



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº PI 0817954-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 0817954-9

**(22) Data do Depósito:** 14/08/2008

**(43) Data da Publicação Nacional:** 11/01/2011

**(51) Classificação Internacional:** A61K 31/351; A61P 33/02.

**(54) Título:** USO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-Y-PIRONA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO DO MACRÓFAGO NO COMBATE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Av. Augusto Corrêa, Nº01, Guamá, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075-900

**(72) Inventor:** JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO; CLÁUDIO NAUM ALVES; ANA PAULA DRUMOND RODRIGUES; ANTÔNIO SÉRGIO COSTA CARVALHO; ALBERDAN SILVA SANTOS; EDILENE OLIVEIRA DA SILVA.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 14/08/2008, observadas as condições legais

**Expedida em:** 25/05/2021

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## Relatório descritivo

### **Uso do 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona como agente de ativação do macrófago no combate da Leishmaniose Cutânea**

5

A presente patente refere-se ao uso do 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona (HMP) como leshmanicida e que atua como agente de estimulação da atividade microbicida do macrófago no combate da Leishmaniose Cutânea (LC) causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Investigação sistemática realizada com o HMP *in vitro* no combate à infecção de células hospedeiras pelo parasito, apresentou um resultado que tem como principal mecanismo de ação a ativação microbicida destas células que são ativadas pelo HMP, aumentando a produção de radicais de oxigênio, aumento da quantidade de lisossomos, aumento de filamentos de actina e microtúbulos e aumento do espriamento característico do estado de ativação dessas células, eliminando o agente da infecção. Esta ação sobre a célula hospedeira e no protozoário foi observada pela primeira vez em nossos laboratórios, através do uso do HMP com métodos experimentais aqui descritos, não havendo na literatura qualquer relato destes procedimentos.

A Leishmaniose é uma doença que acomete cerca de 2 milhões de pessoas no mundo, e é uma das seis doenças tropicais de maior relevância mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as Leishmanioses afetam 88 países, dentre os quais 72 são classificados como países em desenvolvimento (WHO. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease information. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Último acesso em: 18/04/2007).

Nas Américas são conhecidas, atualmente, 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadora de doença humana e oito espécies descritas em animais. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, das quais seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As espécies mais conhecidas são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. No Brasil, a partir da década de 80, verificou-se um aumento de casos registrados, contabilizados 3000 casos em 1980 e subiu para 37.710 casos em 2001. Os dados apontam que na região Norte foi observada uma densidade de 552 casos por 10.000 habitantes, especialmente na Grande região do Tucuruí que envolve os estados do Pará, Maranhão e Tocantins (Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância da Saúde. Manual de

35

Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Editora MS, 2ª Ed., 2007).

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário flagelado, que possui caráter zoonótico e é transmitida através de um vetor, e que tem como principal profilaxia o controle do hospedeiro invertebrado e dos reservatórios. Esta é uma das doenças que tem cura quando diagnosticada a tempo: O medicamento de primeira escolha para tratamento da LC são os antimoniais pentavalentes descritos pela patente US1984480, 1934; são utilizados desde 1945 e administrados por via intraperitoneal, mas que apresentam efeitos colaterais como mialgia, náusea, vômito, dor abdominal e febre. O tratamento de segunda escolha são as injeções intramusculares de pentamidinas e injeções intravenosas de anfotericinas descritas na patente US2908611, 1959; entretanto ambas também têm demonstrado efeitos adversos como náuseas, dor no local da injeção, sintomas cardiorrespiratórios, febre e anemia (Lima, E. B., Porto, C.; Mota, J. O. C.; Sampaio, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. **82**(2):111-24, 2007; Amato, V.S.; Tuon, F. F.; Bacha H.A. Neto, V.A.; Nicodemo, A. C. Review - Mucosal leishmaniosis Current Scenario and Prospects for Treatment. *Acta Tropica* **105**, 1–9, 2008). Outros medicamentos também são aplicados no controle da Leishmaniose cutânea, como o antibiótico Paromomicina descrito na patente EP0435915, 1993; que é administrado por via parenteral desde a década de 60, o qual é combinado com sais, uréia ou gentamicina em concentrações adequadas de acordo com a espécie invasora. Entretanto a utilização da paromomicina em novas vias de administração vêm sendo desenvolvida, como formulação em emulsão para uso tópico (US6284739, 2001).

