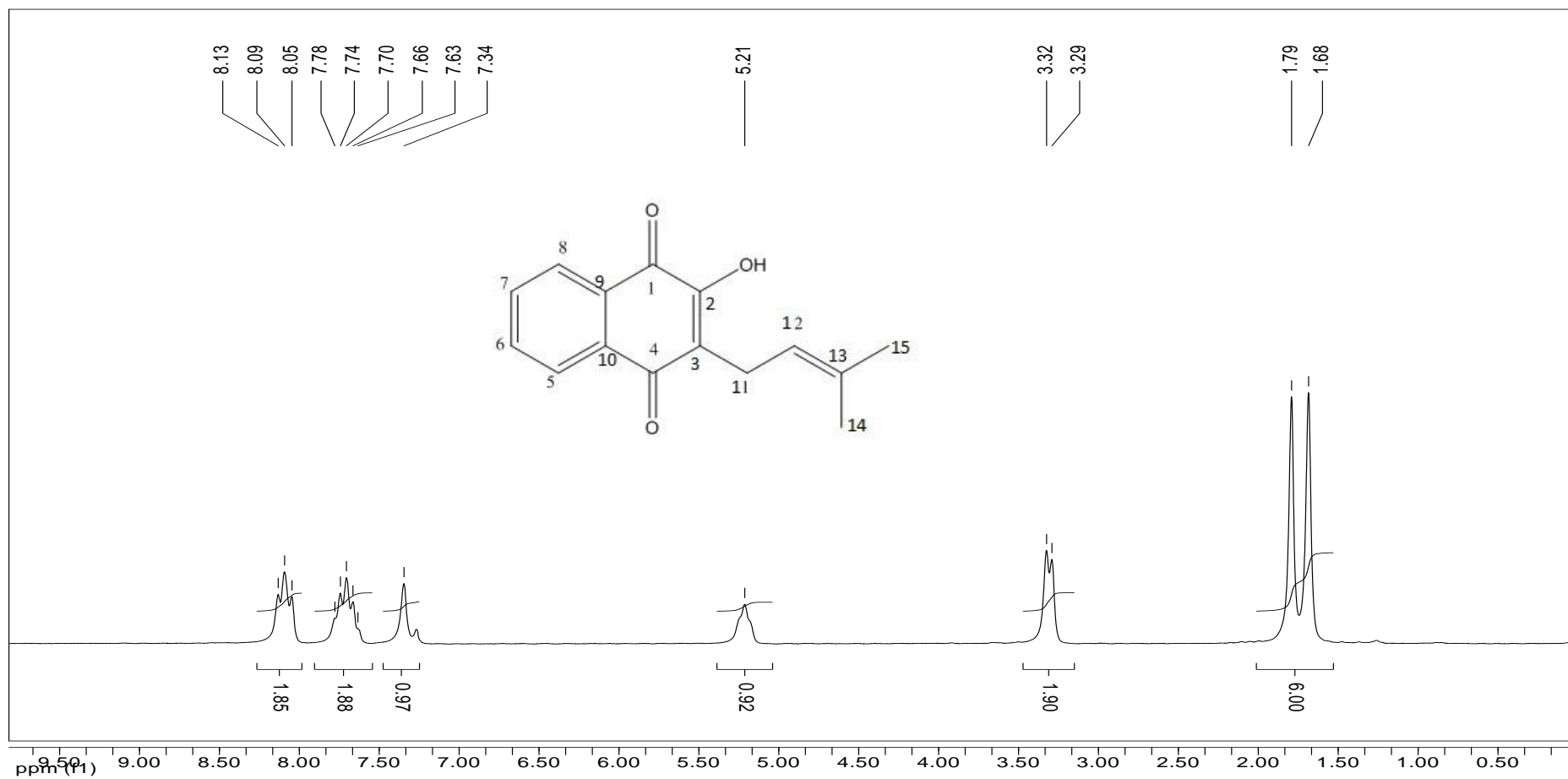


Figura 12: Espectro de RMN de ¹H do Lapachol (CDCl₃, 200 MHz).

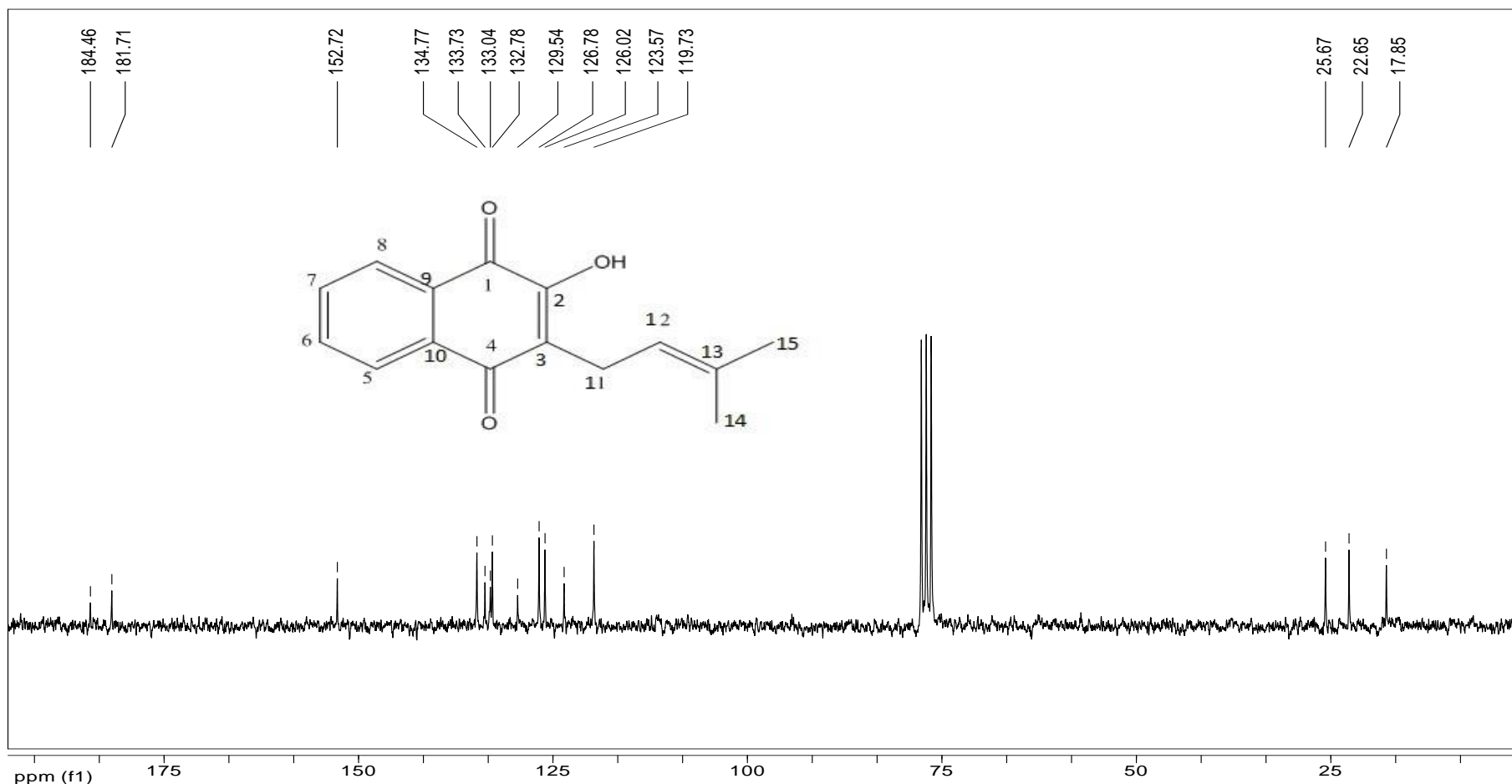


Figura 13: Espectro de RMN de ¹³C do Lapachol (CDCl₃, 50 MHz)

Após a confirmação do isolamento do lapachol, este foi submetido ao tratamento com ácido, sendo obtidos 2 compostos: composto 1 (rendimento:58 %) e composto 2 (rendimento:52%) e acreditava-se que o composto 1 tratava-se da β -lapachona e o 2 α -lapachona. O composto 1 apresentou-se na forma de cristais de tamanho pequeno e de cor laranja avermelhado, estas características são semelhantes da β -lapachona (PONTES, 2016).

A β -lapachona é isômero constitucional do lapachol (1), e sua obtenção pode se dá através de um tratamento ácido do lapachol (1). Na figura 14 encontram-se as reações envolvidas na conversão do lapachol e β -lapachona (Barbosa e Neto, 2013). Comparando o rendimento do composto 2 (52%) ao descrito em outro trabalho para a β -lapachona (62%; Liebert e Klier, 2014/2015), observa-se uma redução no rendimento .

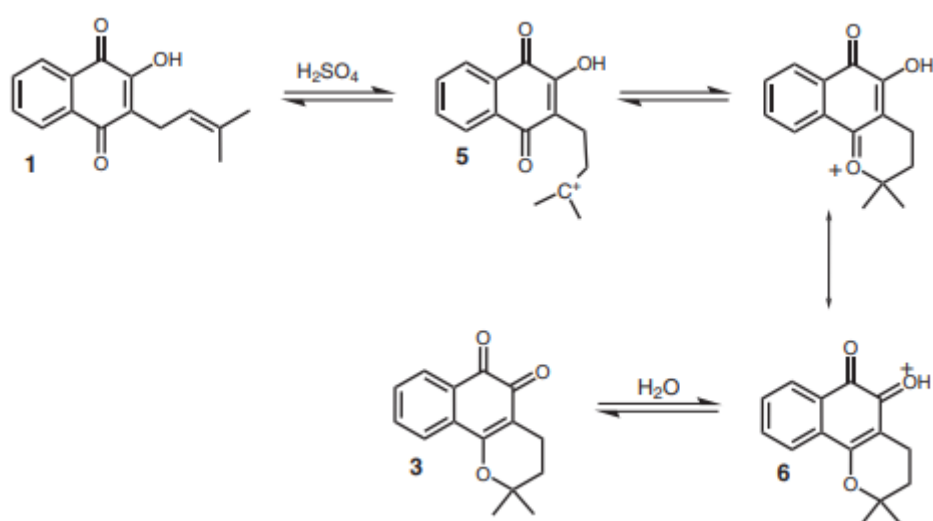


Figura 13: Esquema para obtenção da β -lapachona
Fonte: Barbosa e Neto, 2013

Visando confirmar que o composto 2 é a β -lapachona realizou-se a análise em RMN de 1H , sendo observados sinais característicos da β -lapachona, tais como: um simpleto em δ 1,47 que é referente aos seis hidrogênios dos dois grupos metila (3H-1' e 3H-2'). Os dois tripletos em δ 1,8 e em δ 2,5, são referentes aos seis hidrogênios dos dois grupos metila (3H-1' e 3H-2'), sendo que os tripletos são originados pelos hidrogênios metilênicos do C-4, e o segundo

triplete é aos hidrogênios de C-3, que fazem vizinhança com o oxigênio do anel heterocíclico, o que os tornam mais desprotegidos. Os dois dupletos duplos, em $\delta 8,0$ correspondem ao H-9, tornam-se mais desblindado pela proximidade com a carbonila, e em $\delta 7,8$ atribuídos ao H-12 enquanto que ao H-10 e H-11 correspondem os dois tripletos duplos em $\delta 7,5$ e em $\delta 7,6$, são referentes ao anel aromático (Figura15; Tabela 2).

Em relação ao espectro de RMN obtidos do o Carbono (C) foram obtidos os seguintes sinais: $\delta 31,6$ MHz carbono na posição 4; $\delta 162,0$ MHz na posição 1; $\delta 112,7$ MHz na posição 2; $\delta 178,6$ MHz na posição 6; $\delta 130,1$ MHz a posição 13; $\delta 132,6$ MHz é da posição 8; $\delta 179,9,0$ MHz a posição 7; $\delta 134,8$ MHz a posição 9 do carbono; $\delta 132,6$ MHz a posição 5; $\delta 16,1$ MHz a posição 3; $\delta 124,6$ MHz a posição 12; $\delta 26,7$ MHz a posição 1' e 2' (Figura 16; Tabela 2). Ao se comparar estes dados com a literatura, confirma-se que se tratava da β -lapachona (CLAESSENS, et al, 2010; PONTES, 2016).

Tabela 2: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de β -lapachona.