A miltefosina descrita pela patente EP1051159, 2002 é outro medicamento que está sendo amplamente estudado como o primeiro tratamento oral efetivo no combate a Leishmaniose visceral, e que se encontra na fase VI de testes em humanos na Índia. As anfotericinas B também vêm sendo submetidas a uma série de estudos visando a diminuição dos efeitos adversos, através da utilização de lipossomas contendo anfotericina (US5965156, 1999). Além dos medicamentos sintéticos, existem outras substâncias naturais que têm demonstrado grande potencial terapêutico e leishmanicida, como os alcalóides, terpenos, flavonóides, esteróides, entre outros, provenientes de mais de 101 plantas encontradas, principalmente, na Bolívia, Colômbia, Brasil, Venezuela e Índia (Rocha, L.G.; Almeida, J.R.G.S.; Macedo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M. A review of Natural Products With Antileishmanial Activity. *Phytomedicine* **12**, 514–535, 2005),

porém substâncias isoladas de plantas apresentam pequenas concentrações de seus princípios ativos, além de se levar em consideração o fator da sazonalidade, e que em muitos casos, é um fator limitante para a produção contínua destes metabólitos em escala comercial.

5 No Brasil, o tratamento da leishmaniose segue os padrões estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que determina a utilização de antimoniais pentavalentes como primeira escolha no tratamento, seguido da anfotericina B, pentamidinas. Algumas substâncias naturais também têm sido objetos de pesquisa no Brasil para combater a leishmaniose cutânea, como óleos essenciais ricos em Linalol ou  
 10 Eugenol, provenientes de plantas das espécies *Croton cajucara* e *Ocimum gratissimu*, respectivamente (Rosa, M. S. S. *et al.* Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1895–1901. June 2003). Além dos óleos essenciais, também estão sendo estudados alcalóides provenientes das espécies *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *G. australis* e *C.*  
 15 *ovalifolia* (Tempone , A.G. *et al.* Antiprotozoal Activity of Brazilian Plant Extracts from Isoquinoline Alkaloid-Producing Families. ***Phytomedicine***; (5):382-90. May, 2005). O extrato hidralcóolico proveniente da planta *Stachytarpheta cayennensis*, espécie utilizada popularmente no tratamento de LC (Moreira, R.C.R. *et al.* *In vitro* leishmanicidal effect of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), *Rev.*  
 20 *bras. farmacogn.* vol.17 no.1 João Pessoa Jan./Mar. 2007), e ainda, o extrato etanólico proveniente do própolis, que demonstrou eficácia também através da ativação da célula hospedeira (Ayress, D.C. *et al.* Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 102(2): 215-220, March 2007), têm sido alvos de investigações.

25 Outro produto natural bastante estudado é um medicamento homeopático, Canova, desenvolvido na Argentina e atualmente comercializado no Brasil, que desenvolveu atividade microbicida em células hospedeiras como macrófagos (Pereira, W.K. *et al.* Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection* 51, 157–164, 2005; Oliveira, C.C, *et al.*, *Journal of Infection*, 52, 420-432, 2006), porém este medicamento é  
 30 preparado como um composto e utiliza-se cinco espécies vegetais para sua produção, o que apresenta um fator limitante para a produção em larga escala.

A busca por agentes leishmanicida tem sido um grande desafio nos últimos anos, em função da doença ser considerada negligenciável e por haver pouco apelo

econômico. Neste sentido a busca de moléculas de fácil obtenção, que não dependam de sazonalidade, que não apresentem limitadores na sua produção, além de apresentarem um mecanismo eficiente de combate e que não causem reações adversas é o desejável para uma produção em larga escala com perspectivas comerciais. Neste contexto, o metabólito secundário produzido através de processo Biotecnológico por fungo filamentoso, como é o caso do HMP, apresenta todas estas características e é um candidato potencial para uso no combate da leishmaniose cutânea.

A descoberta do HMP foi realizada em 1907. Este metabólito secundário foi utilizado, inicialmente, como dietético, antioxidante, corante e mais tarde como preservativo. Atualmente, além de ser extensamente usado como um elemento aditivo em alimentos é também empregado em cosméticos como agente branqueador da pele. Também é extensamente usado em medicamento como uma droga antiinflamatória e o estudo de seus derivados tem sido direcionado para outros testes biológicos de interesse sócio-econômico.

Baseado na literatura revisada e discutido no recente trabalho de (Burdock, G. A.; Soni, M. G.; Cabin, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory and Pharmacology*. v. 33, p. 80-101, 2001.), o consumo do HMP a níveis, normalmente, encontrados nos alimentos não se faz presente uma preocupação para segurança da saúde humana. Esta conclusão também foi encontrada por Nohynek, G. J., et al. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one] *Food and Chemical Toxicology* 42, 93–105, 2004, em seus estudos de ação genotóxica, que apresentou resposta negativa para o HMP. Esta substância é um metabólico comumente produzido por muitas espécies de fungos pertencentes aos generos *Aspergillus*, *Acetobacter*, e *Penicillium* (Burdock, G. A.; Soni, M. G.; Cabin, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory and Pharmacology*. v. 33, p. 80-101, 2001), entretanto para a produção em escala comercial é necessário que a linhagem apresente potencial de produção, além de possuir habilidade de uso de fonte de carbono abundante, tal como a sacarose e a amilose ou amilopectina. Tolentino (1974) discute em detalhes a estrutura e a química do HMP. Esta é também conhecida pelo registro CAS No. 501-30-4 e tem a fórmula empírica  $C_6H_6O_4$  e peso molecular de  $142.109 \text{ g.mol}^{-1}$ . Cristaliza como agulhas prismáticas em acetona, etanol, e éter ou metanol e acetato de etila. O ponto de fusão é em torno de  $153\text{--}154^\circ\text{C}$  e tem  $pK_a$  estimado de 7.90 e 8.03. É livremente solúvel em água, etanol, ou acetona. No processo de obtenção do HMP, após completar a

fermentação, este pode ser recuperado por um dos métodos Físicos e Químicos seguintes: (1) precipitação como sal de cobre, (2) extração com acetato de etilo, (3) extração contínua com éter, (4) evaporação para um volume pequeno que conduz a cristalização ou cristalização à 0°C, (5) extração com clorofórmio, ou (6) absorção em carbono ativo seguido por eluição com acetato de butila saturado com amônia (Bajpai, P., Agrawala, D.K.; Vishwathan, L. kojic acid: synthesis and properties. *J. Sci. Ind. Res.* n. 41, p. 185-194, 1982).

A partir das informações obtidas na literatura não houve nenhum incidente informado do envenenamento em humano pelo HMP. Não há nenhum dado descritivo na literatura do processo de excreção do HMP pelo organismo humano. Porém, devido sua estrutura, provavelmente esta substancia apresenta uma rota relativamente simples de metabolismo muito semelhante ao das hexoses dietéticas (Burdock, G. A.; Soni, M. G.; Cabin, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory and Pharmacology.* v. 33, p. 80-101, 2001).

Atividades antibióticas dos derivados do HMP mostraram que o mesmo é ineficaz como antiprotozoanal quando testado contra *Trypanosoma cruzi*, *Tetrahymena pyriformis*, *Euglena gracilis*, e *Astasia chattoni* (Dobias, J., Balanova, J., Nemeč, P. Effect of kojic acid phenylosazone on *Trypanosoma cruzi*. *Biologia (Bratislava)* 35, 203–207, 1980). Estudos anteriores relataram em sua pesquisa que houve a inibição em bactérias de vários gêneros inclusive *Aerobacter*, *Bacilo*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Diplococcus*, *Escherichia*, *Gaffkya*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Vibrio* pelo HMP, este resultado é muito promissor para desenvolvimento de novos derivados mais potentes com atividade antibacteriano.