Posição	β -lapachona		β -lapachona ^a (Pontes, 2016)		β -lapachona ^b (Claessens, et al 2010)	
	δ H (ppm) (m, J em Hz)	δ C (ppm) (multiplicidade)	δ H (ppm)	Δ c (ppm)	δ H (ppm)	δ C (ppm)
1	1,46 s	162,0	1,47 s	162,3	1,47 s	162,0
2	1,46 s	112,7	1,47 s	112,8	1,47 s	112,7
3	1,87 t	16,1	1,89 t	16,3	1,85 t	16,2
4	2,58 t	31,6	2,57 t	32,7	2,58 t	31,6
5	-	132,6	-	132,7	-	132,6
6	-	178,6	-	178,8	-	178,6
7	-	179,9	-	183,0	-	179,9
8	-	132,6	-	132,7	-	132,6
9	8,07dd	134,8	8,07dd	134,9	8,06 dd	134,8
10	7,62 td	128,6	7,60 td	128,8	7,50 td	128,5
11	7,66 td	130,6	7,69 td	130,7	7,64 td	130,6
12	7,82 dd	124,6	7,83 dd	124,2	7,81 dd	124,1
13	-	130,1	-	130,2	-	130,1
1'	-	26,7	-	26,9	-	26,8
2'	-	26,7	-	26,9	-	26,8

Legenda: β -lapachona= dados obtidos no presente trabalho (200 MHz, CD₃OD). β -lapachona^a = dados relatados por Pontes, (2016) (300 MHz, CD₃OD). β -lapachona^b = Dados relatados por Claessens, (2010) (300 MHz, CD₃OD) s: simpleto; d: dupleteo; t: tripleto. J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

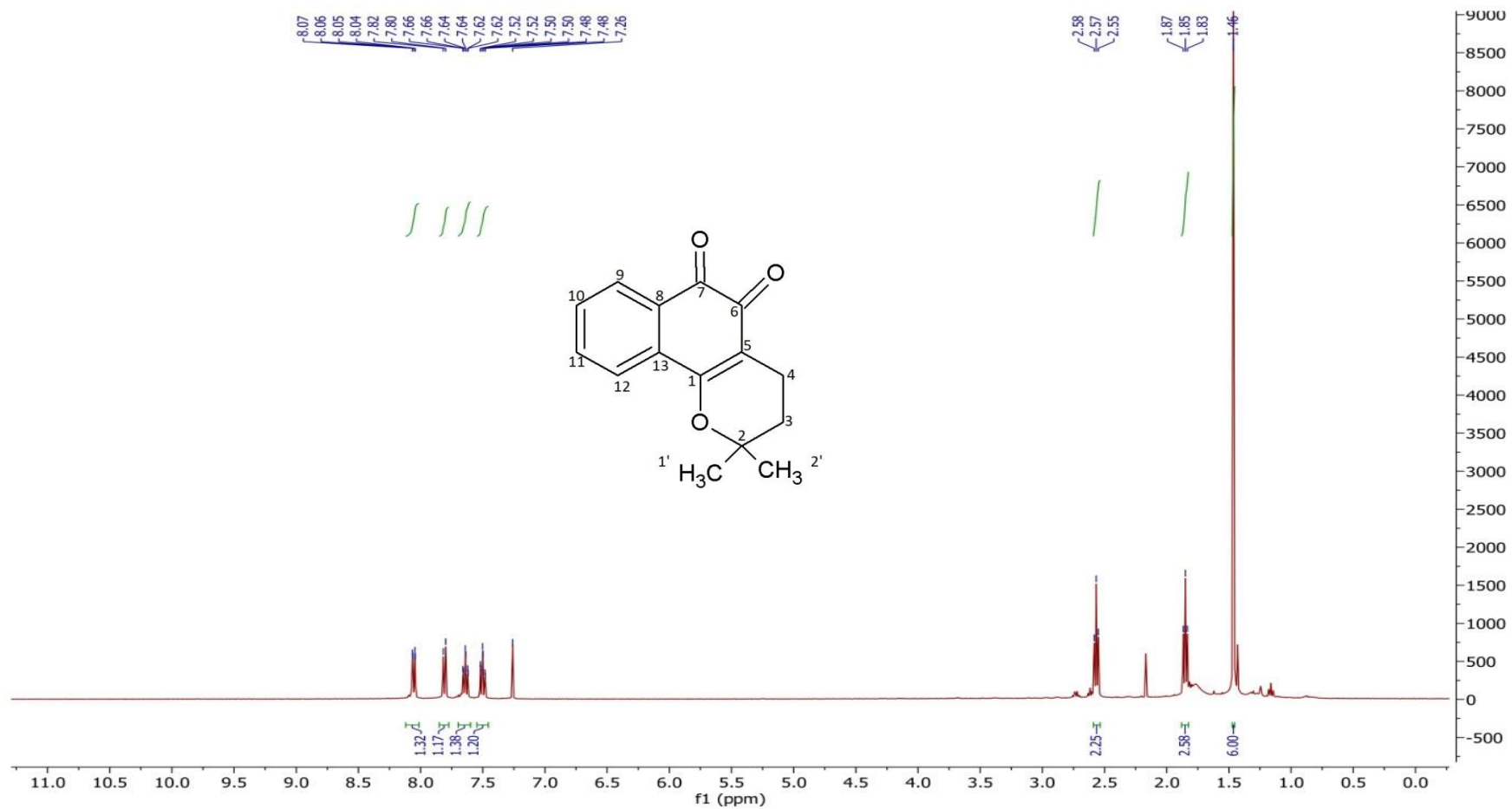


Figura 14: Espectro de RMN de ¹H da β-lapachona (CDCl₃, 200 MHz).

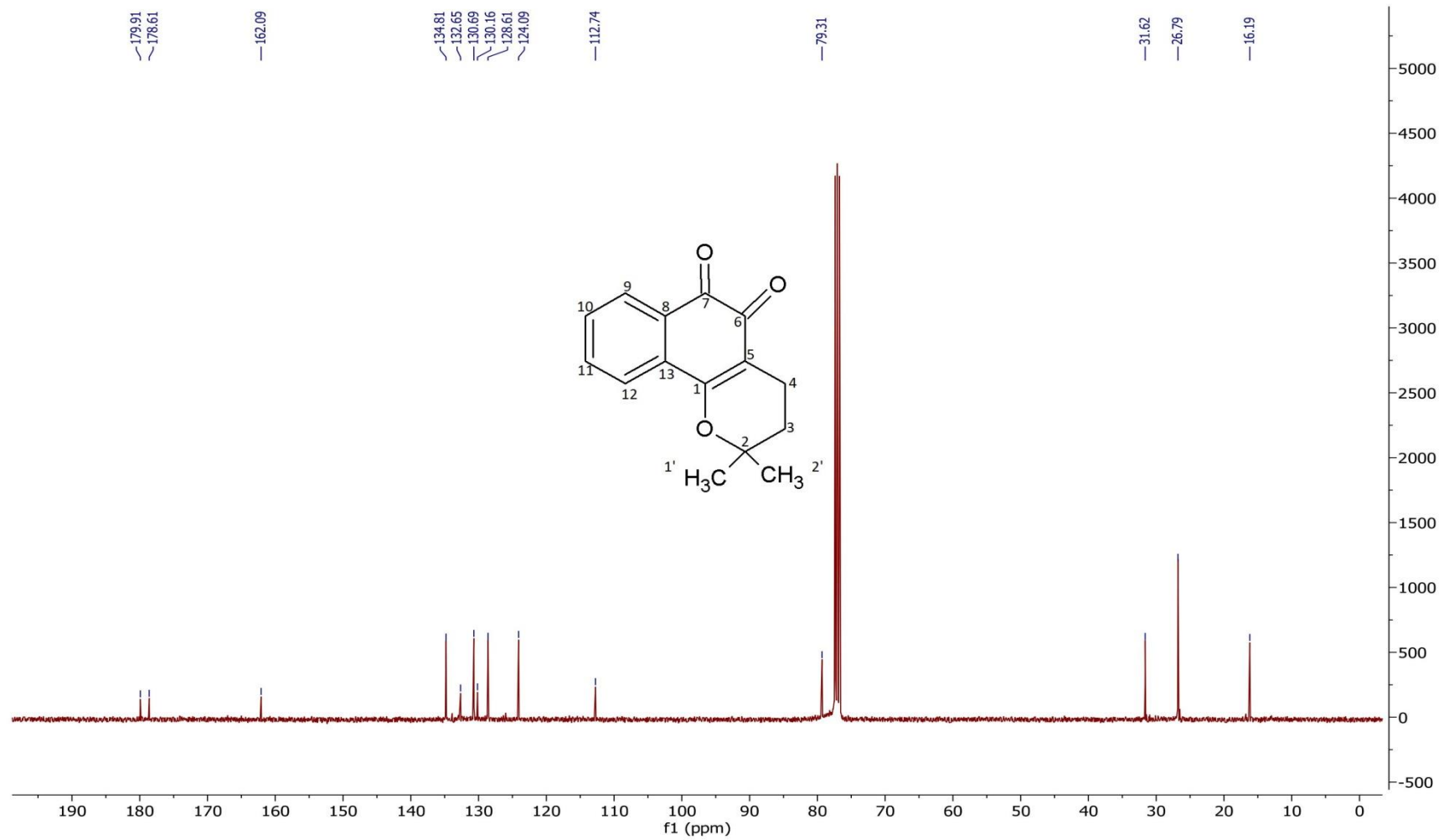


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C da β -Lapachona (CDCl_3 , 50 MHz)

O composto 2 apresentava-se como cristais amarelo escuro, sendo este aspecto sugestivo de α -lapachona (SOUZA et al. 2008). A α -lapachona, também, é isômero constitucional do lapachol (1), podendo ser obtida através de uma acidificação com ácido acético glacial e ácido clorídrico concentrado em temperatura elevada.

Semelhante ao lapachol e β -lapachona, o composto 2 foi submetido a análise espectrofotométricas, os sinais observados no espectro RMN de ^1H foram: um simpleto referente aos hidrogênios metílicos (H-1' e H-2') em $\delta 1,4$; dois tripletos em $\delta 1,8$, e $\delta 2,6$ relativo à 2H-3, e à 2H-4, respectivamente são referentes aos hidrogênios dos grupos metilênicos do anel pirano, sendo o em $\delta 2,6$ mais desprotegido pelo efeito anisotrópico da carbonila no anel vizinho; um multipletto em $\delta 7,6$ referente ao H-9 e H-10, e um triplete em $\delta 8,0$ referente ao H-8 e H-11, mais desprotegidos devido à vizinhança com acarbonila (Figura 16; Tabela 3). Os sinais dos espectros de RMN obtidos do o Carbono (C) foram: $\delta 163,0\text{MHz}$, na posição 1, $\delta 132,0\text{MHz}$, na posição 2, $\delta 16,7\text{MHz}$, referente ao carbono 3, $\delta 31,4\text{MHz}$ referente a posição 4, $\delta 120,1\text{MHz}$ na posição 5, $\delta 162,4\text{MHz}$ na posição 6, $\delta 126,0\text{MHz}$ referente ao carbono 7, $\delta 133,9\text{MHz}$ ao carbono 8 E 11, $\delta 132,9\text{MHz}$ ao carbono 9, $\delta 1229,9\text{MHz}$ ao carbono 10, $\delta 133,9\text{MHz}$, a posição 11, $\delta 126,3\text{MHz}$ carbono 12, $\delta 130,1$ carbono 13, e $\delta 26,5$ aos carbonos 1' e 2' (Figura 17; Tabela 3). Em síntese, estes dados confirmam que o composto 2 é a α -lapachona.

Tabela 3: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear da α -lapachona isolada

Posição	α -lapachona		α -lapachona ^a (Pontes, 2016)		α -lapachona ^b (Dawson,etal 1989; Delarmelina, et al 2016)	
	δ H (ppm) (m, J em Hz)	δ C (ppm)(δ H(ppm)	Δ c(ppm)	δ H (ppm)	δ C(ppm)
1	1,40 s	162,0	1,43 s	163,0	1,30 s	160,0
2	1,40 s	132,0	1,43 s	132,2	1,30 s	132,0
3	1,77 t	16,7	1,81 t	16,8	1,75 t	16,6
4	2,5 t	31,4	2,6 t	31,6	2,5 t	31,3
5	-	120,1	-	120,3	-	120,0
6	-	162,4	-	162,3	-	160,0
7	-	126,0	-	126,1	-	126,0
8	8,03 t	133,9	8,07 t	133,9	8,02 t	133,7
9	7,62 m	132,9	7,63 m	133,0	7,60 m	132,8
10	7,62m	122,9	7,63 m	133,0	7,60 m	122,0
11	8,03 t	133,9	8,07 t	133,9	8,02 t	133,7
12	-	126,3	-	126,4	-	126,2
13	-	130,1	-	134,4	-	131,1
1'	-	26,5	-	26,6	-	26,4
2'	-	26,5	-	26,6	-	26,4

Legenda: α -lapachona= dados obtidos no presente trabalho (200 MHz, CD₃OD). α -lapachona^a = dados relatados por Pontes, (2016) (300 MHz, CD₃OD). α -lapachona^b = Dados relatados por Dawson etal,(1989); Delarmelina et al, (2016) (300 MHz, CD₃OD) s: simpleto; d: dupleto; t: tripleto. J: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

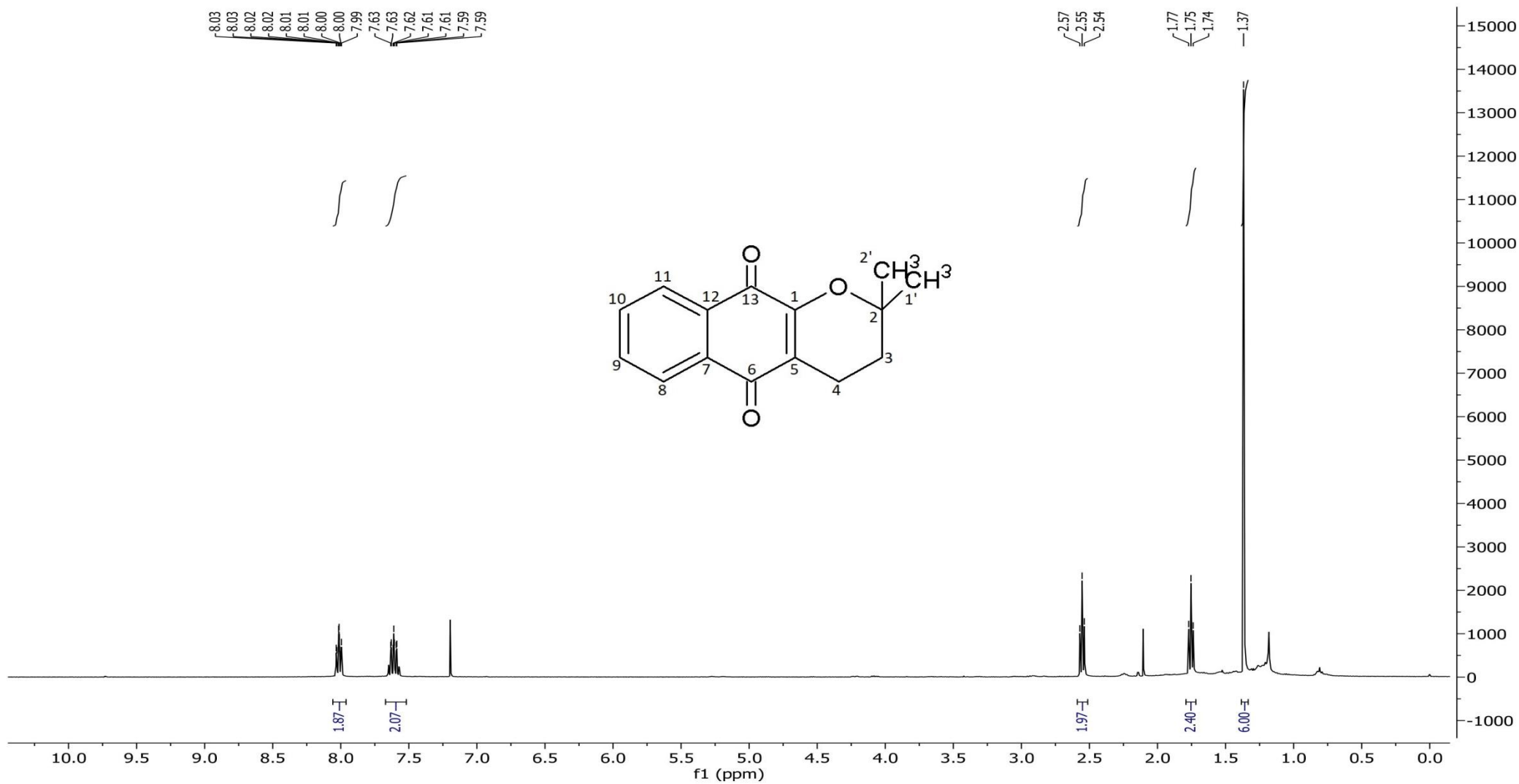


Figura 16: Espectro de RMN de ¹H da α -lapachona (CDCl₃, 200 MHz).