Na literatura encontram-se diversos artigos relacionados ao estudo da toxicidade subcrônica, crônica e carcinogênica do HMP (Giroir, L. E., et al. The individual and combined toxicity of kojic acid and aflatoxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 70, 1351–1356, 1991; Giroir, L. E., et al. Toxic effects of kojic acid in the diet of male broilers. *Poult. Sci.* 70, 499–503, 1991; Fujimoto, N., et al. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N × C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem. Toxicol.* 36, 697–703, 1998. ; Kinoshita, R., Mycotoxins in fermented food. *Cancer Res.* 28, 2296–2311, 1968; Yamato, M., et al.. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. *J. Med. Chem.* 28, 1026–1031, 1985; Yamato, M., et al. Synthesis and

antitumor activity of tropolone derivatives. *J. Med. Chem.* 30, 117–120, 1987). Estes autores apresentam conclusões sobre o teor de HMP quantificados em diversos tipos de animais e o potencial sinérgico das aflatoxinas que esta substância apresenta quando administrada em grama de HMP por kg de alimento durante um período de tempo estabelecido. Não se tem informação na literatura sobre a toxicidade aguda que resulta de uma única dose oral do HMP em humanos, mas, convulsões podem acontecer se o HMP for injetado em quantidades críticas (Hewitt, S. D., et al. Investigation of the anti-inflammatory properties of hydroxypyridinones. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 382–388, 1989).

Nohynek et al. (2004) verificaram o risco do consumo do HMP no uso geral, tanto em alimentos quanto em produtos para pele, e concluíram que esta substância nas doses consumidas, não apresentam efeitos genotóxicos ou tóxicos, assim não apresentam nenhum risco ao uso desta substância em doses de 0,03 – 0,06 mg/Kg/dia, o que elimina os riscos de toxicidade desta substância. Em um dos seus estudos Hewitt et al. (1989) buscou determinar os efeitos de antiinflamatório do HMP em ratos. Neles foram injetados soluções com quelantes, incluído o HMP. Os animais foram sacrificados após 1h, em seguida foram dissecados para análise dos quelantes na pele abdominal subcutânea. Os teores dos quelantes foram avaliados e comparados, assim, verificou-se que o HMP não teve influência nas características agressivas aos organismos. Concluíram, que esta substância é menos lipofílica devido apresentar grupos hidroxilas, então, ele pode ser menos tóxico e conseqüentemente de maior utilidade na área de saúde.

Os estudos de Yamato et al. (1985), que testaram a atividade antitumoral do HMP contra leucemia P388 em ratos, mostram indicativos positivos de atividade antitumoral. Subseqüentemente, Yamato et al. (1987) na tentativa de abaixar as quantidades das doses do HMP administradas em diluições com mais da quarta parte, ainda assim, encontraram atividade antitumoral para esta substância. Os efeitos de embriotoxicidade e teratogenicidade do HMP, analisados em ratos, foi objeto de estudo de Choudhary, D. N., Sahay, G. R., Singh, J. N. Antifertility and cannibalistic properties of some mycotoxins in albino rats. *J. Food Sci. Technol. (Mysore)* 31, 497–499, 1994.

Os resultados deste estudo indicaram que o HMP não apresentou nenhum efeito teratogênico. Mas, relata que nenhuma conclusão definitiva, até o presente momento, foi alcançada sobre os efeitos embriotoxicidade. Os resultados do efeito de metagêneses ainda não são conclusivos. A administração contínua de altas doses do HMP em ratos

resultou na indução de adenomas tireóide em ambos os sexos. Esta substância afeta diretamente a função da tireóide, principalmente, inibindo absorção de iodo, conduzindo diminuições em T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> e aumenta em TSH, aumentando TSH de glândula pituitária estimula da tireóide em troca de hiperplasia. Várias linhas de evidência indicam que a  
5 ação proliferativa causada pelo HMP na tiróide não está relacionado com a genotoxicidade desta substância (Fujimoto *et al.*, 1999), e sim com o potencial quelante da gama-pirona.