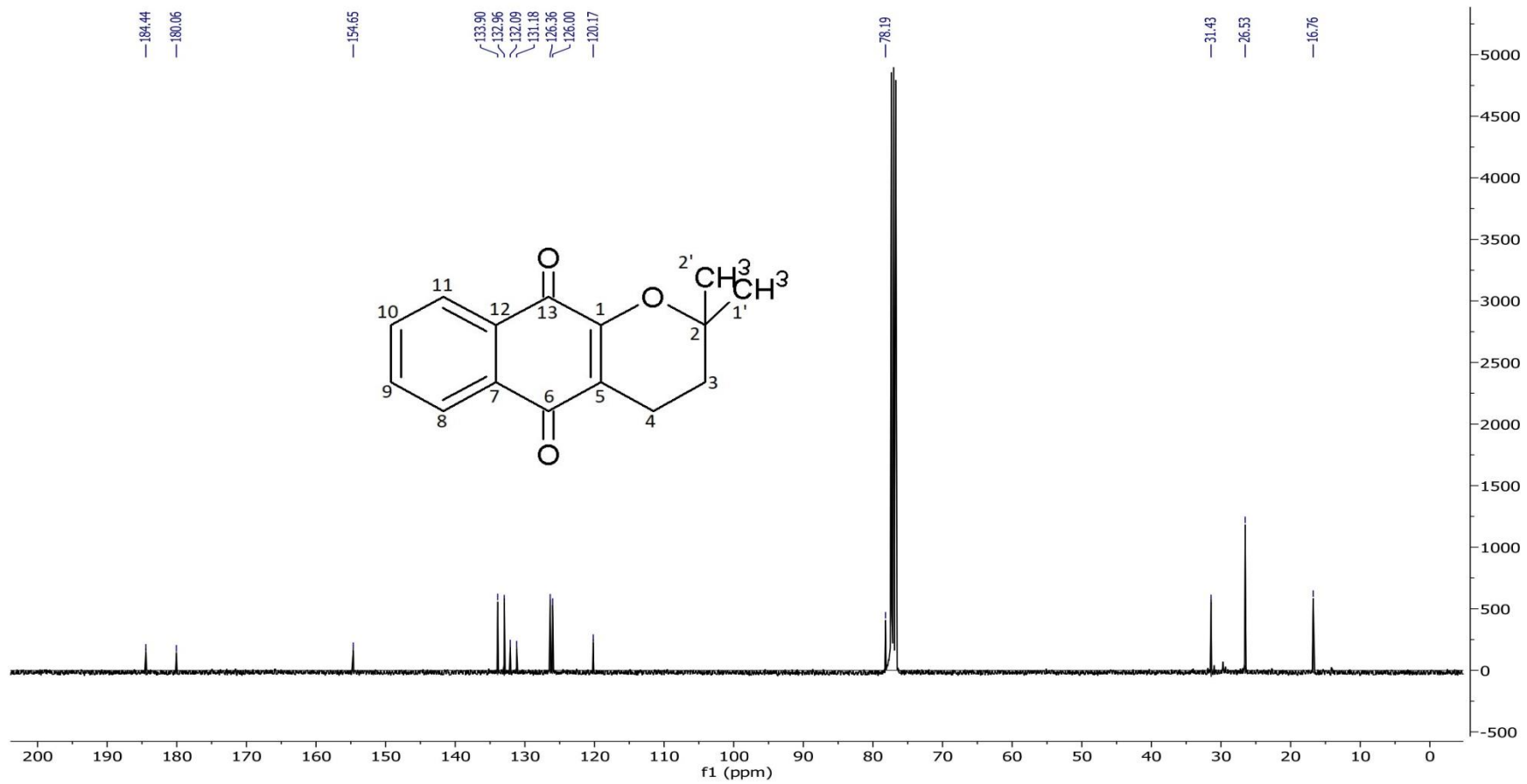


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C da α -Lapachona (CDCl_3 , 50 MHz).

5.2. ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

5.2.1. Atividade contra vermes adultos *in vitro*

Inicialmente, avaliou-se a atividade das naftoquinonas contra os vermes adultos. Os vermes adultos tratados com diferentes concentrações do lapachol, por 24h, não apresentaram alterações em sua morfologia (Figura 18e) e os movimentos parasitários estavam semelhantes ao controle negativo. Também não foram observados parasitos mortos e sua concentração inibitória 50% foi superior a 500µg/mL (Tabela 4). Estes resultados sugerem que o lapachol, *in vitro*, não apresenta atividade contra os vermes adultos.

Diferente ao observado neste estudo, outros trabalhos demonstraram a atividade moluscicida (SANTOS et al. 1981; 2000), cercaricida (LIMA et al. 2001) e atividades de tripanocidas (SANTOS et al. 1981; GOULART et al. 1997) do lapachol. Os mecanismos envolvidos nestas atividades são: estresse oxidativo e alquilação de nucleófilos celulares. As quinonas são moléculas altamente reativas e podem sofrer redox cíclico, sendo obtido o radical semiquinona, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que incluem o radical ânion superóxido, radical peroxila, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Estresse oxidativo pode ocasionar danos no DNA, proteínas e lipídeos (BOLTON et al. 2000). A presença da OH no lapachol (Figura 1c) pode contribuir para a peroxidação lipídica (OSSOWSKI et al. 2000), no entanto esta OH está ausente na β-lapachona e α-lapachona.

Alguns antiparasitários mostram-se ativos contra um estágio do parasito, no entanto, pode não apresentar atividade contra a outra forma do ciclo parasitário, um exemplo são os fármacos antimaláricos que, em sua maioria, são esquizontocidas sanguíneos e inativos contra as formas hepáticas do *Plasmodium vivax* (BRASIL, 2001). A não atividade do lapachol sobre os vermes adultos pode ser explicada pelas diferenças entre a forma e as cercarias.

Quando as cercarias se transformam para esquistossômulos respiração se torna anaeróbica; ocorre a perda da cauda; eliminação progressiva do glicocálix (SKELLY & SHOEMAKER, 2000; SILVA; NEVES; GOMES, 2008) e, conseqüentemente, há um aumento da permeabilidade à água (MCLAREN, 1980; SILVA; NEVES; GOMES, 2008); esvaziamento das glândulas secretoras e seu tegumento é reorganização, com acúmulo de uma proteína transportadora de glicose (SGTP4) na rede de cítons subtegumentares (SKELLY&SHOEMAKER, 2000; SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

Os esquistossômulos migram para o fígado, dando início a organogênese, superfície mais externa do tegumento, que interage com o hospedeiro, é formada por duas camadas lipídicas justapostas, enquanto a superfície basal interna é limitada por uma única membrana de camada dupla. A membrana externa tem aspecto heptalaminado e com invaginações. O tegumento conecta-se às células subtegumentares (cítons) por conexões citoplasmáticas ligadas por microtúbulos, estes cítons contêm núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, corpos membranosos e corpos discóides (vesículas multilamelares), que se fundem com a superfície mais externa (SILVA; NEVES; GOMES, 2008). Estas mudanças sugerem que, talvez o lapachol atue em uma estrutura, presente na cercaria, ausente no verme e por isso, não se observa as alterações estruturais e nem a morte do parasito.

Outra possibilidade é, o lapachol pode ser um pró-fármaco, isto é, ele precisa ser metabolizado pelo sistema enzimático hepático (P-450 redutase) para a geração do radical superóxido (KUMAGAI et al. 1997) que participará do dano ao DNA do verme adulto(SANTOS et al. 2000). No entanto, o presente estudo foi realizado *in vitro*, logo avaliou-se apenas a atividade do lapachol. Porém, somente após a realização de estudos *in vitro* contendo a fração S9 (fração microssomal) ou *in vivo* pode-se sugerir que a atividade esquistossomicida do lapachol, provavelmente, está relacionada ao radical superóxido.

Visando verificar se a orientação em para-naftoquinona pode favorecer a atividade contra vermes adultos avaliou-se a atividade da α -lapachona. No

entanto, os parasitos tratados por 24h, com diferentes concentrações deste composto não apresentaram alterações em sua morfologia (Figura 18f) e sua motilidade foi similar ao controle negativo. Em síntese, esta alteração conformacional não contribui para a atividade.

A α -lapachona apresenta uma menor citotoxicidade que a β -lapachona, pois o anel diidropirano da α -lapachona, atuando como substituinte 2-alcoxi e 2-alkil na porção quinona, reduz o potencial oxidativo (NETO et al. 2013, SANTOS 2012), esta redução pode contribuir para a redução da citotoxicidade. Entretanto, esta redução do potencial oxidativo também interfere nas atividades antitumorais, antiplasmódicas, entre outras (SILVA, et al 2012). Uma estratégia que vem sendo utilizada é as alterações estruturais deste composto, obtendo-se compostos ativos e com baixa toxicidade (SANTOS, 2012). Alterações estruturais na α -lapachona podem levar a obtenção de derivados com atividade esquistossomicida.

Outras atividades biológicas, como por exemplo a atividade antitumoral, a β -lapachona mostrou-se mais promissora que o lapachol e α -lapachona (SILVA et al 2012). Então, avaliou-se a atividade desta substância contra os vermes adultos, sendo observada alterações significativas na morfologia do parasito, após 24h de tratamento. Os parasitos tratados com a β -lapachona apresentavam dorso estremecido e corpo enrolado em todas as concentrações utilizadas (Figura 19). A mefloquina também exibiu uma alta capacidade de induzir alterações morfológicas na membrana de esquistossômulos e vermes adultos (MANNECK, HAGGENMULLER & KEISER, 2010).

O tratamento dos vermes, por 24h, com a β -lapachona (concentrações: 500, 250 e 125 μ g/mL) levou a morte de 100% dos parasitos. Nas demais concentrações (62,5 e 31,25 μ g/mL) observou-se uma taxa menor da mortalidade dos vermes (taxa de vermes mortos= 91,6% e 83.3%, respectivamente). Os vermes vivos apresentaram menor motilidade e discretas alterações no tegumento (Figura 19). Outros estudos *in vitro*, demonstraram alterações no tegumento (AIRES, 2013; ARAÚJO et al. 2016), na mobilidade e elevada taxa de mortalidade, sendo estes resultados similares aos observados no presente estudo (AIRES, 2013).

Os parasitos vivos tratados com a naftoquinona (62,5 e 31,25 µg/mL) foram observados por mais 96h (tempo total de observação=120h). Verificou-se que, após a retirada da quinona não foi observado alterações na morfologia do parasito, na motilidade e não houve aumento da taxa de mortalidade (houve manutenção da CI₅₀). Este efeito foi similar ao controle positivo, praziquantel, que possui atividade rápida e que se mantem ao passar do tempo (Tabela 4; COUTO, 2014)

A β-lapachona têm se mostrado ativas contra o *S. mansoni*, sendo que quando aplicada topicamente bloqueia a penetração cercariana (PINTO et al. 1997), além disso, possui atividade cercaricida. Acredita-se que a β-lapachona atue inibindo a glicólise aeróbica de vermes adultos; alterando a motilidade e superfície do tegumento dos vermes (EDINGL, TERSAN, WAITE, 1947).

Vários mecanismos podem estar envolvidos na atividade contra os vermes adultos da β-lapachona, porém a enzima tiorredoxina glutationa redutase (TGR), que é essencial para a sobrevivência do parasita *S. mansoni* (KUNTZ et al. 2007), pode estar envolvida nesta atividade. A TGR tem função de neutralização de EROs e ERNs, seu papel pode ser considerado fundamental na manutenção da integridade e funcionamento sistema antioxidante de esquistossomos (NEVES, 2016). A inibição desta enzima pode ocasionar um estresse oxidativo, levando a morte do parasito.

Os vermes adultos do *S. mansoni* vivem em um ambiente aeróbico, veia mesentérica, necessitando de mecanismo efetivo para manter o balanço redox celular, minimizando os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, assim como pela resposta do sistema imune do hospedeiro (KUTZ et al. 2007; SAYED et al. 2008). Ooxadiazol 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3- carbonitrila-2-oxido foi capaz de reduzir a carga parasitária em animais infectados e melhorou o processo patológico associado a formação de granuloma induzido pelos ovos do Schistosoma atuando via produção de NO (óxido nítrico) e inibição de TGR (SAYED et al. 2008). Talvez, a atividade da β-lapachona esteja relacionada ao estresse oxidativo, no entanto a atividade inibitória de TGR ainda não foi avaliada.

Tabela 4: Atividade contra vermes adultos do lapachol e análogos

Substancias	CI ₅₀ (µg/mL)	Alteração da resposta inibitória					Respostas
		24h	48h	72h	96h	120	
Lapachol	>500	-	-	-	-	-	Inativo
β-lapachona	<31,25	Não	Não	Não	Não	Não	Ativo
α-lapachona	>500	-	-	-	-	-	Inativo
Praziquantel	<0,05	Não	Não	Não	Não	Não	Ativo

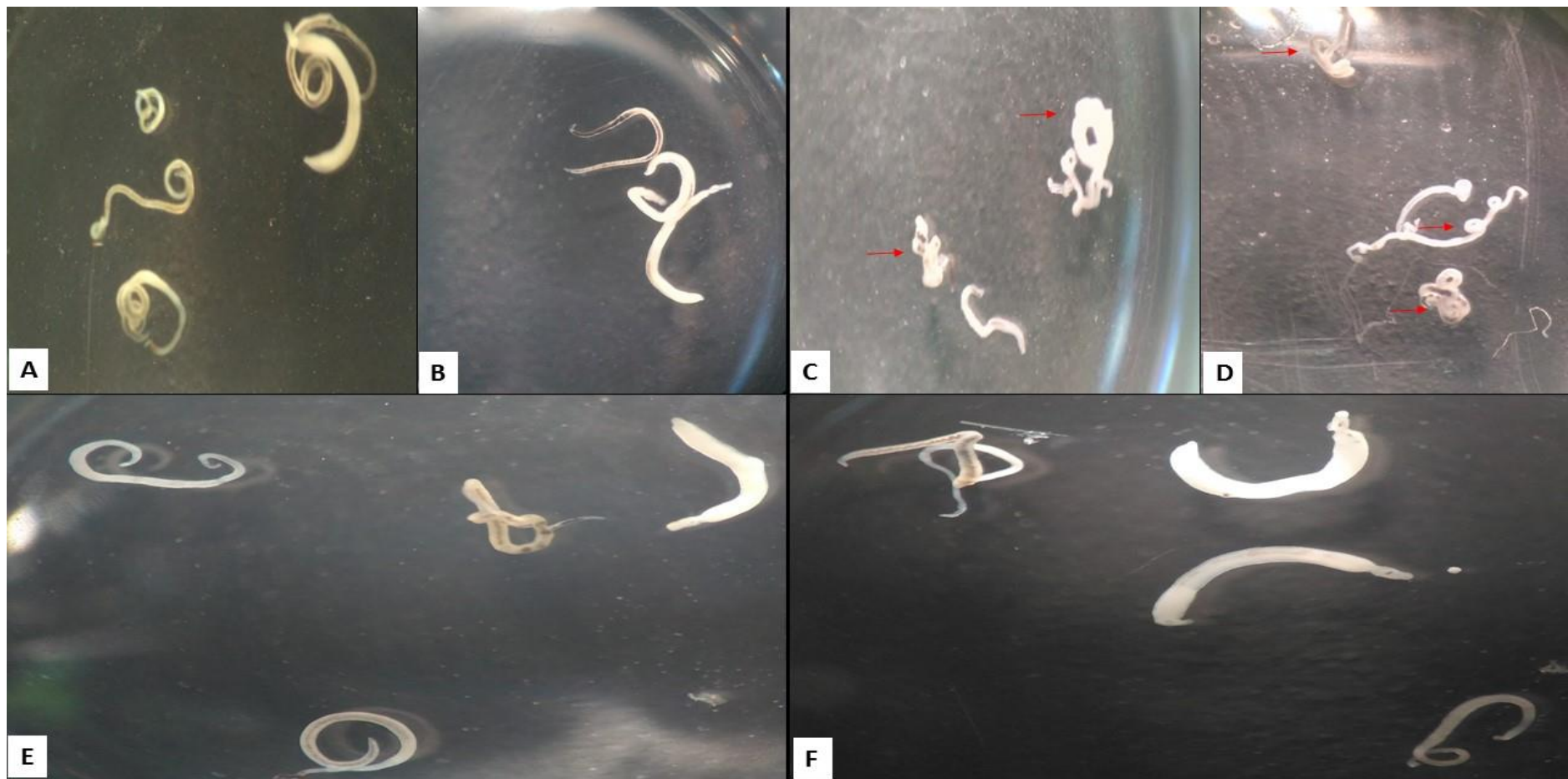


Figura 18:Atividade esquistossomicida de vermes adultos, lapachol e α -lapachona

Legenda: A= controle do meio (RPMI); B= controle do solvente (DMSO); C= controle negativo na maior concentração (praziquantel 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$); D= controle negativo na menor concentração (praziquantel 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); E= lapachol 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F= α -lapachona, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

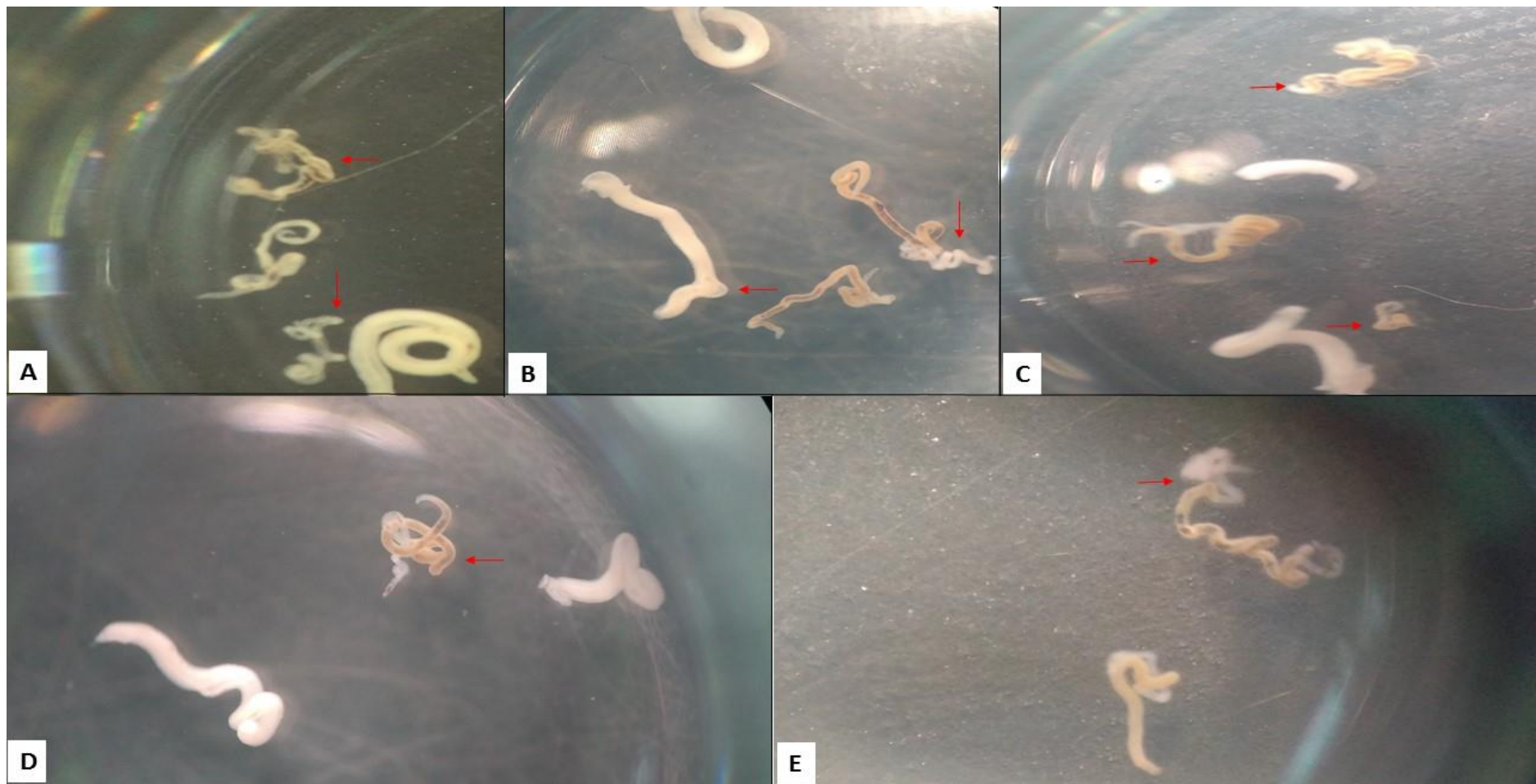


Figura 19:Atividade esquistossomicida *in vitro* de vermes de β -lapachona

Legenda:A=concentração 500µg/ml; B= concentração 250µg/ml, C= concentração 125µg/ml; D= concentração 62,5µg/ml; E= concentração 31,25µg/ml

Nas análises microscópicas dos parasitas tratados com β -lapachona, observou-se alterações no tegumento do parasito, então investigou-se a peroxidação pode estar envolvida neste efeito. Quando realizou a dosagem de malondialdeído, observou-se que quando o parasita foi tratado com a β -lapachona, o valor de malondialdeído foi maior, (Tabela 5), sugerindo que esta atividade pode estar relacionada com a peroxidaçãolipídica. Também, o praziquantel possui a capacidade de indução a peroxidaçãolipídica (Tabela 5).

Tabela 5: Dosagem do Malondialdeído presente nas amostras de a β -lapachona e controles
DOSAGEM DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

AMOSTRA($\mu\text{g/mL}$)	MÉDIA \pm SD
B500	119,35 \pm 0,46
B250	118,35 \pm 65,31
B125	119,35 \pm 63,13
B62,5	100,00 \pm 30,39
B31,25	86,61 \pm 4,21
PZQ8	100,74 \pm 5,26
PZQ4	92,06 \pm 4,30
PZQ2	119,35 \pm 4,21
PZQ1	115,63 \pm 5,26
PZQ0,5	104,96 \pm 17,38
RPMI	72,47 \pm 17,89
DMSO	70,24 \pm 6,31

Legenda: SD: Desvio Padrão. B500 – B31,25: β -lapachona em concentrações decrescentes 500- 31,25 ($\mu\text{g/mL}$), PZQ 8 – 0,5: Praziquantel em concentrações decrescentes 8 – 0,5 ($\mu\text{g/mL}$).

As naftoquinonas podem sofrer redox ciclico, então, avaliou a capacidade antioxidante total (TEAC) da β -lapachona, sendo observada baixa capacidade antioxidante, ou seja tem um baixo valor de proteção. Ao comparar a capacidade antioxidante total a peroxidação lípidica, observa-se que a β -lapachona possui maior potencial oxidante.

As naftoquinonas são grupos que possuem um alto poder de indução da peroxidação de lípidios, levando a formação de substancias reativas, atuando como aceptores de elétrons e induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (MEDINA, 2006, FERREIRA, 2010). Sabe-se que o principal mecanismo de ação das naftoquinonas está relacionado à produção de radicais superóxido (DUBIN et al. 1990)

Tabela 6: Determinação da Capacidade Antioxidante total de β -lapachona e controles

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC)	
AMOSTRA($\mu\text{g/mL}$)	MÉDIA \pm SD
B500	2,40 \pm 0,65
B250	4,31 \pm 1,23
B125	2,40 \pm 1,82
B62,5	2,34 \pm 3,78
B31,25	3,08 \pm 1,04
PZQ8	5,66 \pm 1,14
PZQ4	5,26 \pm 1,56
PZQ2	7,53 \pm 0,77
PZQ1	9,72 \pm 1,11
PZQ0,5	3,94 \pm 2,48
RPMI	5,69 \pm 2,55
DMSO	5,76 \pm 1,30

Legenda: SD: Desvio Padrão. B500 – B31,25: β -lapachona em concentrações decrescentes 500- 31,25 ($\mu\text{g/mL}$), PZQ 8 – 0,5: Praziquantel em concentrações decrescentes 8 – 0,5 ($\mu\text{g/mL}$).

Estudos observaram efeitos similares de outras naftoquinonas, que lavam a peroxidação de lipídeos. Desta forma, esta classe é conhecida por ter sua atividade ligada a suas ações pró-oxidantes, levando a devido à formação das espécies reativas de oxigênio (ERO), causando danificação nas células por meio de peroxidação lipídica (BARBOSA, 2014, MEDINA 2006).

Sugere-se que a atividade esquistossomicida da β -lapachona observada nesse trabalho seja igual de sua atividade tripanocida, qual parte do mecanismo de ação dessa quinona envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela biorredução do núcleo quinonoídico por enzimas específicas e oxigênio (MONS et al 1992, BENITES 2008) as quais são tóxicas para o *Trypanosoma cruzi* (FERREIRA, 2010).

Em síntese, *in vitro*, a β -lapachona foi promissora com esquistossomicida e parece que a peroxidação lipídica contribui para esta atividade. No entanto, esta capacidade oxidativa podem contribuir para a citotoxicidade. Então, visando verificar o nível de seletividade para a atividade esquistossomicida, avaliou-se a citotoxicidade da β -lapachona frente as linhagens epitelial gástrica (MNP01) e carcinoma gástrico não metastático (ACP02), depois se relacionou as concentrações citotóxicas 50%, obtidas após

24h de tratamento, a CI_{50} obtida no ensaio in vitro em vermes adultos. A partir desta relação, pode-se estabelecer o nível de seletividade da β -lapachona para a atividade esquistosomicida.