Há evidência na literatura do efeito de mutagenicidade em bactérias com resultados positivos para bacilos (Manabe, M., et al. The capabilities of the *Aspergillus*  
10 *flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid. *Rep. Natl. Food Res. Inst.* 38, 115–120, (1981) e Salmonelas (Wehner, F. C., et al. Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutat. Res.* 58, 193–204, 1978; Wei, C. I., et al. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.* 59, 213–220, 1991; Bjeldanes, L. F., Chew, H. Mutagenicity of 1,2-dicarbonyl compounds: Maltol,  
15 kojic acid, diacetyl and related substances. *Mutat. Res.* 67, 367–371, 1979). Bhat, R., Hadí, S. M.. Photoinduction of strand scissions in DNA by kojic acid: Role of transition metal ions and oxygen free radical intermediates in the reaction. *Mutagenesis* 7, 119–124, 1992, informaram que o HMP na presença de oxigênio molecular e luz visível influenciam diretamente nas alterações no DNA destes microrganismos. A degradação  
20 foi aumentada na presença de Fe(III), Fe(II), e Cu(II). Cotellessa *et al.* (1999) avaliaram a eficácia da mistura do ácido tricloro-acético, ácido glicólico e o HMP no tratamento da hiperpigmentação cutânea. Os autores concluíram que a adição do HMP melhorou o tratamento da melasma. Resultados semelhantes também foram encontrados por Lim (1999).

25 Diversas patentes foram submetidas visando ajustar e melhorar as propriedades deste metabólito, JP 54-92632A, JP 56-77272A, JP 60-7961B e JP 60-9722B, assim como a incorporação de mono ou di-ésteres de ácidos graxos, obtendo-se melhoria na atividade de inibição da tyrosinase. Neste mesmo sentido as patentes JP 3-14508A, JP 4-145096A, JP 4-187618A e JP 5-39298A propuseram várias modificações na estrutura  
30 original, obtendo-se derivados para inibir a tyrosinase. Tanto a estrutura glicosilada quanto amino-protetora foram desenvolvidas, assim como para aumentar o potencial de clareamento da pele JP 62-3820B, JP 64-83008A, JP 1-121205A e JP 2-028105A.

A atividade do HMP sobre parasitos foi descrita apenas em um trabalho, onde o metabólito inibiu a ação das tirosinases 1 e 2 presentes em ovos de *Schistosoma mansoni*, evitando a progressão do ciclo desse helminto (Fitzpatrick, J. M. Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases *FASEB J.* 2007 21: 823-835). Entretanto, ainda não foi demonstrado qualquer efeito deste metabólito sobre protozoários, especialmente em espécies de *Leishmania* ou na célula hospedeira.

**Metodologia de Obtenção do metabólito:** Para a produção do HMP em escala de bancada são utilizados frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400mL de meio de cultura Czapeck e 6% m/v de sacarose, devidamente esterilizados a 121°C por 15 min. Após o meio atingir temperatura de 30°C, adiciona-se 5 mL da suspensão dos esporos (como inóculo). Os frascos são colocados em incubadora com agitação fixada em 120 rpm e temperatura mantida em 28 °C. A fase líquida obtida do meio de cultura é submetida à filtração e em seguida à liofilização para obtenção do material bruto concentrado. O conteúdo é transferido para frascos de 1000 mL, onde se adiciona etanol:água 80:20. São realizadas extrações consecutivas e os extraídos são reunidos e concentrados por evaporação. O produto é obtido por cristalização. A pureza é avaliada por CLAE, caso haja pureza menor que 90% nova cristalização é realizada para obtenção de um produto com pureza acima de 95%.

**Cultivo da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e da célula hospedeira:** Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* são obtidas em meio NNN e transferidas para meio líquido RPM I640 suplementado com 10% de soro bovino fetal para crescimento. Macrófagos peritoneais são obtidos a partir do peritônio de camundongos e são mantidos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal.

**Análise morfológica e da viabilidade celular:** Inicialmente é feita a análise morfológica das células hospedeiras tratadas com o metabólito nas concentrações 10, 20 e 50 µg/mL diluído em meio DMEM através da microscopia óptica de luz, microscopia óptica de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão e a análise da viabilidade através dos métodos *Thiazolyl Blue* (MTT) e Vermelho neutro (VN).

**Análise da atividade microbica:** Posteriormente, é feita a análise da atividade microbica da célula hospedeira, onde são cultivadas, infectadas ou não com *Leishmania (L.) amazonensis*, e tratadas com as concentrações do metabólito citadas anteriormente.

**Resultados:** Através das técnicas de microscopia eletrônica foi possível observar em células tratadas com 20 e 50 µg/mL de AK o aumento na quantidade de vacúolos, aumento do tamanho celular, polimerização de filamento de actina com favorecimento do espraçamento celular e formação de inúmeros filopódios sem que fosse observadas alterações morfológicas nas organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo. Foi observado, também um aumento na quantidade de retículo endoplasmático na célula tratada com 50 µg/mL do metabólito HMP. Em ambos os ensaios de citotoxicidade não foram detectadas alterações significativas nas células hospedeiras tratadas com 10, 20 e 50 µg/mL, demonstrando que a substancia não afeta a integridade das mesmas, inclusive quando utilizada em doses excessivas como 600 µg/mL. Além disso, após a realização do ensaio VN foi observado um aumento na absorvância, indicando um aumento na quantidade de lisossomos em células tratadas, principalmente nas concentrações de 20 e 50 µg/mL. A análise da atividade microbicida foi realizada através da produção de radicais superóxidos, tóxicos ao parasito, o que foi possível observar a produção desses radicais, principalmente em células não infectadas ou tratadas com 50 µg/mL da substancia. Também foi detectada essa ativação em macrófagos tratados com 50 µg/mL do HMP, e infectadas com o parasito *L. amazonensis*, que tem como mecanismo de escape característico a inibição dos radicais superóxidos. A análise do índice endocítico desses parasitos também foi realizada, sendo observada a inibição da proliferação do parasito, em macrófagos infectados e tratados com 50 µg/mL, tanto da forma promastigota quanto da forma amastigota, com uma inibição de 68% e 79%, respectivamente.

O controle da doença somente é possível através da ativação das células hospedeiras contra os mecanismos de escape do parasito. Sendo assim, o uso de HMP, na concentração mínima de 50 µg/mL, demonstrou estar envolvido na atividade leishmanicida, principalmente através da ativação da resposta microbicida da célula hospedeira. Com base nos resultados experimentais obtidos, acredita-se e ressalta-se que o HMP se apresenta como um candidato de grande potencial no combate da leishmaniose cutânea. Os aspectos biotecnológicos de produção e a facilidade de ser produzido através de um substrato de fácil acesso, além da tecnologia disponível para a produção do HMP e suas características bioquímicas de isenção de reações laterais, permitem apontar para a produção comercial do HMP como um agente no combate da LC de última geração com vantagens muito superiores aos medicamentos já existentes no mercado para o combate da LC.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona **caracterizado por** ser na preparação de um medicamento para tratar leishmaniose cutânea.
2. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** ser incorporado integralmente em preparados (pomadas, géis, loções, tónicos ou outros veículos de aplicações tópicas).
3. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser disperso em carreadores que facilitem sua dispersão e penetração na pele e possam atuar com agente de combate à leishmaniose cutânea.
4. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por**, ser com atuação na resposta microbicidada célula hospedeira (macrófago).
5. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** potencialização da resposta do macrófago e neutrófilo contra a leishmaniose cutânea.
6. Uso do produto 5-hidroxi,2-hidroximetil-gama-pirona, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** mecanismo de atuação no macrófago que elimina o protozoário frente a atividade da molécula descrita.