Na tabela 7 observa-se que a β -lapachona não foi citotóxica para as linhagens MNP01 e AC02 ($CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), quando se relaciona a atividade esquistosomicida ($CI_{50} < 31,25 \mu\text{g/mL}$), observa-se uma significativa seletividade (Índice de seletividade=16). Quando se compara a outro estudo, onde se avaliou a citotoxicidade da β -lapachona em outra linhagem, (MCF-7-adenocarcinoma de mama humano, também se verifica a elevada seletividade (IS= 22,68) deste composto (LAMBERTI et al. 2013).

Baseado nestes resultados (Tabela 7), pode-se sugerir que a exposição aguda a β -lapachona apresenta um efeito antiparasitário pronunciado, porém a citotoxicidade é baixa. Estudos anteriores demonstraram que a resposta citotóxica de células de câncer de mama e próstata à β -lapachona é significativamente aumentada pela expressão de NAD(P)H quinonaoxidoreductase (NQO1), a redução da β -lapachona pelo NQO1 leva a um ciclo, em que a quinona e a hidroquinona formam um ciclo redox com uma perda de NAD reduzida (PINK et al. 2000). A enzima principal associada ao ciclo redox da β -lapachona e apresenta elevada expressão em células tumorais (NQO1), especialmente em linhagens de câncer de tumores sólidos como de pâncreas, pulmão e mama (PARK et al. 2014).

Tabela 7: Citotoxicidade e seletividade de β -lapachona

β -lapachona	$CC_{50}CI_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$)		Índice de seletividade
	Células	Vermes	
MNP01	>500	<31,25	16
AC02	>500	<31,25	16
MCF-7*	$2.93 \pm 0.03 \mu\text{M}$	<31,25	22,68

As quinonas são espécies neutras e sofrem protonação com certa dificuldade, no entanto, possuem duas propriedades químicas: são oxidantes e são eletrofílicas (MONKS et al. 1992). Estas características químicas permitem participar de reações do ciclo redox e reações de adição nucleofílica de Michael, respectivamente. Em relação a característica eletroquímica advém da redução dos dois grupos quinônicos de duas formas: a) transferência de dois

elétrons em um única etapa, em meio aquoso, levando à redução da quinona (Q) em hidroquinona (QH₂); b) redução da quinona em duas etapas monoelétrônicas, em meio aprótico, resultando na formação do radical ânion (Q^{•-}) e o segundo processo, no diânion (Q²⁻; Figura 20; Little et al. 1995).

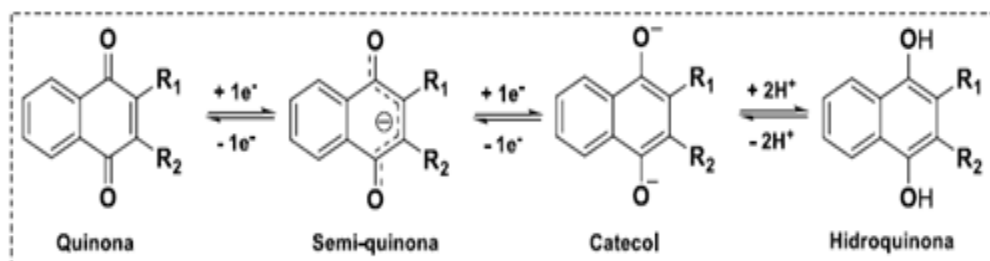


Figura 20: Processo redox de naftoquinonas
Fonte: HILLARD et al 2008.

O principal interesse no estudo das quinonas advém da sua capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células (Figura 21: HILLARD et al. 2008; SILVA et al. 2003), ocasionando peroxidação lipídica, destruição de proteínas, danificação de ácidos nucleicos e quebra das fitas de DNA (HILLARD et al. 2008). No entanto, parece que para obter estes efeitos celulares são necessárias concentrações superiores a utilizada para o efeito esquistossomicida.

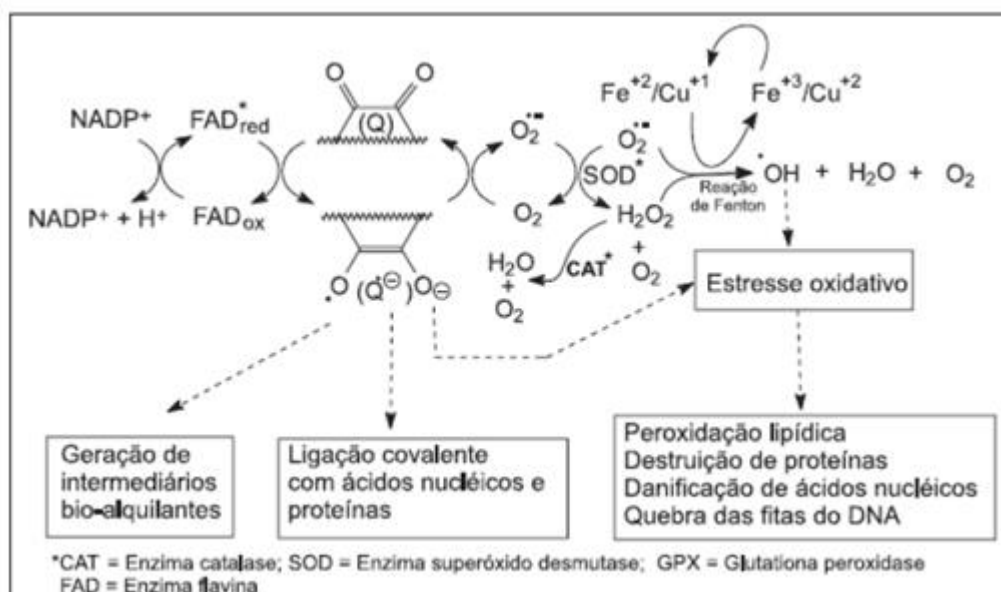


Figura 21: Ciclo redox induzido por quinonas
Fonte: HILLARD et al 2008.

Outro fator pode contribuir para o dano celular, é o aumento do tempo de exposição da célula ao agente agressor (PONTES, 2016). A exposição das células MNP01, durante 48h ($CC_{50} = 446,3 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) e 72h ($CC_{50} = 446,3 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$), não alterou de forma significativa a citotoxicidade da β -lapachona. Também, a exposição das células ACP02 a esta quinona, por 48h, não alterou de forma significativa ($CC_{50} = 464,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados sugerem que, talvez, a resposta citotóxica da β -lapachona não seja tempo dependente, mais sim concentração dependente. Os possíveis mecanismos envolvidos nesta atividade são: inibição das topoisomerases I e II, estresse oxidativo (BOOTHMAN et al. 1989; KRISHNAN e BASTOW, 2000), indução de apoptose (WUERZBERGER et al. 1998; PINK et al. 2000).

5.2.2. Atividade Esquistossomicida *in vivo*

Além da atividade antiparasitária *in vitro*, avaliou-se se a β -lapachona interfere na ovoposição e na quantidade de vermes recuperados das veias mesentéricas. A substância foi administrada por via oral, sendo estas avaliações realizadas após 24h.

Para produzir seus efeitos no sistema porta, o fármaco deve ser capaz de deixar o trato gastrintestinal e alcançar o sistema porta e fígado, logo a molécula precisa apresentar um equilíbrio entre a lipossolubilidade e hidrossolubilidade (KATZUNG & TREVOR, 2017). A β -lapachona apresenta hidrossolubilidade limitada (LINDENBERG et al., 2004), conseqüentemente, a biodisponibilidade pode ser reduzida e por isso, não apresentar efeito antiparasitário (AIRES, 2014a).

Ao analisar as lâminas obtidas das fezes (método Kato-katz) observou-se a presença de ovos, em todos os grupos de animais, sendo observada uma redução significativa no número de ovos nos animais tratados com praziquantel. No entanto, não houve redução significativa no número de ovos nos animais tratados com β -lapachona (Tabela 8). Estes resultados sugerem que, talvez, a β -lapachona não foi suficientemente eficaz para reduzir a

oviposição dos vermes. Ou ainda, talvez, a concentração da β -lapachona no sítio de ação é muito reduzida, por isso, não houve inibição da ovoposição. Conforme dito anteriormente, parece que a resposta da β -lapachona está diretamente relacionada a concentração no sítio de ação.

Em relação as quantidade de vermes recuperados, observou-se redução significativa nos animais tratados com o praziquantel, porém a redução do número de vermes recuperados nos animais tratados com β -lapachona não foi significativa (Tabela 8). Em outro estudo foi observado resultados semelhantes, isto é, o clonazepam foi ativo, *in vitro*, sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, levando a 100% de mortalidade. No entanto, experimentos *in vivo*, este não reduziu o número de ovos nas fezes e o número de vermes recuperados (KATZ et al. 2013).

Alguns fatores podem explicar esta divergência dos resultados, dentre estes destacam-se: a baixa absorção no trato gastrintestinal, levando a concentrações plasmáticas na faixa subterapêutica; durante o processo de absorção, a β -lapachona pode sofrer efeito de primeira passagem e o metabólito originado não tem atividade; a dose utilizada foi inadequada; e ainda fatores relacionados ao próprio parasito.

Tabela 8: Avaliação da atividade *in vivo*

Grupo	N° de ovos (Kato-Katz)	N° de vermes (Perfusão)
β-lapachona	6 (144)*	10
Praziquantel	2 (48)*	6
DMSO	7 (68)*	14

Legenda:* = Total de ovos encontrados por grama de fezes, para isso multiplica números de ovos encontrado por 24.

Apesar dos estudos *in vitro* não sinalizarem a toxicidade, foram realizados estudos histopatológicos dos fígados e rins dos animais submetidos ao tratamento com a β -lapachona. Também, foram realizados estudos similares nos animais tratados com praziquantel e DMSO.

Estudos histopatológicos dos rins de todos os animais (tratados com DMSO, praziquantel e β -lapachona) demonstraram que não havia nenhuma alteração renal. Os glomérulos e cápsula de bowman estavam íntegros, sendo possível visualizar o núcleo celular. Também, o tecido cúbico simples

encontrava-se normal (Figura 22). Em síntese, nenhum dano renal foi observado, sugerindo que a β -lapachona e praziquantel não causaram danos renais.

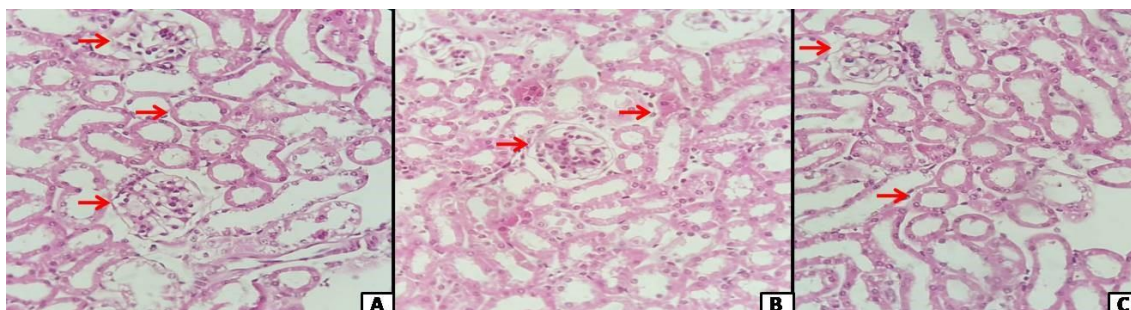


Figura 22: Análise histopatológica dos rins de camundongos infectados e submetido ao tratamento com praziquantel, β -lapachona e DMSO

Legenda: A= grupo tratado com praziquantel; B=grupo tratado com β -lapachona; e C= grupo controle tratado apenas com DMSO e água. Setas= glomérulo e néfrons

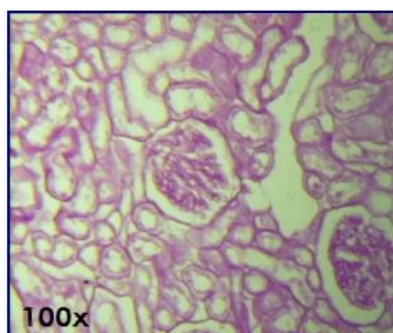


Figura 23: Análise histopatológica dos rins de camundongos saudáveis

Fonte:BRANCO e MULLER, 1995

Também foi avaliado o potencial hepatotóxico da β -lapachona e do praziquantel, não sendo observada nenhuma alteração histopatológica neste órgão. As inclusões citoplasmáticas do hepatócito, sobre a forma de grânulos vermelho-púrpura, íntegras com ausência de inflamação ou presença de grânulos, os vasos sinusoides também íntegros. Pode-se observar que a veia porta hepática e os demais tecidos hepáticos estavam sem danos. Estes resultados sugerem, que não houveram danos hepáticos quando comparados a lâmina de fígado saudável (Figura 25; BRANCO e MULLER, 1995)

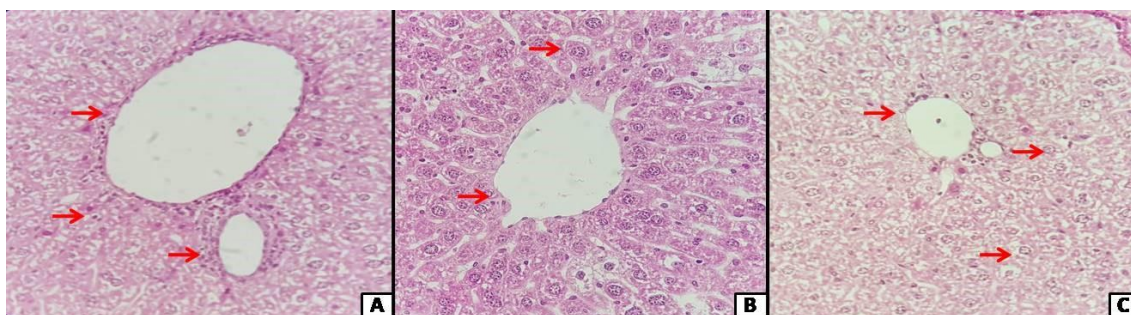


Figura 24: Lâminas de fígado de camundongo tratados com β -lapachona
Legenda: A= grupo tratado com praziquantel; B=grupo tratado com β -lapachona; e C= grupo controle tratado apenas com DMSO e água.



Figura 25: Lâminas de fígado de camundongo saudável
Fonte: BRANCO e MULLER, 1995

Quando se compara os efeitos citotóxicos do praziquantel a β -lapachona, observou-se que estes não apresentaram toxicidade. Estas substâncias foram ativas, *in vitro*, contra o verme adulto, porém a β -lapachona não apresentou atividade significativa *in vivo* (Tabela 9). Esta não atividade *in vivo* da β -lapachona, provavelmente, está relacionada a aspectos farmacocinéticos. Logo, desenvolvimento de formulações e/ ou alterações estruturais podem contribuir para a atividade esquistossomicida da β -lapachona.

Tabela 9: Síntese dos resultados obtidos

Substâncias	Verme adultos		Citotoxicidade	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
β -lapachona	Ativo	Inativo	NT	NT
Praziquantel	Ativo	Ativo	NT	NT

Legenda: NT: não tóxico

CONCLUSÃO

Alterações estruturais do lapachol levaram a obtenção de uma naftoquinona promissora com esquistossomicida, a β -lapachona. Parece que a peroxidação lipídica contribui para esta atividade *in vitro*. A divergência entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, pode estar relacionada a baixa biodisponibilidade deste composto. Comparado ao praziquantel, a β -lapachona mostrou-se menos promissora *in vivo*. A β -lapachona não apresentou citotoxicidade *in vitro*, também não ocasionou alterações renais e hepáticas.

8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEEZ, E. H.; AHMAD, A. K.; ABDULLA, A. M.; AABDEL-WAHAB, S.; MOSALEM, F. A. Therapeutic effect of alpha lipoic acid combined with praziquantel on liver fibrosis induced by *Schistosoma mansoni* challenged mice. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 577-586, 2012.
- ABDULLA, M. H.; RUELAS, D. S.; WOLFF, B.; SNEDECOR, J.; LIM K. C.; XU, F.; RENSLO, A. R.; WILLIAMS, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. 1-14, 2009.
- AIRES, A. L. **Susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni* frente a β -lapachona**. 2013, 158 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C. P. A.; SILVA, R. A.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J. S.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M. O.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; Ultra structural analysis of β -lapachone-induced surfasse membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental parasitology**, v. 142, p. 83-90, 2014b.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C. P. A.; SILVA, R. A.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J. S.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M. O.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. β -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261-267, 2014a.
- ALMEIDA, E. R. Plantas Medicinais Brasileiras [Medicinal Plants of Brazil: popular and scientific knowledge] Edited by:Hemus LTDA. São Paulo, 1993.
- ALMEIDA, E.R.; DE MELLO, A.C. DE.; SANTANA, C.F. DE.; SILVA FILHO, A.A. DA.; SANTOS, E.R. DOS. The action of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)1,4-naphthoquinone (Lapachol) in pregnant rats. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 38, n. 3, p. 21-23, 1988.
- ANDRADE-NETO, V.F.; GOULART, M.O.F.; SILVA FILHO, J.F.; SILVA, M.J.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A.V.; ZALIS, M.G.; CARVALHO, L.H.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its Derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p.1145-1149, 2004.
- ANDREWS, P.; THOMAS, H.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. Praziquantel. **Medicinal Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 147-200, 1983.
- ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; RAMALHO CATÃO, R.M.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SARMENTO SILVA, T.M. Atividade antimicrobiana "*in vitro*" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos

sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.16 n.4, p, 517-524, 2006.

ARAUJO N, MATTOS ACA, COELHO PMZ, KATZ N. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental Schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 103, n. 8, p. 781-785, 2008.

ARAUJO, J. M.; DE MELO, T. T.; DE SENA, I. C.; ALVES, C. C.; ARAUJO, N.; DURÃES, F. D. O. V.; OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T. Schistosoma mansoni schistosomula tegument (Smteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. **Acta Tropical**, v. 124, p. 140-146, 2012.

ARAÚJO, N. P.; COUTO, F. F. B.; ZANI, C. L.; KATZ, N. Avaliação da Atividade Esquistossomicida do carvacrol em experimentos *in vitro* e *in vivo*. **Revista de Patologia Tropical** v. 45, n. 2, p.179-191, 2016

ARAÚJO, N. P.; SOUZA, S. P.; PASSOS, L. K. J.; SIMPSON, A. J. G.; DIAS NETO, E.; PEREIRA, T. R.; CERUTTI, J. R. C.; ALENCAR, F. E. C.; DIETZE, R.; KATZ, N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p.467-476, 1996.

ARAÚJO, S. C.; DE MATTOS, A. C. A.; TEIXEIRA, H. F.; COELHO, P. M. Z.; NELSON, D. L.; DE OLIVEIRA, M. C. Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal Drug by incorporation in to nano emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 307-315, 2007.

AUSTIN, F.G. *Schistosoma mansoni* chemo prophylaxis with dietary lapachol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.23, n.3, p.412-419, 1974.

BAI, L.; YING HAN, Y.; JINFENG YAO, J.; LI, X.; LI, Y.; XU, P.; XUE, M. Structural elucidation of the metabolites of lapachol in rats by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 944, p. 128-135, 2014.

BARBOSA, M. R.; MEDEIROS, M. A. S.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL, T. C. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**. v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, P. T, NETO, H. D. Preparação de derivados do Lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 2, 331-334, 2013

BARBOSA-FILHO, J. M.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; GIULIETTI, A. M.; BOTELHO, M. P.; SANTOS, R. R. Processo de síntese da 3-iodo-alfa-lapachona e 3-iodo-beta-lapachona e usos como imunomodulador,

antimicrobiano e antiinflamatório. Depósito de patente publicado na Revista da Propriedade Industrial 1843, de 02/05/06, referente ao PI 0403686-7, 2016.

BENITES, J.; VALDERRAMA, J. A.; RIVERA, F.; ROJO, L.; CAMPOS, N.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M. S. J. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 16, n. 2, p. 862-868, 2008.

BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; SPITZ, D. R.; BOOTHMAN, D. A. Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33684-33696, 2006.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends in Parasitology**, v.18, n. 7, p. 309-314, 2002.

BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; DONG, Y.; YANG, C. R.; GIRARD, L.; MINNA, J. D.; BORNHANN, W. G.; GAO, J. BOOTHMAN, D. A. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in nonsmall-cell lung cancer cells by h-lapachone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 28, p.11832-11837, 2007.

BLOCK, J. B.; SERPICK, A. A.; MILLER, W.; WIERNIK, P.H. Early clinical studies with Lapachol (NSC-11905), **Cancer Chemther Reports part 2**, v. 4, n. 4, p. 27- 28, 1974.

BOLTON, J. L.; TRUSH, M. A.; PENNING, T. M.; DRYHURST, G.; MONKS, T. J. Role of quinones in toxicology, **Chemical Research in Toxicology**, v.13, n. 3, p. 135-160, 2000.

BONESSO-SABADINI, P. I. P.; DIAS, L. C. S. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p.381-385, 2002.

BOOTHMAN, D. A.; GREER, S.; PARDEE, A. B. Potentiation of halogenated pyrimidine radio sensitizers in human carcinoma cells by β -lapachone(3, 4-dihydro-2, 2-dimethyl-2H-naphtho [1, 2-b] pyran-5, 6-dione), a novel DNA repair inhibitor. **Cancer Research**, v.47, n. 20, p.5361-5366, 1987.

BOOTHMAN, D. A.; TRASK, D. K.; PARDEE, A. B. Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. **Cancer research**, v1, n.49, p.605-6012, 1989.

BOTROS, S.; PICA-MATTOCCIA, L.; WILLIAM, S.; EL-LAKKANI, N.; CIOLI, D. Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p.1453-1457, 2005

BOURGUIGNON, S. C.; CAVALCANTI, D. F.; DE SOUZA, A. M.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANTOS D. O.; DA SILVA, G. G.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V.F.; DE PINHO, R. T.; ALVES, C. R. *Trypanosoma cruzi*: insights in to naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 160-166, 2011.

BOVERIS, A.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. F.; STOPPANI, A. O. Effect of α -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 175, n. 2, p. 431-439, 1978a

BOVERIS, A.; STOPPANI, A. O. M.; DO CAMPO, R.; CRUZ, F. Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma Cruzi*. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v.61C, n. 2, p.327-329, 1978b.

BOVERIS, A.; R, DOCAMPO.; J, F, TURRENS.; A, O, STOPPANI. Effect of β -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 175, n. 2, p. 431-439, 1978c.

BRANCO, D. M.; MULLER, R. L. Atlas eletrônico de Histopatologia, **Departamento de Ciências Morfológicas Departamento de Informática Aplicada**. 1995. Disponível em: <
<http://www.danielbranco.com.br/atlasi/atlas.html>>

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: CPqRR, 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica - Dados, Março, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>, 2014a. Acesso em: 07 junho de 2017.

BRASIL. Vigilância da Esquistossomose Mansonii Diretrizes Técnicas, 2014b

CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Shistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Fiocruz**, 1124 p., 2008.

CASTRO, S. L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosomacruzi*. **Acta Tropica**, v. 53, n.2, p. 83-98, 1993.

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminadosnor- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação**. 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CLAESSENS, S.; HOBANIMANA, P.; DE KIMPE, N. Synthesis of naturally occurring naphthoquinone epoxides and application in the synthesis of β -lapachone. **Organic & Biomolecular Chemistry**. V. 8, n. 16, p. 3790-3795, 2010.

COELHO, P. M. Z.; LIMA, F. C. S.; NOGUEIRA, J. A. M. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* isolate from a patient submitted to repeated treatments. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 39, p. 101-106, 1997.

COELI, R.; BABA, E. H.; ARAUJO, N.; COELHO, P. M.; OLIVEIRA, G. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2013.

COSTA, A. M. Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

COSTA, C. S.; DA ROCHA, A. M.; DA SILVA, G. S.; DE JESUS, R. P. F. S.; DE ALBUQUERQUE, A. C. Programa de Controle da Esquistossomose: avaliação da implantação em três municípios da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Saúde Debate**, v. 41, n. Especial, p. 229-241, 2017.

COSTA, E. V. S.; BRÍGIDO, H. P. C.; SILVA, J. V. S.; COELHO-FERREIRA, M. R.; BRANDÃO, G. C.; DOLABELA, M. F. "Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae)". **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 6 p, 2017.

COSTA, W. F. Avaliação da atividade genotóxica do lapachol e β -lapachona e anticarcinogênica do lapachol, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2010. 108 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

COURA, J. R.; CONCEIÇÃO, M. J. Correlação entre carga parasitária do *S. mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 14, n.1, p. 93-97, 1981.

COUTINHO, E. M.; SOUZA, M. M.; SILVA, L. M.; CAVALCANTI, C. L.; ARAÚJO R. E.; BARBOSA, J. A. A. Pathogenesis of schistosomal pipestem fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of pipestem fibrosis in mice, **International Journal of Experimental Pathology**, v. 78, n. 5, p. 337-342, 1997.

COUTO, F. F. B. **Estudo da resistência do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 ao praziquantel**. 2014. 98 p. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2014.

COUTO, F. F. B.; COELHO, P. M. Z.; ARAÚJO, N. KATZ, N.; KUSEL, J. R.; JANOTTI-PASSOS, L. K.; MATTOS, A. C. A. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.2, p. 153-157, 2011.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p.301-304, 2005.

COUTO, J. L. A.; VIEIRA, R. C. S.; BARBOSA, J. M.; MACHADO, S. S.; FERREIRA, H. S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 390-393, 2008.

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

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134-139, 2007.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropical**, v. 86, n.2-3, p. 141-159, 2003.

DE ALMEIDA, E. R.; DA SILVA, F. A. A.; DOS SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. C. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal Ethnopharmacology**. 1990, v.29, n. 2, p.239-241, 1990.

DE SOUZA, E. R.; BRANDÃO, M. A. F.; DE OLIVEIRA, L. E. G.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Desenvolvimento embrionário durante o trânsito tubário em ratos wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com lapachol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.7, n.1, p. 25-37, 2005.

DE SOUZA, M. A. A.; DA SILVA, A. R.; FERREIRA, M. A.; DE LEMOS, M. J.; RAMOS, R. G.; FERREIRA, A. B. B.; DE SOUZA, S. R. Atividade Biológica do Lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. **Química Nova**, v.31, n.7, 2008.

DE SOUZA, M.A.A.; DA SILVA, A.R.; FERREIRA, M.A.; DE LEMOS, M.J.; RAMOS, R.G.; FERREIRA, A.B.B.; DE SOUZA, S. R. Activity biological of Derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 32-39, 2004.

DOENHOFF, M.J.; KUSSEL, J.R.; COLES, G.C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5 p.465-469, 2002.

DOLABELA, M.F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-Trypanossomacruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DONG, Y.; CHIN, S. F.; BLANCO, E.; BEY, E. A.; KABBANI, W.; XIE, X. J.; WILLIAM, G.; BORNMANN, D. A.; BOOTHMAN, GAO, J. Intratumoral Delivery

of B-Lapachone via Polymer Implants for Prostate Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n.1, p. 131-139, 2009.

DOS SANTOS, A. F.; FERRAZ, P.A.L.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.R.F.; GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and Derivatives. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1199-1202, 2000.

DOS SANTOS, E. V. M.; CARNEIRO, J. W. M.; FERREIRA, V. F. Quantitative structure-activity relationship in aziridiny-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2014.

DOS SANTOS, A.F.; FERRAZ, P.A.L.; DE ABREU, F.C.; CHIARI, E.; GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal and Trypanocidal activities of lapachol Derivatives. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 92-93, 2001.

DUARTE, D. S.; DOLABELA, M. F.; SALAS, C. E.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRAS, A. B.; NENNINGER, A.; WIEDEMANN, B.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.; LOPES, M. T. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p.347-352, 2000.

DUBIN, M.; VILLAMIL, S. H. F.; STOPPANI, A. O. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reaction by B-lapachone and related naphthoquinones. **Biochemical Pharmacology**, v.23, n.7, p. 1151-1160, 1990

DYNAMED, DynaMed Plus, Evidence-based content, EBSCO, 2017.

EL HAGE, S. A. M.; STIGLIANI, J. L.; MARJORIE, M.; VIAL, H.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; PAYARD, M. Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4778-82, 2009.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Reviews In Microbiology**, v.46, n. 1, p.695-729, 1992.

FAIRLAMB, A.H.; RIDLEY, R.G.; VIAL, H.J. Drugs against parasitic diseases. R&D methodologies and issues – Discoveries and drug development., 222p, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/drugs-against-diseases.pdf>>. Acessado em: 24 de julho de 2017.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J.; Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83–88, 1994.

FENWICK, A.; JOANNE, P. W. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n.6, p.577–582, 2006.

FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, N. R.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 509-15, 2003.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ANTUNES, C. M. F.; TAVARES, C. A. P.; CUNHAS, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletim of World Health Organization**, v. 81, n. 3, p. 190–196, 2003.

FERREIRA, E. P. R. **Planejamento, síntese e avaliação Leishmanicida de análogos do Lapachol em amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2016. 119 f. Qualificação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016

FERREIRA, J. G. **Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade contra a doença de Chagas**. 2008. 106 f. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008,.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, v. 5, 2004.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, A. B.; GUALBERTO, S. A.; VITOR, R. W. Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, *in vitro* and in murine models of infection. **Parasite**, v. 9, n. 3, p.261-269, 2002.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. **Revista Virtual de Química**. v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FESTOZO, V. E. **Uso de peptídeos sintéticos no estudo da proteína diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH)** 2013. 136 f. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, 2013.

FILHO-PARISE, R. P.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 2, p. 123-35, 2001.

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

GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C.; STOPPANI, A. O. Introduction of changes in the DNA of *Trypanosoma cruzi* by trypanocidal agents. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.16, n. 2, p. 75-86, 1984.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum anti-schistosomal agent. **Z Parasitenkd Journal**, v. 52, n. 2, p.129-50, 1977.

GOULART, M.O.F.; ZANI, C.L.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F.C.; RASLAN, D.S.; STARLING, S.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 15, p.2043-2048, 1997

GREVELDING, G. C. **Shistosoma**. Institute for Genetics, Heinrich-Heine-University, Dusseldorf, Germany. Magazine v. 545, 2004. Disponível em: <<http://scienceweek.com/2005/sb050121-5.htm>> Acesso em: 08 de julho de 2017.

GRYSSELS B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383-97, 2012.

GUERRA, M. O.; MAZONI, A. S. B.; BRANDÃO, M. A. F.; PETERS, V. M. Toxicology of Lapachol in rats: embryoletality. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p.171-174, 2001.

GUIMARÃES, M. A.; OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. M.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTO, P. L. S.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; MORAES, J.; LOLIĆ, A.; VERBIĆ, T.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic Activity *in vivo* of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 03, n. 3 p. 216-221, 2015.

GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C. F. R.; LANZA, J. S.; MELO, M. N.; DO MONTENETO, R. L.; DE MELO, I. M. M.; DIOGO, E. B. T.; FERREIRA, V. F.; CAMARAE, C. A.; VALENÇA, W. O.; DE OLIVEIRA, R. N.; FRÉZARD, F.; DA SILVA JÚNIOR, E.N. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and – resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel a- and nor-a lapachone based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 523-530, 2013.

GUISSE, F.; POLMAN, K.; STELMA, F. F. Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *Schistosoma mansoni* focus in Northern Senegal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 511–514, 1997.

HELMY, M. M. F.; MAHMOUD, S. S.; FAHMY, Z. H. *Schistosoma mansoni*: Effect of dietary zinc supplement on egg granuloma in Swiss mice treated with praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 310-317, 2009.

HIRSCHMANN, G.S. & PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug “TayiPytá” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). **Journal of Biosciences**, v. 58, n. 7-8, p. 495-50, 2003.

Hooker, S. C. Condensation of aldehydes with β -hydroxy- α -naphthoquinone. Synthesis of hydrolapachol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, n.7, p.1163- 1167, 1936.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018, 2007.

HUANG, L.; PARDEE, A. B. Beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 11, p. 711-20, 1999.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEND, I. R. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2, p.145-171, 2007.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L.F.; DAY, T. A.; BENNETT, J.L. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932–935, 1999.

ITO, C.; KATSUNO, S.; KONDO, Y.; TAN, H. T.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Avicennia alba*. Isolation and structural elucidation of new naphthoquinones and their analogues. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 3, p.339-43, 2000.

JAMES, C. E.; HUDSON, A. L.; DAVEY, M. W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? **Trends Parasitology**, v.25, p.328–35. 2009.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, R.; KANGWANRANGSAN, K. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongih* harboured in mice, **Parasitology International**, v. 54, n.3, p.177-183, 2005.

JORQUEIRA, A.; GOUVÊA, R.M.; FERREIRA, V.F.; DA SILVA, M.N.; DE SOUZA, M.C.B.V.; ZUMA, A.A.; CAVALCANTE, D.F.B.; ARAÚJO, H.P.; SANTOS, D.O.; BOURGUIGNON, S.C. Oxirane derivative of α -lapachone is a potent growth inhibitor of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 429–433, 2006.

KATZ N.; COUTO, F. F. B.; ARAUJO, N. Imatinib activity on *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 108, n. 7, p. 850-853, 2013.

KATZ, N. & ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 1, p. 3843, 2003.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13^a. ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2017.

KEISER, J.; CHOLLET, J.; XIAO, S.; MEI, J.; JIAO, P.; UTZINGER, R. G.; TANNER, M. Mefloquine Na Amino alcohol with Promising Antischistosomal Properties in Mice. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 1 p. 1-11, 2009.

KING, C.H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Tropical**, v. 113, n. 2, p. 95-104, 2010.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**,v.82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F.; Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochemical Pharmacology**,v. 60, n. 9, p. 1367-1379, 2000.

KUMAGAI, Y.; TSURUTANI, Y.; SHINYASHIKI, M.; TAKEDA, S. H.;NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scissionby NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 3, n. 4, p.245-250, 1997.

KUMI-DIAKA, J.; SADDLER-SHAWNETTE, S.; ALLER, A.; BROWN. Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: Therapeutic synergy in genistein and β -lapachone combination treatment. **Cancer Cell International**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2004.

KUNG, H. N.; CHIEN, C. L.; CHAU, G. Y.; DON, M. J.; LU, K. S.; CHAU, Y. P. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of beta-lapachone on endothelial cells in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 2, p. 522-32, 2007.

KUNTZ, A. N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SAYED, A. A.; CALIFF, L. L.; DESSOLIN, J.; ARNER, E. S. J.; WILLIAMS, D. L. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: Na Essential Parasite Enzymeand a Key Drug Target. **PLOS Medicine**. v. 206, n. 4, p. 1071-86, 2007.

LAGROTA, M. H.C. Atividade Antivirótica do Lapachol. **Revista de Microbiologia**,v. 14, n. 1, p. 21-26, 1983.

LAMBERTI, M. J.; VITTAR, N. B. R.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; RIVAROLA, V. A. Synergistic enhancement of antitumor effect of Lapachone by photo dynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine**, v. 20, n. 11, p. 1007-1012, 2013.

LAMBERTON, P. H. L. Adaptation and evolution of *Schistosoma spp* in response to chemotherapeutic pressure. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 937-948, 2005.

LEITE, O. H. M.; HIGAKI, Y.;SERPENTINI,S .L . P.;CARVALHO, S. A.; AMATO NETO, V.; TORRES, D. M. A.; DIAS, R; M. D. S.; CHIEFFI, P. P.Infecção por *Clonorchis Sinensis*em imigrantesasiáticos no Brasil: tratamento com praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo[online]**, v.31, n.6, p. 416-422, 1989.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.;PARDEE,A. B.Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22463-22468, 1993.

LI, C. J.; LI, Y. Z.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13369-13374, 1999.

LI, Y.; LI, C. J.; YU, D., PARDEE, A. B. Potent induction of apoptosis by b-lapachona in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, v.6, n.12, p. 1008-1015, 2000.

LIANG, Y.S.; WANG, W.; DAI, J. R.; LI, H. J.; TAO, Y. H.; ZHANG, J. F. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**. v. 84, n. 2, p. 202–207, 2010.

LIMA, C.S.A.; DE AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C.; DE ARAÚJO, C.F.; AGRA, M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA. Cytotoxic pyranonaphoquinones *Melloaquadrivalvis* (Bignoniaceae). **Natural Products Research**, v. 19, n. 3, p. 217-222, 2005.

LIMA, N. M. F.; DOS SANTOS, A. F.; PORFIRIO, Z.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*, **Acta Tropical**, v. 83, n.1, p, 43-47, 2003.

LIMA, N.M.F.; CORREIA, C.S.; LEON, L.L.;MACHADO, G.M.C.; MADEIRA, M.F.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antileishmanial activity of Lapachol analogues. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7 p. 757-761, 2004.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; BORBA, A.P.; MELLO, J.F. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXV. Obtenção de Xiloidona (Desidrolapachona) por transformação de Lapachol em presença de piridina, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cerne Pau d'Arco roxo, *Tabebuia avellanedae* Lor. ExGriseb. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 6, n. 1/2, p.23-34,1962a.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DE LIMA, C. G.; MAIA, M. H. D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX. Atividade antimicrobiana de alguns derivados do Lapachol em comparação com a xiloidona, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cerne do Pau d'arco roxo, *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.4, n. 1/2, p. 3-17,1962b.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DE LIMA, G. C.; MACHADO, M. P. Primeiras Observações sobre a Ação Antimicrobiana do Lapachol. **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco**,v. 14, n.1/2, p. 129-135,1956.

LIMA, O. G.; DE COELHO, J. S. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; DE MELLO, J. F.; MARTINS, D. G.; LACERDA, A. L.; DE SOUZA, M. A.. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXV. Atividade antimicrobiana e antitumoral de Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) em comparação com o Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona). **Revista do instituto de Antibióticos**, v. 11, n. 1, p. 21-26,1971.

LIMA, O. G.; MACIEL, G.M.; DE OLIVEIRA, L.L.; LACERDA, A.L.; MOREIRA, L.C.; MARTINS, D.G. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXVII. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)- 1,4-naftoquinona) e Plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) e Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 12. n.1/2, p.3-12,1972.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B. D. C.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5 p. 1197–1201, 2009.

MANNECK, T.; HAGGEN, Y M .; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomul and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n.1, p.85-98, 2010

MARQUES, A. C. Manual de Terapêutica da Malária. In: **Manual de Terapêutica da Malária**. Ministérios da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2001.

MEDINA, L. F. D. C. Avaliação das atividades bioquímicas e genotóxicas de aminonaftoquinonas. 2006, 86f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. 2006.

MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H. On the Nature of the Proglottids of Cestodes: A Light and Electron Microscopic Study on *Taenia*, *Hymenolepis*, and *Echinococcus*. **Z Parasitenkd**, V.65, n.3, p.243-259, 1981.

MICROMEDEX, Micromedex, Truven Health Analytics, 2017.

MILAN, E.P. & KEIM, L. S. Esquistossomíase mansônica. In:

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v.84, n.4 p. 407-412, 1993.

MIRANDA, M. A.; MAGALHÃES, L. G.; TIOSSI, R. F. J.; KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L. G. R.; RODRIGUES, V.; MCCHESENEY, J. D.; BASTOS, J. K. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology Research**, v.111, n. 1, p.257-262, 2012.

MONKS, T. J.; HANZLIK, R. P.; COHEN, G. M.; ROSS, D.; GRAHAM, D. G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 112, n. 1, p. 2-16, 1992

MOON, D. O.; CHOI, Y. H.; KIM, N. D.; PARK, Y. M.; KIM, G. Y. Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 506-514, 2007.

- MOREIRA, D. R.; DE SÁ, M. S.; MACEDO, T. S.; MENEZES, M. N.; REYS, J. R.; SANTANA, A. E.; SILVA, T.L.; MAIA, G. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CAMARA, C. A.; DA SILVA, T. M.; DA SILVA, K. N.; GUIMARAES, E. T.; DOS SANTOS, R. R.; GOULART, M. O.; SOARES, M. B. Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potente and selective antiplasmodium agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n.4, p.615-621, 2015.
- MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J.; COONEY, D. A. Oral toxicology studies with Lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.17, n.1, p.1-11, 1970.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetry 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.
- MULLER, K.; ANDREAS SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential Antipsoriatic Agents: Lapachol Compounds as Potent Inhibitors of HaCaT Cell Growth. **Journal of Natural Products**, v.62, n. 8, p.1134-1136, 1999.
- MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R.D.; KRAUTH-SIEGEL, L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitology**, v. 19, n.7, p.320,328, 2003.
- MURRAY, M. T.; PIZZORNO, J. E. **Encyclopedia of natural medicine** 2nd ed. PA4 Rocklin, CA: Prima Pub., p. 967-972, 1998.
- NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNMANN, W. G.; BOOTHMAN, D.A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of h-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.10, p.1626-33, 2003.
- NAYAK, P. K.; MOLINS, D.; CARLETON, F. J.; MORRISON, R. K. Absorption Tissue distribution and excretion of lapachol in animals. **Proceedings of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 1, p.1774,1968.
- NIH. National Institutes of Health. Mefloquine clinicaltrials.gov (NCT01132248), Rockville, USA, 2013. Disponível em: Acesso em: 15 ago. 2013.
- NIH. National Institutes of Health. Mirazid clinicaltrials.gov (NCT01529710), Rockville, USA, 2012a. Disponível em: Acesso em: 15 ago. 2013.
- OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M. MESQUITA, A.A.L. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, v.13, n.4, p. 302-307, 1990.
- OLIVEIRA, R. B.; ZANI, C. L.; FERREIRA, R. S.; LEITE, R.S.; ALVES, T. M. A. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

OSSOWSKI, T. P.; PIPKA, A.; LIWO, D. J. Electrochemical and UV spectrophotometric study of oxygen and superoxide anion radical interaction with anthraquinone derivatives and their radical anions, **Electrochimica Acta**, v. 45, n.21, p.3581-3587, 2000.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLEN, J. J. Efficacy of β -Lapachone in Pancreatic Cancer Treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v.4, n.1, p.95-102, 2005.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLEN, J. J.; Efficacy of h-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biology & Therapy**, v.4, n.1, p.102-109, 2004.

PARK, E. J.; MIN, K.J.; LEE, T.J.; YOO, Y. H.; KIM, Y.S.; KWON, T. K. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 5, e1230, 2014.

PATERNO, E. Ricerche sull'acido lapacico, **Gazzetta chimica italiana**, v.12, p. 337-392, 1882.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Advances in Parasitology**, v.6, p.233-290, 1968.

PERCÁRIO, S.; VITAL, A.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeído. **NewsLab**, v. 2, n 6, p. 46-50, 1994.

PERES, R. S.; SANTOS, G. B.; CECILIO, N. T.; JABOR, V. A. P.; NIEHUES, M. TORRES, M. G. S. BUQUI, G.; SILVA, C. H. T. P.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P.; NONATO, M. C.; RAMALHO, F. S.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; EMERY, F. S.; ALVES-FILHO, J. C. Lapachol, a compound target in pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.19, n.1, p.47, 2017.

PÉREZ-SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; YAPU, D. G.; TURBA, A. G. Antiplasmodial Activity of Naphthoquinones Related to Lapachol and β -Lapachone. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n.2, p. 264-274, 2005.

PETERS, L.; BUEDING, E.; WAITE, J. F. Effect of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone on Glycolysis of *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 64, n. 1 p. 111-113, 1947.

Pimenta, V. S. C. **Propriedades Citotóxicas da β -Lapachona em Células de Osteossarcoma Canino in vitro**. 2001, 83f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C. VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase activity is the principal

determinant of β -lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5416-5424, 2000.

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -Lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, N. 8, p. 5416–5424, 2000.

PINTO, A. V.; CASTRO, E. S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n.11, p. 4570- 4590, 2009.

PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S. M.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D. T.; HUTSON, P. CHURCH, D. R.; WILDING, G. BOOTHMAN, D. A. β -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. **Cancer Research**, v. 55, n. 17, p.3706-3711, 1995.

PRATA, A. Esquistossomose Mansonii. In: VERONESI, R.; VERONESI, F. R. Tratado de infectologia. 3ª ed. São Paulo: **Atheneu**; p. 1695-1720, 2007.

QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVE, A. Pseudo and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v, 59, p. 438-440, 1996.

RAMACHANDRAN, S.; RAJASEKARAN, A.; KUMAR K. T. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic potential of methanolic extract of *Tectona grandis* flowers. **Asian Pac Journal of Tropical Biomedicine**. V. 1, n. 2, p. S155-158, 2011.

RAMALHETE, C.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; MULHOVO, S.; DA SILVA FILHO, A. A.; FERREIRA, M. J. In vitro schistosomicidal activity of balsamifol F and karavilagenin C. **Planta Medica**, v. 78, n.18, p. 1-6, 2012.

RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; FIGUEIREDO, E. A.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. **Experimental Parasitology**, v.36, n.3, p. 360-72, 1974.

RAMIREZ, B.; BIQUE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M. A., NWAKA, S. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v.2, n. 1, p. 53–61, 2007.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, n. 10, p. 2952-1954, 1968.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of h-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.8, p.3055-3064, 2005.

ROCHA, J. A. **Variabilidade genética e avaliação anti-schistosoma dos alcaloides pilosina, episopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (Pilocarpus microphyllus Stapfex Wardlew.)**. 2013. 145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

ROCHA, M. N.; NOGUEIRA, P. M.; DEMICHELI, C.; DE OLIVEIRA, L. G.; DA SILVA, M. M.; FRÉZARD, F.; MELO, M. N.; SOARES, R. P.; Cytotoxicity and *in vitro* Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2013, n. 7, p. 2013.

SÁ, R. C. S.; GUERRA, M. O. Reproductive toxicity of lapachol in adult male Wistar rats submitted to short-term treatment. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 7, p. 658-662, 2007.

SACAU, E. P.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-barr virus activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 483-488, 2003

SAGRERO-NIEVES, L. Isolation of lapachol from *Diphy sarobinooides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 3, p.547,1986.

SAIZARBITORIA, C. T.; ANDERSON, J.; E, ALFONSO, D.; MCLAUGHLIN. J. L.; Bioactive Furonaphtoquinone from *Tabebuia Barbata*, (Bginoniaceae). **Acta Científica Venezolana**, v.48, n.1, p. 42-46, 1997.

SALAS, C; TAPIA, R.A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, J.D.; MORELLO, A. *Trypanosomacruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.2, p. 668-74, 2008.

SALES, D. M.; SANTOS, J. E. M.; SHIGUEOKA, D. C.; LEÃO, A. R. S.; NETO, R. C.; BORGES, D. R.; D'IPPOLITO, G.; SZEJNFELD, J. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, v.42, n. 5, p.277-282, 2009.

SANTANA, C. F.; LINS, L. J. P.; ASFORA, J. J.; MELO, A. M.; LIMA, G.; D'ALBUQUERQUE, I. L. P. Primeiras observações com emprego do lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos**. v. 1, p.20-61, 1980.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A.; DE ABREU, F. C.; CHIARI, E.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Medica**, v.67, n.1, p. 92-93, 2001.

SANTOS, E. A. Estudo da atividade citotóxica da alfa-lapachona e seu derivado tetrahidropirano. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

SANTOS, R. F. E. P.; CONSERVA, L.; BASTOS, M.; CAMPESATTO, E. Avaliação do potencial biológico da Tabebuia áurea (Silva Manso) como fonte de moléculas bioativas para atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1159-1168, 2015.

SAÚDE-GUIMARAES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosomacruzi*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.17, n.3, p.455-465, 2007

SAVIOLI, L.; ALBONICO, M.; BEACH, M. J.; CHWAYA, H. M.; CROMPTON, D. W.; DUNNE, J.; EHRENBERG, J. P.; GYORKOS, T.; KVALSVIG, J.; TAYLOR, M. G.; URBANI Z, Z. F. Treatment for intestinal helminth infection. Review needed to take account of all relevant evidence, not only effects on growth and cognitive performance. **British Medical Journal**. v. 321, n. 7270, p.1226, 2000.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v.14, n.4, p.407-412, 2008.

SCHUCK, D. C.; FERREIRA, S. B.; CRUZ, L. N.; DA ROCHA, D. R, MORAES, M, NAKABASHI, M.; ROSENTHAL, P. J.; FERREIRA, V. F.; GARCIA, C. R. Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. **Malaria Journal**, v.12, n.1, p. 234-239, 2013.

SHAOHONG, L. I.; KUMAGAI, T.; QUINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitology International**, v. 55, n. 1, p. 63–68, 2006.

SHETGIRI, N. P.; KOKITKAR, S. V.; SAWANT, S. N. *Raderma cheraxylocarpa*: the highly efficient source of lapachol and synthesis of its derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 58, n.2, p. 133-135, 2001.

SHUHUA, X.; BINGGUI, S.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Ultrastructural Alterations in Adult *Schistosoma mansoni* Caused by Artemether. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.5, p. 717-724, 2002.

SILVA, A. M. P.; DE PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C.; Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, p. 207-215, 2012a.

SILVA, K. E. R.; SILVA, R. M. F.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; ROLIM-NETO, P. J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012b.

SILVA, T. M., CAMARA, C. A, BARBOSA, T. P, SOARES, A. Z, DA CUNHA, L. C, PINTO, A. C, VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 193-196, 2005.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDENCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R.; BARBOSA, A. L.; MEDEIROS, J. V. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of epiisopiloturine, na Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**. v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SIMÕES, M. C. M. **Detecção de polimorfismo de base única em etiquetas de sequências expressas de *Schistosoma mansoni***. 2005, 156f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, 2005.

SOUZA, F. P. C, VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; DE FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n.4, p.300-307, 2011.

SOUZA, N. B.; DE ANDRADE, I. M.; CARNEIRO, P. F.; JARDIM, G. A.; DE MELO.; I. M. M.; SILVA JÚNIOR, E. N.; KRETTLI, A. K.; Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malária studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n.5, p. 546-562, 2014.

SOUZA, V.C.; ANDRADE, L.A.; BRUNO, R.L.A.; CUNHA, A.O.; SOUZA, A.P. Produção de mudas de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 26, n. 2, p. 98-108, 2005.

SRIVASTAVA, I. K.; HAGAI, R.; AKHIL, B. V. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7 p. 3961-3966, 1997.

STELMA, F.F.; TALLA, I.; SOW, S. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 2, p.167–170, 1995.

TAGLIARINO, C.; PINK, J. J.; DUBYAK, G. R.; NIEMINEN, A. L.; BOOTHMAN, D. A. Calcium is a key signaling molecule in h-lapachone-mediated cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.22, p.19150-19159, 2011.

TALLIMA, H.; RIDI, R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult wormact in, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 570–575, 2007.

TAVARES, W. MARINHO, L. A. C. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; p. 345-350. 2007.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA JR., J. C. R.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; AND POMPEU.M. M. L. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal Activity of 2- Hydroxy-3-

(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy Research**, v.15, n. 1, p.44-48, 2001.

TESSIER, A. M. V.; DELAVEAU, P.; CHAMPION, B. Lipophilic quinones of the trunk wood of *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 46, n. 1, p. 55-57, 1988.

TEWARI, A.; RAMAN, J. D.; CHANG, P.; RAO, S.; DIVINE, G.; MENON, M. Long-term survival probability in men with clinically localized prostate cancer treated either conservatively or with definitive treatment (radiotherapy or radical prostatectomy). **Urology**, v. 68, n. 61, p.268-274,2006

TONUCI, L. R. S.; DE MELO, N. I.; DIAS, H. J.; WAKABAYASHI, K. A. L.; AGUIAR, G. P.; AGUIAR, D. P.; MANTOVANI, A. L. L.; RAMOS, R. C.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; CUNHA, W. R.; DA SILVA FILHO, A. A, MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M. *In vitro* schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 88–93, 2012.

TUNES, L. G. **Investigação da Atividade e Mecanismos de Ação Leishmanicida e/ou Tripanocida de Produtos Naturais e um Derivado**. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Belo Horizonte, 2015.

UTZINGER, J. et al. Artemisinins for schistosomiasis and beyond. **Current opinion in investigational drugs**, v. 8, n. 2, p. 105–116, 2007.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D. M.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F, VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S BATISTA, M. C, LEITE, J. R, MORAES, J. Activity of Epiisopilo Turine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VIANNA, L. G., MACEDO, MELLO, P.; SOUZA, H. A. O.; COSTA, J. M. Tratamento da neurocisticercose com praziquantel. **Arquivos de Neuro Psiquiatria**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 425-430, 1990.

VILAMIL-FERNANDEZ, S.; STOPPANI, A. O. M.; DUBIN, M. Redox cycling of β -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. **Methods Enzymol**, v.378, p. 67-87, 2004.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A.; FERNANDES, R.V. Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do líber do pau d'arco rôxo (*Tabebuia avellanedae*) em pacientes portadoras de cervicites e cérvico-vaginítes. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.10, n. 1 e 2, p. 41- 46, 1970.

WENDEL. W. B. The influence of naphthoquinones upon the respiratory and carbohydrate metabolism of malarial parasites. **Federation proceedings Journal**, v. 5, n. 3, p. 406, 1946

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Media Centre, Shistosomiasis, Updated February, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>

WOO, H. J.; PARK, K. Y.; RHU, C. H.; LEE, W. H.; CHOI, B. T.; KIM, G. Y.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. J. Beta-lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **Journal of Medicinal Food**, v. 2, n. 9, p.161-168, 2006.

WUERZBERGER, S. M.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; BYERS, K. L.; BORNMANN, W. G.; Boothman, D. A. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. **Cancer Research**, v. 58, n. 9, p.1876-1885, 1998.

ZHOU, J.; DUAN, L.; CHEN, H.; REN, X.; ZHANG, Z.; ZHOU, F; LIU, J.; PEI, D.; DING, K. Atovaquone derivatives as potente cytotoxic and apoptosisinducing agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**.v. 9, n. 17, p. 5091-5094, 2009.

ANEXOS

CEUA



CERTIFICADO nº 18/2017

Certificamos que a proposta intitulada “**Atividade esquistossomícida de plantas utilizadas na medicina tradicional amazônica**”, protocolo nº 04/2017, sob a responsabilidade de **Maria Fâni Dolabela**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Vigência	01/01/2017 a 01/09/2021
Espécie/Linhagem	Camundongo/BALB/c
Nº de animais	252
Peso/Idade	20 a 22g / 6 a 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério do IEC


De acordo com Orientação Técnica nº 8, de 18 de março de 2016 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 15 de maio de 2017.


Ana Cláudia M. de Oliveira
CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS
Secretaria de Apoio aos Centros de Referência em Saúde Pública do Instituto Evandro Chagas/IEC/SVS/MS
Méd. 1988/14
Municipal de Oliveira


Livia Medeiros Neves Casseb
Coordenadora da CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS