UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções
determinadas por tripanosomatídeos**

Júnior Furini

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções
determinadas por tripanosomatídeos**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientado: Júnior Furini

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Furini, Júnior

Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos. Ribeirão Preto, 2016.

145 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio

1. Doença de Chagas. 2. Leishmaniose. 3. Ácido ursólico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Júnior Furini

Título do trabalho: Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, **Evanir Furini e Cássia Augusta Costa Furini**, que me ensinam com seus gestos, todos os dias, o significado do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que esteve sempre comigo, dando-me saúde e coragem para levantar, todos os dias, e ir à luta em busca de tantos milagres que Ele realizou neste tempo.

Aos meus pais Evanir Furini e Cássia Augusta Costa Furini, e a minha irmã, Gabriela Costa Furini, por serem o porto seguro, a paz e o aconchego. Pelo suporte irrestrito e constante. Obrigado pelo incentivo e pelo exemplo de nobreza que quero seguir e espero com esse trabalho, orgulhá-los. Minha eterna gratidão.

Ao amor da minha vida, Marília Melo Andrade. São tantos os motivos para agradecê-la que não existem palavras suficientes para fazê-lo. Pela parceria, pela companhia, pela paciência e principalmente pelo sonho sonhado junto comigo. Eu não conseguiria sem você. Muito obrigado, amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pela honra de poder ter sido seu aluno desde a iniciação científica, e por ter me dado tão valioso exemplo de profissional. Por sua amizade e confiança, me dando essa oportunidade, mesmo com todos os meus limites. Minha mais profunda admiração e respeito.

Aos docentes do laboratório de Parasitologia, Ana Amélia Carraro Abrahão e José Clóvis do Prado Júnior pelos ensinamentos transmitidos, especialmente durante a realização do estágio PAE.

A todos os funcionários do laboratório de Parasitologia, especialmente Cristiana Gonçalves Rotta, pela paciência, disponibilidade e o essencial apoio em todas as técnicas, e Georgius Luiz de Oliveira pela amizade e ajuda com os animais.

A todos os pós-graduandos do laboratório de Parasitologia.

*Ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP, especialmente à Prof^a. Dr^a. **Juliana Maldonado Marchetti** e seus alunos de doutorado **Josimar de Oliveira Eloy** e **Juliana Palma Abriata Barcellos**, pela parceria e gentileza na produção da dispersão sólida utilizada no trabalho.*

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, por ter me acolhido desde a graduação, há 12 anos, e por ter se tornado minha segunda casa.

*A todos os funcionários da FCFRP-USP, especialmente **Amélia Regina Azevedo Aguená Albuquerque** e **Vânia Cláudia de Albuquerque**, pela amizade e solicitude. Também todos os funcionários da seção de Pós-Graduação, especialmente **Rosana L.S. Florêncio** e **Henrique Theodoro**, pela atenção e cordialidade.*

Aos camundongos Balb/c que foram utilizados neste trabalho e cooperaram enormemente em favor da ciência.

À CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos concedida.

*A todos meus amigos pessoais, que me ajudaram, com sua presença, a ter o fardo diminuído, sendo sempre vozes de incentivo. Dentre tantos, cito **Balta Minassian**, **Eduardo Henrique Castro Rezende** e **Leonardo Faggioni**, pela proximidade e cumplicidade. Obrigado irmãos!*

Finalmente a cada um dos meus alunos, que dão sentido aos meus estudos e me fazem ouvir a voz em meu interior me indicando o caminho da docência.

“Desistir...

eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.

É que tem mais chã nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas.

Mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros.

Mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

FURINI, J. **Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos**. 2016. 145f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Doença de Chagas e Leishmaniose, são doenças causadas por protozoários da família Trypanosomatidae (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.*, respectivamente) e estão, ambas, no grupo das doenças consideradas tropicais negligenciadas (DTNs). Juntas, elas afetam cerca de 30 milhões de pessoas em 98 países no mundo. Embora tão epidemiologicamente importantes, essas doenças ainda carecem de um tratamento quimioterápico robusto e seguro, pois os medicamentos disponíveis apresentam, além de baixa eficácia terapêutica, baixas taxas de adesão, devido aos sérios efeitos colaterais gerados por serem extremamente tóxicos e acabando, por isso, sendo geradores de resistência. Nas últimas décadas, tem sido intenso o esforço dos grupos de pesquisa em desenvolver alternativas para o tratamento dessas doenças, especialmente explorando produtos de origem natural e através do emprego de tecnologia farmacêutica, gerando formulações mais viáveis clinicamente devido ao provimento de propriedades físico-químicas favoráveis à absorção e permeabilidade celular, com consequente maior biodisponibilidade e potencialização do efeito biológico. Em nosso presente trabalho, objetivamos propor novas estratégias de tratamento dessas doenças, utilizando como candidato, o ácido ursólico (AU), um triterpenoide de origem natural. Foram testados o AU isolado e associado com fármacos estabelecidos, assim como uma dispersão sólida contendo 10% do princípio ativo (DSAU). Em ensaios *in vitro* contra as várias formas evolutivas intra e extracelulares de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*, obtivemos muito bons resultados, como 99,8% de lise em 128 μ M sobre as formas tripomastigotas, com IC_{50} de 14,1 μ M para o AU. Em experimentos *in vivo* sobre doença de Chagas experimental, observamos uma redução de parasitemia de 60,2% e 61,6% em animais tratados com doses de 20 mg/Kg de AU e DSAU, respectivamente. Embora não tenham causado diminuição na carga parasitária nos tecidos analisados (coração e fígado) em relação ao controle negativo, a sobrevivência dos animais tratados com AU e DSAU foi semelhante a dos animais tratados com benzonidazol na mesma dose. Sobre leishmaniose muco-cutânea experimental, observamos a diminuição do diâmetro médio das lesões em animais tratados com dose de 20 mg/Kg de nossos compostos avaliados. Esses resultados demonstram que o ácido ursólico é um potente candidato a quimioterápico para o tratamento de tripanosomíases. Além disso, a associação a fármacos existentes, e a utilização de tecnologia farmacêutica podem ser boas estratégias para o tratamento dessas doenças.

Palavras-chave: doença de Chagas; Leishmaniose; Ácido ursólico.

ABSTRACT

FURINI, J. Therapeutic strategies using ursolic acid on infections determined by trypanosomatids. 2016. 145f. Thesis (Doctoral). Faculty of Pharmaceutical Sciences of de Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Chagas disease and Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the family Trypanosomatidae (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp.*, Respectively) and both are in the group of diseases considered neglected tropical (NTDs). All together, they affect about 30 million people in 98 countries worldwide. Although so very epidemiologically important, these diseases still lack a safe and robust chemotherapeutic treatment seeing that the available drugs present besides low therapeutic efficacy, low compliance rates, since they are extremely toxic and cause serious side effects ending up, therefore, being resistance generators. In recent decades, there have been intense efforts of research groups to develop alternatives for treating these diseases, especially exploring natural products and by applying pharmaceutical technology, generating more clinically viable formulations due to providing favorable physicochemical properties to the cell absorption and permeability, thus resulting in increased bioavailability and enhancement of biological effect. In our present study, we aimed to propose new treatment strategies for these diseases by using as a candidate, the ursolic acid (UA), a naturally occurring triterpenoid. Isolated UA and associated with established drugs have been tested, as well as a solid dispersion containing 10% of the active ingredient (SDUA). In the *in vitro* tests against several extracellular and intracellular evolving forms of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis*, we have obtained very good results, such as 99.8 of lysis at 128 μ M on trypomastigotes, with IC₅₀ of 14.1 μ M for the UA. In the *in vivo* experiments about experimental Chagas disease, a decrease of parasitaemi of 60.2% and 61.6% has been observed in animals treated with doses of 20 mg / kg of UA and SDUA respectively. Although not having caused a decrease in the parasite load in the tissues analyzed (heart and liver) compared to the negative control, the PFS of animals treated with UA and SDUA was similar to that of the animals treated with the same dose of benznidazole. About the experimental skin mucus leishmaniasis, we have observed a decrease of the average diameter of lesions in animals treated with 20 mg / kg of our evaluated compounds. These results demonstrate that the ursolic acid is a potent candidate for chemotherapy for the treatment of trypanosomiasis. Furthermore, the association of existing drugs, and the use of pharmaceutical technology can be good strategies to treat these diseases.

Keywords: Chagas disease; Leishmaniasis; Ursolic acid

RESUMEN

FURINI, J. **Estrategias terapéuticas utilizando ácido ursólico en infecciones determinadas por tripanosomátidos.** 2016. 145f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

La enfermedad de Chagas y la leishmaniosis son enfermedades causadas por protozoos de la familia Trypanosomatidae (*Trypanosoma cruzi* y *Leishmania sp.*, respectivamente) y están, a la vez, en el grupo de las enfermedades consideradas tropicales desatendidas (NTD). Juntos afectan alrededor de 30 millones de personas en 98 países en todo el mundo. Aunque bastante epidemiológicamente importantes, estas enfermedades todavía carecen de un tratamiento quimioterapéutico robusto y seguro ya que los fármacos disponibles son, además de baja eficacia terapéutica, de bajas tasas de cumplimiento, ya que son extremadamente tóxicos, causando efectos secundarios graves, y por lo tanto terminan siendo generadores de resistencia. En las últimas décadas, se han hecho esfuerzos intensos por los grupos de investigación para desarrollar alternativas para el tratamiento de estas enfermedades, especialmente la explotación de productos naturales y del uso de la tecnología farmacéutica, generando de formulaciones más clínicamente viables debido a la disposición de las propiedades fisicoquímicas favorables a la absorción y a la permeabilidad de las células, lo que resulta en un aumento de la biodisponibilidad y la mejora del efecto biológico. En nuestro estudio, que tuvo como objetivo proponer nuevas estrategias de tratamiento para estas enfermedades mediante el uso, como candidato, del ácido ursólico (AU) un triterpenoide natural. El AU aislado y el AU asociado con fármacos establecidos se pusieron a prueba, así como con una dispersión sólida que contiene 10% del ingrediente activo (DSAU). En ensayos in vitro contra las diversas formas de desarrollo extracelulares e intracelulares del *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis*, se obtuvieron muy buenos resultados, como el 99,8% de lisis en 128 μM sobre las formas tripomastigotes, con IC₅₀ de 14.1 μM para el UA. En experimentos in vivo en la enfermedad de Chagas experimental, una disminución de la parasitemia de 60,2% y 61,6% ha sido observada en los animales tratados con dosis de 20 mg / kg de AU y DSAU respectivamente. Aunque no causando una disminución en la carga parasitaria en los tejidos analizados (corazón y el hígado) en comparación con el control negativo, la supervivencia de animales tratados con AU y DSAU fue similar en los animales tratados con la misma dosis de benznidazol. Acerca de la leishmaniosis mucocutánea experimental, se observó una disminución del diámetro medio de las lesiones en los animales tratados con 20 mg / kg de nuestros compuestos evaluados. Estos resultados demuestran que el ácido ursólico es un potente candidato quimioterapéutico para el tratamiento de la tripanosomíasis. Además, la asociación de los fármacos existentes, y el uso de la tecnología farmacéutica pueden ser buenas estrategias para tratar estas enfermedades.

Palabras llave: Enfermedad de Chagas, Leishmaniosis, Ácido ursólico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore filogenética da vida baseada em atuais conhecimentos moleculares	2
Figura 2.	Domínio Eucarya com destaque para a sistemática da Ordem Kinetoplastea	4
Figura 3.	Famílias integrante da Ordem Kinetoplastea	4
Figura 4.	Ciclo biológico da doença de Chagas	12
Figura 5.	Fases da doença de Chagas	14
Figura 6.	Ciclo biológico da leishmaniose	19
Figura 7.	Estruturas químicas do nifurtimox e do benzonidazol	23
Figura 8.	Estruturas químicas do Glucantime® e do Pentostan®	26
Figura 9.	Estruturas químicas da pentamidina, do miltefosine e da anfotericina B	28
Figura 10.	Esquema da biossíntese de triterpenos em plantas	37
Figura 11.	Estrutura química do ácido ursólico	39
Figura 12.	Programa de temperatura no termociclador	55
Figura 13.	Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU) e benzonidazol (BZ), sobre as células da linhagem LLMCK2	62

Figura 14. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*..... 64

Figura 15. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*..... 65

Figura 16. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*..... 70

Figura 17. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB), sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*..... 73

Figura 18. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB), sobre formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*..... 75

Figura 19. Avaliação Parasitêmica de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Avaliação estatística realizada por método de Kruskal-Wallis com teste complementar de Dunn 79

Figura 20. Sobrevida de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições..... 80

Figura 21. Avaliação Parasitêmica de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Avaliação estatística realizada por método de Kruskal-Wallis com teste complementar de Dunn 81

Figura 22. Sobrevida de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições 82

Figura 23. Curva padrão para quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Valores de Cq em função da quantidade de fitas de DNA. (A) material genético de fígado de camundongo. (B) água isenta de material genético. 85

Figura 24. Curva padrão para quantificação de GAPDH. Valores de Cq em função da quantidade de fitas de DNA 87

Figura 25. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido

ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05 (*)$ 88

Figura 26. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$) 89

Figura 27. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05 (*)$ 90

Figura 28. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20

dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) 91

Figura 29. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) [$p < 0,0005$ (***)] 92

Figura 30. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) 93

Figura 31. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados

com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) [$p < 0,005$ (**)]. 94

Figura 32. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) [$p < 0,005$ (**)]...... 95

Figura 33. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 97

Figura 34. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol 98

Figura 35. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante

20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento.
 Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 99

Figura 36. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol 100

Figura 37. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 101

Figura 38. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 103

Figura 39. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 104

Figura 40. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol..... 105

Figura 41. Variação média das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* durante o tratamento oral com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico, na dose de 8 mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$)..... 108

Figura 42. Variação total das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* após o período de tratamento (20 dias) com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico na dose de 8 mg/kg, oralmente. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) 109

Figura 43. Aspectos iniciais das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após período de pré-latência. Início do tratamento com dose 8 mg/Kg de acordo com os grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico 110

Figura 44. Aspectos das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após 20 dias de tratamento com dose 8 mg/Kg. Grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico 111

- Figura 45.** Variação média das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* durante o tratamento oral com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico, na dose de 20 mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$) 112
- Figura 46.** Variação total das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* após o período de tratamento (20 dias) com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico na dose de 20 mg/kg, oralmente. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p<0,05$ (*) 113
- Figura 47.** Aspectos iniciais das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após período de pré-latência. Início do tratamento com dose 8 mg/Kg de acordo com os grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico 114
- Figura 48.** Aspectos das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após 20 dias de tratamento com dose 8 mg/Kg. Grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das soluções amostrais para eletroforese	53
Tabela 2 - <i>Primers foward e reverse</i> para <i>Trypanosoma cruzi</i> e para GAPDH.....	54
Tabela 3 - Constituição final, por poço, das amostras aplicadas na placa de 48 poços para a amplificação do material genético de <i>Trypanosoma cruzi</i> e para a amplificação do gene GAPDH	55
Tabela 4 - Valores de porcentagem de lise celular – citotoxicidade - de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU) e benzonidazol (BZ) sobre células da linhagem LLMCK2	61
Tabela 5 - Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Tabela 6 - Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Tabela 7 - Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
Tabela 8 - Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	72
Tabela 9 - Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB) sobre formas amastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	75

Tabela 10 - Redução da parasitemia em valores absolutos dos animais tratados, comparados ao grupo controle negativo, no dia do pico parasitêmico	82
Tabela 11 - Massa equivalente ao número de cópias do material genético de <i>Trypanosoma cruzi</i> e concentrações utilizadas na confecção da curva padrão a partir da diluição seriada da solução mãe	84
Tabela 12 - Massa equivalente ao número de cópias do material genético de camundongo e concentrações utilizadas na confecção da curva padrão a partir da diluição seriada da solução mãe.	86
Tabela 13 - Redução da carga parasitária média (%) no coração e no fígado (fase crônica em comparação à fase aguda) dos animais tratados na dose 8 mg/kg com benzonidazol e ácido ursólico (AU).	98
Tabela 14 - Redução da carga parasitária média (%) no coração e no fígado (fase crônica em comparação à fase aguda) dos animais tratados na dose 20 mg/kg com benzonidazol e ácido ursólico (AU).	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AnB	Anfotericina B
ANOVA	<i>Oneway analysis of variance</i>
AS	Associação
AU	Ácido ursólico
BZ	Benzonidazol
C-3	Carbono da posição 3
CPRG	<i>Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CN	Controle negativo
CP	Controle negativo
Cq	Ciclo de início da emissão de sinal fluorescente de amplificação
CUG	<i>3-carboxy-umbelliferyl-β-D-galactopyranoside</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DSAU	Dispersão sólida de ácido ursólico
E	Eficiência da amplificação
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
fg	Ficograma
fg/μL	Ficograma por microlitro
gGAPDH	Gene para <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Glu	Glucantime
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
kDNA	Cinetoplasto
<i>L.braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
LIT	Meio de cultura – <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LLMCK2	Linhagem celular - Fibroblastos
Log	Logaritmo
M	Molar
M199	Meio de cultura – tecido animal desidratado

mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro
μ g/mL	Micrograma por mililitro
μ g	Micrograma
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
ng/mL	Nanograma por mililitro
ng/ μ L	Nanograma por microlitro
NTD	<i>Neglected Tropical Disease</i>
p	Erro estatístico
P388D1	Linhagem celular - macrófagos
PCR-RT	<i>Polymerase Chain Reaction – Real Time</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pg	Picograma
pg/ μ L	Picograma por microlitro
pL	Picolitro
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura – <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SSU	<i>Small subunit</i>
<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UI	Unidade Internacional
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XTT	2,3-bis(2metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
™	Trademark
ε	Épsilon
β	Beta
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
μ	Mi
(v/v)	Volume por volume

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Reino Protista	1
1.2 Família Trypanosomatidae	5
1.3 Doenças Tropicais Negligenciadas	8
1.4 Doença de Chagas	9
1.5 Leishmaniose	16
1.6 Tratamento	23
1.7 A busca por alternativas	30
1.8 Terpenos e ácido ursólico	34
1.9 Tecnologia farmacêutica	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Princípios éticos na experimentação animal	44
3.2 Animais	44
3.3 Parasitas	44
3.4 Compostos químicos utilizados	45
3.5 Manutenção da cultura de células	45
3.6 Avaliação da citotoxicidade	46
3.7 Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
3.8 Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47

3.9 Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
3.10 Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	49
3.11 Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	50
3.12 Avaliação terapêutica <i>in vivo</i> na fase aguda da doença de chagas experimental.....	51
3.13 PCR em tempo real - Quantificação de parasitas em amostras teciduais	52
3.13.1 Extração do DNA.....	52
3.13.2 Quantificação de DNA total	52
3.13.3 Integridade do DNA – eletroforese	53
3.13.4 Delineamento de curvas padrão.....	53
3.13.5 <i>Primers</i>	54
3.13.6 Preparo de amostras e reações RT-PCR.....	54
3.13.7 Eficiência da amplificação e cálculos	56
3.14 Avaliação terapêutica <i>in vivo</i> sobre leishmaniose cutânea experimental	56
3.15 Avaliação estatística dos resultados.....	57
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 58
4.1 Experimentos <i>in vitro</i>	59
4.1.1 Citotoxicidade de AU e DSAU sobre células LLMCK2	60
4.1.2 Avaliação biológica <i>in vitro</i> sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
4.1.3 Avaliação biológica <i>in vitro</i> sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
4.1.4 Avaliação biológica <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
4.1.5 Avaliação biológica <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	71
4.1.6 Avaliação biológica <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	74

4.2 Experimentos <i>in vivo</i>	76
4.2.1 Avaliação do potencial terapêutico <i>in vivo</i> do AU e DSAU sobre a doença de chagas experimental.....	78
4.2.2 Quantificação parasitária por PCR em tempo real	83
4.2.2.1 Curva padrão para quantificação de <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
4.2.2.2 Curva padrão para quantificação de GAPDH.....	85
4.2.2.3 Determinação de carga parasitária em animais tratados com 8 mg/kg de AU e DSAU.....	87
4.2.2.3.1 Coração.....	87
4.2.2.3.2 Fígado	89
4.2.2.4 Determinação de carga parasitária em animais tratados com 20 mg/kg de AU e DSAU.....	91
4.2.2.4.1 Coração.....	91
4.2.2.4.2 Fígado	93
4.2.2.5 Determinação de carga parasitária em animais sobreviventes tratados com 8 mg/kg de AU e DSAU	96
4.2.2.5.1 Coração.....	96
4.2.2.5.2 Fígado	98
4.2.2.6 Determinação de carga parasitária em animais sobreviventes tratados com 20 mg/kg de AU e DSAU	100
4.2.2.6.1 Coração.....	100
4.2.2.6.2 Fígado	103
4.2.3 Avaliação do potencial terapêutico <i>in vivo</i> do AU e DSAU sobre a leishmaniose experimental.....	107
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS	143

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com a intenção de discutir a importância da busca de novas alternativas de tratamento para doença de Chagas e leishmaniose, gerando novas perspectivas no combate a essas doenças tropicais consideradas negligenciadas. Os agentes etiológicos de tais doenças são protozoários da família Trypanosomatidae, e acometem milhões de pessoas em todo o Mundo especialmente em países equatoriais.

Tal importância epidemiológica não se reflete no empenho em desenvolver novos fármacos para o tratamento dessas doenças. Os fármacos existentes, além de pouco eficazes, apresentam alta toxicidade.

Destarte, através de experimentações *in vitro* e *in vivo* em modelo animal, utilizando o triterpeno ácido ursólico e um derivado farmacotecnicamente estruturado (dispersão sólida), buscamos uma alternativa para o tratamento de ambas as doenças, que seja mais eficaz, menos tóxico e com maior viabilidade farmacocinética.

1.1 REINO PROTISTA

Os seres vivos, na natureza, apresentam uma grande diversidade e estão adaptados aos mais variados ambientes. Esses organismos são classificados de acordo com sua estrutura celular, forma de vida, nutrição e, nos dias atuais, cada vez mais, por sua constituição gênica, sendo, para tanto, utilizados estudos de biologia molecular. Como observado na figura 1, tais estudos têm proporcionado, através de evidências moleculares, o conhecimento filogenético necessário para a diferenciação dos domínios de seres vivos e para o entendimento evolutivo no ambiente natural (LOPES-GARCIA; MOREIRA, 2008).

Figura 1. Árvore filogenética da vida baseada em atuais conhecimentos moleculares (LOPEZ-GARCIA; MOREIRA, 2008).

É redundante dizer que seres vivos cujas células são eucariotas são diversos. Plantas, animais e fungos são representantes importantes do domínio eucarioto. Porém, eucariotos microscópicos e unicelulares são classificados dentro do Reino Protista (BURKI, 2016) e este representa o mais numeroso e variado grupo dentro da árvore da vida.

Em 2012, Katz afirmou que a maior parte da diversidade de vida eucariótica é microscópica. Embora os grandes eucariotos multicelulares citados dominem o campo visual, linhagens microscópicas unicelulares compõe a maior parte, tanto da diversidade genética quanto da biomassa e contém muitas inovações evolutivas.

De acordo com Caron (2009) os protistas são muito numerosos e distribuídos globalmente. Este elevado número se dá obedecendo à relação inversa que existe

entre o tamanho do organismo e o tamanho de sua população, e à relativa facilidade de dispersão de organismos microscópicos.

A descoberta e caracterização da comunidade Protista nos diversos ambientes são cruciais para entendermos a história evolutiva da vida na Terra. No entanto, segundo Heger et al. (2014), questões concernentes à biodiversidade, ecologia e evolução dos protistas ainda permanecem sem respostas devido à limitação nos dados obtidos de comunidades protistas naturais, especialmente de espécies heterotróficas.

Apesar dos numerosos estudos de campo feitos desde o século XVII, os protistas são ainda o componente eucarioto menos explorado da biosfera, sendo essa realidade ilustrada pela discrepância entre o número de espécies atualmente conhecidas e o número estimado de espécies na natureza (CAVALIER-SMITH, 2010). Nosso entendimento, no entanto, da origem e diversidade dos eucariotos tem aumentado substancialmente graças às análises moleculares e estudos sistemáticos, filogenéticos e especialmente da biologia de protozoários parasitas (KATZ, 2012).

Os protagonistas e, ao mesmo tempo, alvos do nosso trabalho são seres unicelulares, eucariotos e heterotróficos pertencentes, portanto, ao domínio Eucarya, e mais especificamente ao Reino Protista.

Trypanosoma cruzi e *Leishmania braziliensis*, pertencem à família Trypanosomatidae que por sua vez está contida na ordem Kinetoplastea, táxon criado 40 anos atrás (HONIGBERG, 1963) para unir dois grupos - Trypanosomatidae e Bodonidae – que eram anteriormente considerados grupos de protozoários não relacionados. Embora atualmente na mesma ordem, a distinção entre eles ainda permanece nos sistemas de classificação devido à ausência de fortes hipóteses de relação entre tripanosomatídeos e bodonídeos (SIMPSON et al., 2006).

Toda sistemática deste grupo de interesse pode ser observada nas figuras 2 e 3.

Figura 2. Domínio Eucarya com destaque para a sistemática da Ordem Kinetoplastea (LUKES et al., 2014)

Figura 3. Famílias presentes na Ordem Kinetoplastea (LUKES et al., 2014)

1.2 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A característica mais notável na família Trypanosomatidae é o fato de serem parasitas obrigatórios. Quando consideramos a frequência de parasitas eucariotos em hospedeiros vertebrados e invertebrados, provavelmente apenas os parasitas da ordem apicomplexa superam em abundância e diversidade a ordem Kinetoplastea e somente os parasitas nematódeos parecem ter mais amplo alcance de hospedeiros (PAWLOWSKI et al., 2012). De acordo com Lukes et al. (2014), os Kinetoplastideos são evolutivamente mais antigos quando comparados com a maioria dos outros grupos parasitas protistas, além de serem mais espalhados e adaptados ao maior número de ambientes distintos. Esta realidade reflete o extremo sucesso de seu modo de vida.

A taxonomia recente coloca a ordem Kinetoplastea juntamente com três ordens irmãs (Euglenida, Symbiontida e Diplonemea) dentro da classe Euglenozoa que pertence ao filo Discicristata, um grupo de protistas unificados por uma característica marcante – a crista mitocondrial discoidal (VICKERMAN et al., 1994) (Figura 2). A ordem Euglenida é constituída por organismos autotróficos ou, menos frequentemente, heterótrofos, forma de nutrição que também caracteriza todos os symbiontideos e diplonemideos (ADL et al., 2012).

Assim sendo, o modo de vida parasitária deve ter emergido apenas na linhagem kinetoplastidea (LUKES et al., 2014), característica essa que gera um excitante desafio de identificação de mudanças genéticas que levaram vários protozoários dessa ordem a esse dramático estilo de vida. No entanto, ainda não há informações definitivas viáveis sobre o genoma dessas ordens que possam fornecer informações evolutivas para tal adaptação.

A ordem Kinetoplastidea é subdividida em subclasses, dentre elas a Metakinetoplastina, que por sua vez é subdividida em quatro famílias (Neobodonidae, Parabodonidae, Eubodonidae e Trypanosomatidae) (Figura 3), das quais apenas a última é formada por protozoários obrigatoriamente parasitas (MOREIRA et al., 2004) e dentro da qual estão os gêneros causadores das protozooses objetos de nosso presente estudo (Figura 3).

Trypanosomatideos formam um grande grupo de protozoários flagelados parasitas que são caracterizados por alguns fatores exclusivos. O mais notável deles é a presença de um cinetoplasto, uma grande mitocôndria única contendo uma complexa estrutura de DNA, chamada kDNA. Outra característica é a presença de

glicossomas, um peroxissomo diferenciado que abriga a maior parte da via glicolítica, o que explica o seu nome (HAANSTRA et al., 2015).

Todas as espécies de tripanosomatídeos conhecidas são parasitas, infectando uma grande variedade de organismos, como mamíferos – incluindo seres humanos – répteis, insetos e até mesmo, plantas. Essa característica faz dessa família um grupo altamente divergente e por isso promove uma excelente oportunidade para a exploração da biologia evolutiva e observação de mecanismos especializados presentes nesses protistas patogênicos que promovem o parasitismo. Segundo (FIELD; CARRINGTON, 2004) o tráfego de substâncias pela membrana exerce um papel crucial na progressão do ciclo de vida, virulência e evasão do sistema imune por esses patógenos.

Os parasitas de seres humanos, que são transmitidos por insetos, são responsáveis por doenças com alto potencial mortal (SZOOR et al., 2014) e a maioria da população humana está potencialmente exposta a uma ou mais espécies de tripanosomatídeos (FIELD et al., 2007).

Tais parasitas utilizam duas formas de ciclo de vida. Os díxênicos que translatam entre dois hospedeiros, sendo um invertebrado (principalmente insetos e sanguessugas) e outro vertebrado ou vegetal, enquanto os monoxênicos são restritos aos invertebrados. Existem substanciais evidências de que o ciclo de vida díxênico emergiu do monoxênico, seja o parasita representante de qualquer um dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* ou *Phytomonas* (VOTYPKA et al., 2015).

Os tripanosomatídeos díxênicos têm ciclos de vida extremamente complexos nos quais eles passam sequencialmente por meio de diferentes partes dos corpos dos hospedeiros mamíferos e insetos. Cada espécie de tripanosomatídeo é transmitida entre humanos por vetores específicos. Alguns desses parasitas podem infectar também outros animais, tanto no ambiente selvagem quanto no doméstico, criando grandes reservatórios para a transmissão pelos insetos (HAANSTRA et al., 2015).

Células de tripanosomatídeos adotam uma grande variedade de morfologias durante o seu ciclo de vida, mas todos apresentam uma matriz de microtúbulos subpelículas que serve para manter um eixo na forma alongada. As células também apresentam um flagelo que emerge do corpo do parasita através de uma estrutura chamada bolsa flagelar – uma pequena invaginação cuja membrana é mantida como um domínio distinto. Em alguns tripanosomatídeos, incluindo

Trypanosoma brucei, o flagelo está anexo ao corpo celular, enquanto em outros, como em *Leishmania*, o flagelo é livre (FIELD et al., 2007).

As diferentes formas celulares destes parasitas dentro do ciclo de vida reprogramam seus metabolismos para poderem persistirem e se proliferarem em diferentes hospedeiros e em diversos tecidos dos hospedeiros. A capacidade metabólica de cada forma celular, em grande parte, reflete a disponibilidade de nutrientes naquele ambiente específico (HAANSTRA et al., 2015).

Para cada um desses passos, o organismo tripanosomatídeo desenvolveu uma flexibilidade metabólica adaptada às repentinas e drásticas mudanças de ambiente. Para parasitas cujos ciclos são monoxênicos, existem estágios em ambiente aquático e em insetos. Já para parasitas dixênicos, em um inseto e em um segundo hospedeiro. Além disso, esses parasitas tiveram que elaborar, subsequentemente, seus ciclos de vida ocupando diferentes tecidos dos hospedeiros, sendo cada tecido um ambiente totalmente diferente. Inicialmente no inseto em partes da boca e posteriormente no sistema digestório e glândulas salivares. Nos vertebrados, extracelularmente na pele e/ou circulação hemolinfática e *a posteriori*, também intracelularmente, em diferentes tipos celulares (URBANIÁK et al., 2012).

Pode-se imaginar que a flexibilidade metabólica oferecida pela presença do glicossoma deve contribuir para o desenvolvimento do elaborado ciclo de vida em muitas linhagens de Kinetoplastídeos. Por outro lado, o conteúdo enzimático dos glicossomas existentes em tripanosomatídeos teria sido moldado pelas condições nutricionais específicas sucessivamente encontradas durante seus ciclos de vida parasitários (SZOOR, et al., 2014).

A taxonomia dos tripanosomatídeos foi originalmente definida por um conjunto de morfotipos, os quais se diferenciam pela posição do kDNA, núcleo e bolsa flagelar, e pela presença ou perda de um flagelo único (HOARE, 1966; MCGHEE; COSGROVE, 1980). Muitos estudos de aplicação de microscopia eletrônica em tripanosomatídeos não adicionaram nenhum fator de distinção importante (DE SOUZA, 2008). Recentes estudos com métodos moleculares mostraram que não há nenhum valor taxonômico nos morfotipos individuais nem nos arranjos dentro de seus ciclos de vida (MASLOV et al., 2013). Além do mais, parece cada vez mais plausível que exista uma continuidade de formas celulares ao invés dos oito distintos morfotipos.

Hamilton et al. (2004) discute que devido à escassez de características morfológicas, atualmente lança-se mão de sequências de DNA específicas para estabelecer a posição taxonômica dos tripanosomatídeos flagelados. Existem duas categorias de genes para esta finalidade: a pequena unidade (SSU) de rRNA e o gene glicosomal *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (gGAPDH) que são genes de maior nível informativo taxonômico e são suficientes para a classificação de gênero (MERZLYAK et al., 2001) enquanto as sequências de RNA *spliced leader* (SL) gene e sua respectiva região intergênica permite fazermos distinção entre espécies (WESTENBERGER et al., 2004).

Quando selecionamos especificamente os tripanosomatídeos parasitas humanos, existem muito mais dados disponíveis para classificação, especialmente referentes aos membros dos gêneros dixênicos. Devido a relevância médica dos *Trypanosomas* e *Leishmanias* como os agentes etiológicos da doença de Chagas e das diversas expressões da leishmaniose (doenças consideradas negligenciadas), tripanosomatídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores (LUKES et al., 2014), inclusive do nosso grupo de pesquisa.

1.3 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (NTDs) prejudicam mais de um bilhão de pessoas no mundo e ameaça a vida de outros milhões (WHO, 2012). Embora causadas por diferentes agentes etiológicos, NTDs são categorizadas como um grupo por causa de sua distribuição geográfica e o status negligenciado em comum (HOTEZ et al., 2006). A classificação de NTDs como um grupo pretende facilitar o controle e tratamento de uma forma coordenada e integrada. Para tanto, estratégias e recomendações foram desenvolvidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), objetivando o controle, prevenção e até eliminação de várias.

De acordo com a OMS, o grupo de NTDs é composto por 17 doenças causadas por vírus, bactérias, helmintos e protozoários, dentre elas a doença de Chagas e a leishmaniose (HOFSTRAAT; VAN BRAKEL, 2016).

Pessoas que adquirem alguma das NTDs são propensas à estigmatização social e discriminação relacionada às deficiências físicas e desfigurações que acompanham algumas das NTDs (HOTEZ, 2008). Estigma pode ser definido como “um processo social, experimentado ou antecipado, caracterizado por exclusão, rejeição, culpa ou desvalorização que resulta da experiência, percepção ou

antecipação razoável de um julgamento social adverso sobre uma pessoa ou grupo” (WEISS et al., 2006).

Quando relacionado à doenças, o estigma causa uma carga social e psicológica imensa, e em termos de exclusão social, reduz a qualidade de vida e empobrece a saúde mental (LITT et al., 2012). Especialmente em relação à saúde mental, tem sido mostrado que existe uma íntima relação entre estigma e NTDs (TSUTSUMI et al., 2007).

Além do aspecto social mencionado, essas doenças parasitárias, como as leishmanioses e a tripanosomíase, têm um significativo impacto negativo no desenvolvimento dos países endêmicos por causa das milhares de mortes que ocorrem todos os anos em decorrência das infecções.

Leishmaniose e doença de Chagas, juntas, afetam aproximadamente 25 milhões de pessoas em todo o mundo. Se o hospedeiro consegue controlar a infecção ou desenvolve a doença depende de uma complexa gama de interações entre ele e o parasita. A superfície parasitária e moléculas secretadas estão envolvidas no desencadeamento de vias específicas de sinalização essenciais para a entrada do parasita na célula hospedeira e sua sobrevivência no ambiente intracelular (SANDJO et al., 2016).

Leishmania spp. e *T. cruzi* apresentam um repertório multifacetado de estratégias para contornar ou subverter o sistema imune, por interferirem em várias vias de transdução de sinal em células hospedeiras, o que causa inibição da resposta imunológica e acaba contribuindo para sua persistência no hospedeiro (DE MORAIS et al., 2015).

1.4 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana é uma protozoose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasita da família Trypanosomatidae. Esse agente etiológico é dixênico, sendo o hospedeiro intermediário e vetor, insetos hematófagos do gênero *Triatoma* (PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Embora haja relatos de presença do parasito em tecidos de múmias encontradas na Região dos Andes, na América do Sul, de aproximadamente 9.000 anos (IZUMI et al., 2011), o ciclo da doença, o protozoário, seu vetor, os possíveis reservatórios, assim como as manifestações clínicas, foram descobertos e descritos por Carlos Chagas em 1909, em uma pobre região rural no interior do Estado de

Minas Gerais, Brasil. Originalmente, acreditou-se esta ser uma moléstia típica desse contexto ambiental e social, porém, mudanças antrópicas e ecológicas, como urbanização e migrações, alteraram a epidemiologia da doença ao longo do tempo (GASCON et al., 2010; PINAZO; GASCON, 2015).

Embora descoberta há tantos anos, esta parasitose permanece, no século XXI, sendo um problema de saúde pública, com dados preocupantes referentes ao número de pessoas contaminadas e daquelas que ainda permanecem expostas ao risco de infecção.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), existe a estimativa de que aproximadamente 8 milhões de indivíduos estão infectados e cerca de 70 milhões de indivíduos convivam com o risco de adquirir a infecção. Além disso, 50.000 novos casos surgem por ano em 21 diferentes países, não apenas no continente americano, mas em todo o mundo.

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, durante milhões de anos foi caracterizado como uma enzootia, ou seja, o protozoário circulava entre animais selvagens e vetores encontrados desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Porém com a entrada acidental dos seres humanos no ecótopo selvagem, e com a invasão dos vetores em áreas domésticas ou peridomésticas, o ciclo se tornou uma doença que se caracteriza como uma antropozoonose há cerca de 200 anos (COURA, 2007).

O perfil epidemiológico global da doença de Chagas se deve principalmente à transmissão vetorial doméstica que permanentemente assola as populações da América Latina, onde a doença é endêmica (DE MORAIS et al., 2015) e à migração em larga escala da zona rural para as cidades nos últimos 50 anos (RASSI et al., 2010; RASSI et al., 2014).

Nas últimas décadas, o problema tem se tornado global porque milhões de pessoas infectadas se mudaram de áreas rurais endêmicas para grandes cidades latino americanas, e centenas de milhares delas agora vivem em outros continentes (REQUENA-MENDEZ et al., 2015; BERN, 2015).

Por isso, embora seja caracterizada como uma doença tropical, nos últimos anos a doença de Chagas se mostrou mais amplamente distribuída, inclusive em países como Estado Unidos, Canadá, Japão, Austrália, e 15 países da Europa, por ocasião, principalmente, da imigração de indivíduos contaminados provindos de países endêmicos da América Latina (SCHMUNIS E YADON, 2010)

Para promover a prevenção contra a parasitose em questão, certamente o controle do vetor seria uma medida prioritária, porém, ecologicamente seria inviável eliminar mais de 100 espécies e gêneros de animais reservatórios de *T.cruzi*, ou 150 espécies de triatomíneos, das quais 13 são domésticas (COURA, 2013).

Não obstante às dificuldades ecológicas, as ações de cunho profilático, na América Latina têm alcançado substanciais progressos no controle da doença de Chagas (RASSI et al., 2012).

A prevalência global estimada da infecção por *T.cruzi* declinou de 18 milhões em 1991, quando se iniciou a primeira iniciativa regional de controle, para 8 milhões em 2010 (WKLY, 2015).

Os agentes transmissores do *T.cruzi* são insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), cujo gênero mais epidemiologicamente importante é o *Triatoma* (COGO et al., 2015). Mais de 130 espécies apresentam potencial atividade vetorial. No Brasil, 52 espécies de triatomíneos foram descritos, mas cinco delas apresentam particular importância epidemiológica porque são domesticadas: *T.infestans*, *T.brasiliensis*, *T.pseudomaculata* e *T.sordida*. (COURA, 2009). Na Bolívia e Peru, a espécie mais importante é o *Triatoma infestans*, e na América Central e México o *Triatoma dimidiata* (COURA, 2013).

Esse vetor, conhecido popularmente como “barbeiro”, ao se domiciliar, passou a habitar as rachaduras das paredes de lama (conhecidas como “pau a pique”) e nos tetos de palha, típicos de casas rurais rústicas. Os habitantes dessas casas infestadas são constantemente expostos ao inseto e consequentemente ao parasito durante muitos anos. A maior incidência, estimada por ano, desta transmissão estercorária, acontece na hiperendêmica região do Chaco, na Bolívia (SAMUELS et al., 2013).

O *T.infestans*, que é a única espécie estritamente domesticada, foi eliminada no Brasil, Chile e Uruguai, de maneira que a erradicação ou controle, em outros países sul-americanos tem progredido (WHO, 2002). Por isso, a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO/WHO) já certificou a interrupção da transmissão vetorial doméstica em muitos países nas Américas Central e do Sul, dentre os quais, se encontra o Brasil (SCHOFIELD et al., 2006; HASHIMOTO; SCHOFIELD, 2012).

Embora a transmissão da doença de Chagas possa ocorrer de diversas maneiras, o modo de transmissão natural é o vetorial. Fezes do triatomíneo infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas do protozoário são inoculadas

na pele do hospedeiro mamífero, através de uma pequena lesão formada durante o repasto sanguíneo do inseto, ganhando acesso à corrente sanguínea (MALIK et al., 2015) ou inoculadas em membranas mucosas intactas (Figura 4) sendo essa forma de transmissão limitada às Américas (BERN, 2015).

Figura 4. Ciclo biológico da doença de Chagas (BERN, 2015)

Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* na forma tripomastigota é capaz de penetrar diversos tipos celulares, especialmente células cardíacas e intestinais. No citoplasma dessas células, sofrem diferenciação e evoluem para formas proliferativas amastigotas. Após inúmeras fissões binárias, tais formas intracelulares sofrem nova diferenciação, se transformando em tripomastigotas, que rompem a célula hospedeira, retornando ao sangue. Estes tripomastigotas circulantes podem infectar novas células ou ser novamente ingeridos por triatômicos durante novo repasto sanguíneo. No estômago do invertebrado, devido à mudança de ambiente, o protozoário se diferencia em formas epimastigotas

e ao alcançar a ampola retal do vetor, finalmente se transmuta em formas mamífero-infectantes tripomastigotas metacíclicos, completando o ciclo (HAANSTRA et al., 2015).

Embora esta seja a via clássica, tanto em áreas urbanas endêmicas quanto não endêmicas, a doença de Chagas apresenta mecanismos alternativos de transmissão não vetoriais, como transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e medula óssea e transmissão vertical congênita (SANDJO et al., 2016; MALIK et al., 2015). Além dessas, surtos relacionados a alimentos e líquidos (especialmente contendo açaí) contaminados com as fezes do vetor já foram notificadas no norte da América do Sul, onde o ciclo de transmissão envolvendo o vetor selvagem e hospedeiros reservatórios mamíferos são extremamente comuns (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Nos dias atuais, a transmissão oral do *T. cruzi* é certamente a mais importante forma de infecção que mantém a doença de Chagas endêmica (COURA, 2013), por isso, essas rotas urbanas de transmissão se tornaram os maiores alvos de ações profiláticas contra a expansão da tripanosomíase americana. Surtos de transmissão oral parecem ser associados com uma maior incidência de miocardites e um maior número de casos fatais quando comparado à transmissão vetorial (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Outro problema de grande importância, atualmente, é a doença de Chagas em países não endêmicos como os citados acima. Tais surtos são resultado da migração de pessoas com a doença, de países endêmicos para essas regiões e países, (COURA; DIAS, 2009) nas quais não é prática comum o diagnóstico e controle do sangue de doadores, em bancos de sangue.

A determinação da doença de Chagas resulta da convergência de vários fatores: a quantidade de parasitas na infecção inicial, o número de formas infectantes no inóculo, a linhagem do *T. cruzi* inoculado, reinfeção, os receptores específicos clonais histotrópicos do hospedeiro, e a resposta imune inicial e tardia do paciente (ANDRADE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006).

O período de incubação da doença, após a contaminação, é de 1 a 2 semanas, e pode apresentar duas fases notadamente distintas, a fase aguda e a fase crônica, esquematicamente representadas na figura 5.

Figura 5. Fases da doença de Chagas (BERN, 2015)

O marcador de fase aguda é a parasitemia microscopicamente detectável. Os sintomas são normalmente suaves e não específicos, incluindo febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em alguns casos, nódulos cutâneos (chagoma) ou edema ocular prolongado e indolor (sinal de Romaña) podem indicar o local da inoculação. A grande maioria das infecções agudas nunca é identificada. Apenas em menos de 1% das infecções a fase aguda é severa e gera risco de vida devido à meningoencefalite ou miocardites (PÉREZ-MOLINA et al., 2015) sendo que a mais importante consequência da infecção por *T. cruzi* é a cardiomiopatia que ocorre em 20 a 30% das pessoas infectadas (BERN, 2015).

Em pessoas que sobrevivem à fase aguda, a resposta imune mediada por células controla a replicação do parasita, os sintomas regredem espontaneamente e

a parasitemia patente desaparece em 4 a 8 semanas (RASSI et al., 2012). Em caso de ausência de tratamento, o quadro pode evoluir para cronificação. Entre 60 e 70% dos pacientes nunca desenvolvem sintomas, porém os 40% restantes podem desenvolver problemas em órgãos específicos 20 a 30 anos após a fase aguda inicial (fase crônica tardia), principalmente cardiomiopatias, arritmias, cardiomegalia, megavísceras e, mais raramente, polineuropatias. A reativação da doença é rara, exceto em pacientes imunodeprimidos (PÉREZ-MOLINA et al., 2015)

A maioria dos pacientes que passam à fase crônica da infecção por *T.cruzi* permanecem assintomáticos, porém estão infectados por toda a vida. Estima-se que de 20 a 30% das pessoas infectadas têm progressão de cardiomiopatia ao longo dos anos (até décadas). Os primeiros sinais, tipicamente, são defeitos no sistema de condução nervosa cardíaca, especialmente bloqueio de ramo direito ou bloqueio fascicular anterior esquerdo (RASSI, 2009). Contrações ventriculares prematuras multiformes são sinais iniciais, mas podem ser perdidos sem monitoramento por eletrocardiomiografia ambulatorial.

Cardiomiopatia chagásica é altamente antiarritimogênica e é caracterizada por bradicardia juncional, fibrilação ou palpitação atrial, bloqueio atrioventricular e taquicardia ventricular sustentada ou não sustentada. Pacientes afetados, eventualmente, têm progressão de cardiomiopatia dilatada e falha congestiva do coração. Aneurisma ventricular esquerdo é comum em cardiomiopatia chagásica avançada (ACQUATELLA, 2007).

Aproximadamente 5% das crianças nascidas de mulheres infectadas por *T.cruzi* adquirem doença de Chagas congênita. A maioria dos neonatais infectados é assintomática ou têm sintomatologia leve. Quando sintomática, a doença de Chagas congênita apresenta dificuldade no ganho de peso, prematuridade, hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia. Em casos mais graves, miocardites, meningoencefalites, mega-síndromes gastrointestinais, pneumonia e aflições respiratórias podem acometer os neonatais (PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Apesar dos esforços realizados pela comunidade científica, a tripanosomíase americana continua sendo uma forma de infecção difícil de ser combatida, a qual podemos afirmar que, mesmo depois de pouco mais de cem anos da sua descoberta não existe um fármaco capaz de combater a doença de forma efetiva.

A infecção permanece por toda vida devido à inexistência de tratamento definitivo (BERN, 2015).

Finalmente, se no contexto atual não é possível erradicar a doença de Chagas, é possível controlá-la através da eliminação dos vetores domésticos, controle de sangue de doadores em todo o mundo, tratamento de pacientes em fase aguda e crônica da doença, e educação da população para evitar transmissão oral (COURA, 2013).

1.5 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças de grande importância epidemiológica e causam significativa morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2008) nos 98 países ou territórios distribuídos na América Latina, Sul e Centro da Ásia, África sub-Saariana e sul da Europa (DE MORAIS et al., 2015) onde a doença é endêmica. Todos esses países têm em comum o clima tropical ou subtropical, e são atualmente divididos, de acordo com suas localizações geográficas, para fins epidemiológicos, em Novo e Velho Mundo (DUJARDIN et al., 2008; POSTIGO, 2010). Estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção com 2 milhões de novos casos por ano e cerca de 50.000 óbitos apenas por leishmaniose visceral (WHO, 2014).

Apesar de seu enorme impacto nas populações de diversas áreas do Mundo, inclusive apresentando, entre as doenças infecciosas, a maior endemicidade em países desenvolvidos (ROCHA et al., 2005) ela continua sendo uma das doenças mais negligenciadas (KOBETS et al., 2012).

Podemos assumir que as leishmanioses devem ter se estabelecido 50 milhões de anos atrás, durante o Paleolítico (TUON et al., 2008). A primeira evidência direta que pessoas sofreram com essa doença vem de amostras de DNA de *L.donovani* de 4000 anos, encontradas em múmias egípcias (ZINK et al., 2006). A presença de *Leishmania* foi detectada também em lesões faciais de crânios antigos provenientes do deserto do Atacama, no Chile (COSTA et al., 2009).

Formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas primeiramente por Cunningham em 1885 em lesões de pele de pacientes indianos, mas ele sugeriu que tal agente era um fungo (*Mycetozoa*). O protozoário foi então reconhecido como tal, pela primeira vez, em 1898 por Borovsky durante seus estudos de lesões cutâneas no Turcomenistão (KOBETS et al., 2012). Leishman em 1903 descobriu corpos intracelulares similares em órgãos viscerais de pacientes indianos fatais que apresentavam Calazar, e estabeleceu que estes fossem morfológicamente relacionados aos *Trypanosomas*. Donovan fez observações similares na Índia no

mesmo ano (ROSS, 1903). A relação existente entre *Leishmania* e o desenvolvimento de lesões cutâneas foi confirmado em 1908 por Martsinovsky que se auto infectou com parasitas de cultura (KOBETS et al., 2012).

Os agentes etiológicos desta parasitose são todos pertencentes ao gênero *Leishmania*, da família dos tripanosomatídeos e, desde a década de 70, estão divididos em 4 complexos (*donovani*, *braziliensis*, *mexicana* e *hertigi*), afim de facilitar a classificação taxonômica das várias espécies do protozoário (BEATTIE; KAYE, 2011). Eles são responsáveis por um grupo de infecções cutâneas e viscerais, variando de acordo com a espécie do parasito, com diferentes apresentações clínicas e patologias subjacentes, denominadas leishmaniose tegumentar, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral (Calazar), e leishmaniose dérmica pós-Calazar (PKDL) (DE MORAIS et al., 2014).

Este largo espectro clínico se justifica, portanto, devido às 21 espécies de *Leishmania* conhecidas por infectar humanos (PAVLI; MALTEZOU, 2010)

Como exemplo de espécies causadoras das manifestações cutâneas podemos citar a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, e *Leishmania pifanoi*. As espécies envolvidas dependem da distribuição geográfica, e a doença pode se manifestar como uma ulceração cutânea simples ou difusa, em várias partes do corpo, podendo causar mutilação e desfiguração do paciente.

Já as manifestações viscerais, normalmente mais severas que as manifestações dermo-cutâneas, e podem ser causadas pela *Leishmania (Leishmania) donovani* e pela *Leishmania infantum* (similar a *Leishmania chagasi* presente no Brasil) (SANTOS et al., 2008).

No Brasil, as espécies com maior importância médica são *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (PASSERO et al., 2011).

A infecção do homem e de outros hospedeiros mamíferos se dá principalmente de forma vetorial, através da picada da fêmea de insetos Dípteros, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004). Tal agente transmissor, popularmente conhecidos como “Birigui” ou “mosquito palha” apresenta, nas diversas regiões

endêmicas, aproximadamente, 30 espécies potenciais (SANDJO et al., 2016), distribuídas em dois gêneros: *Lutzomyia* característico vetor do Novo Mundo, e *Phlebotomus* predominante no Velho Mundo (COGO et al., 2015).

Os hospedeiros silvestres dos agentes causadores das leishmanioses, até agora conhecidos, são as raposas e os marsupiais. No ambiente doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle. Entretanto, para se determinar o papel destes animais na manutenção da transmissão das leishmanioses, são necessários maiores estudos (GONTIJO; MELO, 2004).

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam, basicamente, dois estágios evolutivos de vida. O primeiro, extracelular e móvel devido a presença de flagelos (promastigota) presente do hospedeiro invertebrado e corresponde à forma infectante. Posteriormente, no organismo do hospedeiro vertebrado, após a fagocitose por células profissionais (neutrófilos, monócitos e macrófagos) (LIPOLDOVA; DEMANT, 2006) e células dendríticas (TERRAZAS et al., 2010), o parasito evolui para uma forma não móvel (sem flagelos) e intracelular (amastigotas) (BATES, 2007).

O ciclo de vida da *Leishmania* (Figura 6) se inicia no repasto sanguíneo do vetor que, durante o processo de sucção sanguínea, regurgita formas promastigotas flageladas infectantes, advindos de sua probóscida, no interior da pele do hospedeiro mamífero (BEATTIE; KAYE, 2011).

Figura 6. Ciclo biológico de leishmaniose (WHO). Fonte (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_saude_zoonoses_p1.pdf).

A picada induz rápida infiltração de neutrófilos e substancial recrutamento de macrófagos para a pele, independente da presença de parasitas, ou seja, a lesão tecidual causada pela picada já é suficiente para iniciar a resposta imune e atrair as células fagocíticas para o sítio infectante (PETERS et al., 2008; MCDONALD et al., 2010; NG et al., 2011).

Introduzidas na pele, as formas promastigotas vão perdendo gradativamente sua motilidade e são fagocitadas por células de resposta imune inata, especialmente os macrófagos, dentro dos quais se diferenciam em formas amastigotas e conseguem sobreviver ao fagolisossomo hostil (DE CARVALHO; FERREIRA, 2001; CROFT; COOMBS, 2003). Se replicam por divisão binária, até o surgimento de “ninhos” que posteriormente promoverão a lise das células infectadas, liberando os parasitas na corrente sanguínea do mamífero, podendo, em um novo episódio de fagocitose, infectar outras células ou retornar ao flebotômio em um eventual processo de hematofagia. Novamente no hospedeiro intermediário, mais especificamente no trato gastrointestinal, os parasitos evoluem para formas promastigotas, completando o ciclo (SANTOS et al., 2008)

Claramente, o estabelecimento da doença depende do sucesso do parasito em se diferenciar em formas amastigotas (SERENO et al., 2005). Uma vez promovida a infecção, os macrófagos caracterizam o principal compartimento de alocação das formas amastigotas no hospedeiro mamífero. Não obstante, o parasito, além das células fagocíticas, pode ser internalizado por células precursoras mieloides imaturas, células da medula óssea, hepatócitos e fibroblastos (BOGDAN, 2008).

O tipo de patologia decorrente da infecção depende da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, do genótipo e do estado nutricional do hospedeiro, da qualidade de sua resposta imune, do vetor e de fatores ambientais e sociais (LIPOLDOVA; DEMANT, 2006).

O tempo de incubação da doença pode variar de duas semanas a 3 meses e além da infecção assintomática, a leishmaniose pode apresentar 4 diferentes quadros clínicos, já citados (KOBETS et al., 2012).

A leishmaniose tegumentar é endêmica em mais de 70 países, com 90% dos casos registrados no Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru e Síria. É caracterizada por lesões ulcerativas na pele, e podem ser, reconhecidamente, divididas em dois subtipos:

1) Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo ou ferida oriental, que é encontrada especialmente no Oriente Médio asiático, Norte da África e Sul da Europa. Os aspectos clínicos da doença não são uniformes e podem ser modificados por formas viscerais e pelo status imunológico do paciente. Os agentes mais recorrentes no Velho Mundo são *L.major*, *L.tropica*, *L.donovani* e *L.aethiopica*.

2) Leishmaniose Tegumentar do Novo Mundo ou Americana (no Brasil, popularmente conhecida como “Úcera de Bauru”), que tem uma larga distribuição nas Américas do Sul e Central. Esta apresenta um variável espectro de manifestações cutâneas, desde uma lesão única, até lesões difusas e muco-cutâneas. Os agentes típicos da leishmaniose Americana incluem o subgênero *Leishmania*., complexos *mexicana* e *braziliensis* e o subgênero *Viannia*., complexo *braziliensis* (DE CARVALHO E FERREIRA, 2001).

A leishmaniose muco-cutânea, causada pela *L.braziliensis*, é caracterizada por lesões que levam a destruição parcial ou total dos tecidos nasais, bucais e garganta, gerando deformidades que, além de serem altamente prejudiciais do ponto de vista biológico, também levam à segregação social das vítimas, devido à

estigmatização causada pela baixa autoestima e diminuta satisfação com o corpo desfigurado pelas úlceras (VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008). Esses pacientes sofrem com graves consequências no âmbito psicossocial, e por terem menores oportunidades, acabam se afastando das relações comunitárias em grupo (HOFSTRAAT; VAN BRAKEL, 2016).

De todos os casos conhecidos de leishmaniose muco-cutânea, cerca de 90% ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Essas manifestações não são fatais em si, mas complicações associadas à infecções oportunistas e dificuldade física de alimentação, pode ocorrer agravamento do quadro e até levar à morte (DE CARVALHO; FERREIRA, 2001).

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é uma doença crônica grave, causada por espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*, e caracterizada por febres irregulares, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Apesar de ser endêmica em mais de 60 países, mais de 90% dos casos registrados ocorrem apenas em Bangladesh, Índia, Nepal, Brasil, Etiópia e Sudão, com aproximadamente 100% de mortalidade, quando não tratada (TERRAZAS et al., 2010).

No Brasil, o agente etiológico é a *L.(L.)chagasi*, espécie semelhante à *L.(L.)infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia, e acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. (GONTIJO; MELO, 2004)

Finalmente, a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), ocorre na Índia e principalmente em países africanos como Quênia e Sudão (TUON et al., 2008) Tal manifestação está intimamente associada à leishmaniose visceral e se dá muitos anos após o aparente bem sucedido tratamento da primeira (ESPUELAS et al., 2012).

Devido a fatores de risco que incluem mudanças climáticas, movimentos populacionais, turismo de longa distância e comércio (DUJARDIN et al., 2008) a doença está se espalhando. Na última década, a leishmaniose se expandiu ou surgiu em vários focos em todo o mundo como resultado da expansão do habitat do vetor devido a fatores naturais e humanos, como a urbanização, desmatamento e aquecimento global (PAVLI; MALTEZOU, 2010). A leishmaniose cutânea é um dos

10 principais doenças entre os turistas que retornam de países tropicais com problemas de pele (MACHADO et al., 2009).

Dessa maneira concluímos que a leishmaniose é, caracteristicamente, uma doença típica de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, associada com o desenvolvimento urbano, desmatamento, mudanças climáticas e à migração de grupos humanos para áreas endêmicas (CONTI et al., 2016). Novas ocorrências tem sido reportadas em áreas não endêmicas, provavelmente como consequência desses movimentos migratórios para cidades e regiões industrializadas (VASIEVICH et al., 2016).

Particularmente vulneráveis, são os indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, os HIV positivos, os usuários de drogas imunossupressoras devido a transplante de órgãos, tratamento de neoplasias ou até mesmo doenças autoimunes (MORONI; BOSSI, 1995). A co-infecção da leishmaniose com HIV (ALBRECHT, 1998) é um fator que tem contribuído desde a década de 90 para o novo perfil epidemiológico da parasitose. Esta combinação incidente tem aumentado, sendo distribuída cada vez mais por todo o mundo. Além disso, o tratamento de pacientes co-infectados tem tido altas taxas de falha e permitido recidivas, demonstrando que o sistema imune é essencial no combate da doença, seja qual for o medicamento usado (DE CARVALHO; FERREIRA, 2001).

As medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias. (GONTIJO; MELO, 2004). Em teoria, as estratégias de controle parecem adequadas, mas na prática a prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é bastante difícil, ainda mais quando associada à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais, incluindo aspectos físicos de utilização do espaço habitado.

O entendimento das interações entre mudanças do meio ambiente urbano e os flebotomíneos vetores constituem um pré-requisito para o desenvolvimento de ações apropriadas de prevenção e estratégias de controle. O controle do vetor tem sido baseado no uso de inseticida direcionado para as formas adultas, uma vez que os criadouros da espécie são pouco conhecidos.

Da mesma maneira que ocorre com a doença de Chagas, a leishmaniose continua sendo um desafio mundial, especialmente das regiões mais pobres, pois não existe um tratamento efetivo e seguro para o combate dessa moléstia e além

disso, não há nenhuma vacina segura e eficaz contra nenhum tipo de leishmaniose humana (KOBETS et al., 2012).

1.6 TRATAMENTO

As duas protozooses, alvos do presente trabalho, não têm, embora tão epidemiologicamente importantes, tratamentos de qualidade e isentos de toxicidade. As estratégias terapêuticas atuais contra leishmanioses e tripanosomíase Americana são muito limitadas (CHATELAIN; KONAR, 2015). A eficácia é variável (ESPUELAS et al., 2012), a toxicidade é alta (FOURNET; MUNOZ, 2002), o surgimento de resistência é cada vez mais comum (DE MORAIS et al., 2015) e o custo do tratamento é extremamente elevado tendo em vista as populações acometidas pelas doenças em questão (LOZANO et al., 2015).

Para o tratamento da doença de Chagas existem apenas dois fármacos nitroheterocíclicos em uso: O benzonidazol (GRUNBERG, 1974) e o nifurtimox (BOCK et al., 1972) (Figura 7), os quais são substâncias oriundas da década de 70, e ainda sofrem extrema resistência quanto às suas aprovações, especialmente pelo FDA (Food and Drug Administration).

Figura 7. Estruturas químicas do nifurtimox e do benzonidazol

Ambos os agentes terapêuticos são pró-drogas e dependem de ativação mediada por enzima (MAYA et al., 2007). A redução do grupo nitro mediada pelas citocromo P450 nitroredutases, aldeído redutases e xantina óxido redutase, gera um nitro-radical instável, que na presença de oxigênio, gera espécies superóxidos que são altamente tóxicas, não apenas para o parasito, como também para o hospedeiro (CASTRO et al., 2006).

Esses compostos têm maior atividade contra formas sanguíneas do *T.cruzi* e, portanto, apresentam certa efetividade apenas no tratamento da fase aguda da infecção, cujo processo de tratamento leva a efetividade de cura para cerca de 75% dos indivíduos (IZUMI et al., 2011). Na fase crônica são menos ativos (CASTRO et al., 2006), apresentando, apenas, por volta de 15% de cura, devido, principalmente, à suas relativas baixas meias-vidas e às pobres permeabilidades celular que os caracterizam, gerando dificuldade para os fármacos em penetrar o citoplasma das células hospedeiras, onde as formas amastigotas estão alocadas (LOZANO et al., 2015).

Outro fator que, comprovadamente influencia na baixa efetividade desses compostos na fase crônica da infecção, é o início tardio do tratamento. A intervenção farmacológica na ‘fase crônica recente’ da doença oferece um melhor prognóstico do que quando é iniciada na ‘fase crônica tardia’ (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Não obstante a tantos problemas, o tratamento é recomendado para todos os casos de fase aguda, infecção reativada, infecção por transmissão congênita e para pessoas com mais de 18 anos com infecção crônica (MALIK et al., 2015). Neste último caso, baseando-se em consenso e em padrões de evidência de melhora clínica, balanceando a razão risco-benefício entre efeitos adversos e os resultados positivos do tratamento. Cuidados especiais são necessários em pacientes com cardiomiopatia avançada e em caso de comprometimento de fígado ou rins. Tais tratamentos devem ser evitados durante a gravidez (PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Em específico, o benzonidazol [N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide], um derivado nitroimidazol, é considerado o tratamento de escolha para doença de Chagas, baseado em menores efeitos colaterais e maiores evidências de bons resultados quando comparado ao nifurtimox (BERN, 2015).

No Brasil, o único medicamento disponível para o tratamento dos indivíduos chagásicos é o benzonidazol (LAFEPE®) (COURA; DIAS, 2009), desde que o nifurtimox foi banido nos anos 80.

No entanto, o benzonidazol apresenta uma série de efeitos indesejados, entre os quais, os mais descritos são as manifestações cutâneas, como por exemplo, hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas ou esfoliativas (BERN, 2015), edemas generalizados, e também trombocitopenia púrpura, agranulocitose, leucopenia, entre outros (CASTRO et al., 2006).

Alguns efeitos colaterais, quando presentes, devem levar à pronta e imediata interrupção do tratamento, tais como dermatites associadas à febre, linfadenopatias, neuropatias periféricas e depressão da medula óssea (BERN, 2015).

Por sua vez, o nifurtimox [3-methyl-4(nitrofurfurilideneamino) tetrahydro-4H-1,4-thiozine-1,1-dioxide], um nitrofurano, tem ação inibidora da síntese do ácido pirúvico e, portanto, bloqueador específico do metabolismo de carboidratos do *T.cruzi*.

Da mesma maneira que o benzonidazol, o nifurtimox se notabiliza pela vasta apresentação de efeitos colaterais, que levaram à sua retirada do mercado no Brasil (COURA, 2013), como distúrbios gastrointestinais (anorexia, perda de peso, náusea, vômito e diarreia) que ocorrem em cerca de 70% dos pacientes (CASTRO et al., 2006). Efeitos neurotóxicos incluem dor de cabeça, mialgia, irritabilidade, insônia, desorientação e tremores. Mais sérios, porém mais raros são parestesias, polineuropatia e neurites periféricas (PÉREZ-MOLINA et al., 2015).

Estudos tóxicos experimentais com ambos os compostos antichagásicos, evidenciaram efeitos mais graves que os demonstrados na clínica, tais como efeitos deletérios em tecidos da adrenal, do cólon, do esôfago e de glândulas mamárias. O nifurtimox apresentou neurotoxicidade, danos testiculares e toxicidade ovariana. No caso do benzonidazol, houve uma inibição do metabolismo de muitos xenobióticos biotransformados pelo sistema citocromo P450 e estes metabólitos reativos afetam componentes fetais *in vivo*. Além disso, ambos exibiram significativo efeito mutagênico e mostraram ser tumorigênicos ou carcinogênicos (CASTRO et al., 2006).

Além de todos esses efeitos colaterais descritos, ambos requerem longos períodos de tratamento (benzonidazol 60 dias e nifurtimox até 90 dias). Todos esses aspectos colaboram para a baixa adesão dos pacientes ao tratamento (ESPUELAS et al., 2012).

Uma importante questão no tratamento com esses dois fármacos nitroheterociclos é que suas eficácias quimioterápicas variam em pacientes advindos de diferentes áreas geográficas. Esse comportamento é, provavelmente, relacionado com as diferentes respostas aos fármacos que as variadas cepas de *T. cruzi* promovem (URBINA; DOCAMPO, 2003) sendo algumas linhagens resistentes a um dos fármacos e, eventualmente, a ambos.

Embora determinante, a seleção do medicamento usado no tratamento não deveria ser ditado pela resposta do parasita, mas sim pela melhor tolerância do paciente aos efeitos do composto. Os efeitos indesejáveis de ambos os fármacos são a maior restrição ao seu uso, que frequentemente força, por questões físicas, o paciente a parar o tratamento (DIAS et al., 2002). Por isso entre crianças, as quais apresentam menores taxas de abandono de tratamento, tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox têm melhores perfis de resultados positivos que em jovens e adultos (TARLETON et al., 2007).

Em relação à leishmaniose, historicamente, a quimioterapia tem sido baseada na utilização de metais pesados tóxicos, como antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 8), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento há mais de 70 anos (GONTIJO; MELO, 2004).

Figura 8. Estruturas químicas do Glucantime® e do Pentostan®

Para exercer sua atividade antileishmanial, o antimonial pentavalente precisa sofrer redução, pelo sistema glutatona redutase (KOBETS et al., 2012), para sua forma trivalente dentro do macrófago infectado. O mecanismo de ação dos antimoniais não está completamente esclarecidos, mas é sabido que há o envolvimento da inibição da via glicolítica (BERMAN et al., 1987), oxidação de ácidos graxos (CROFT et al., 2006) e inibição da tripanotona redutase (WYLLIE et al., 2004).

Os antimoniais pentavalentes são indicados em todas as formas clínicas de leishmaniose, tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo. Porém a eficácia desses compostos tem mostrado significantes variações de acordo com a manifestação clínica da doença, espécies de *Leishmania* e região geográfica (PASSERO et al., 2011).

Esses fármacos apresentam vários problemas, incluindo toxicidade, baixa efetividade, esquemas prolongados de tratamento parenteral (CROFT; COOMBS, 2003), altos custos e os efeitos adversos que levam o paciente a desistir do tratamento e acabam por gerar cepas resistentes (SANTOS et al., 2008; COGO et al., 2015).

Dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão (PASSERO et al., 2011). Na Índia, por exemplo, os antimoniais pentavalentes foram virtualmente abandonados graças à emergência da irresponsividade, especialmente, da *L. donovani* e concomitante diminuição das taxa de cura da doença (OLLIARO et al., 2005). Parasitas resistentes aos fármacos demonstram ter adquirido maiores habilidades de sobrevivência *in vivo* (SEN; CHATTERJEE, 2011), seja por maior expressão de genes específicos (CARTER et al., 2006), uso inapropriado e abusivo dos medicamentos (MALTEZOU, 2010) e pela crônica exposição ao arsênio na água (PERRY et al., 2011).

Os efeitos colaterais mais típicos dos antimoniais pentavalentes são artralgia, mialgia, nefrotoxicidade, hepatite, náusea e vômito. Entre os efeitos indesejados há destaque para sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez (GOTO; LINDOSO, 2010).

Quando os medicamentos clássicos não são eficazes, outros medicamentos alternativos são indicados, como a pentamidina, o miltefosine e a anfotericina B

(Figura 9) e seus derivados modificados farmacotecnicamente (DE MORAIS et al., 2015).

Figura 9. Estruturas químicas da pentamidina, do miltefosine e da anfotericina B

Dentre os fármacos de segunda escolha, a anfotericina B se destaca por ter sido a primeira a ser introduzida no Brasil, na década de 60. Originalmente utilizada como antifúngico, a anfotericina B é de origem bacteriana e é extraída da *Streptomyces nodosus* (QUEIROZ et al., 2016).

A atividade antileishmanial da anfotericina B é atribuída à sua afinidade seletiva pelo ergosterol, um constituinte da membrana plasmática de *Leishmania*, mas não pelo colesterol, seu homólogo em células mamárias. Este fármaco induz a formação de poros aquosos na membrana do parasita, apresentando assim uma excelente atividade leishmanicida (SUNDAR et al., 2006). Suas desvantagens são a baixa hidrossolubilidade, baixa bioviabilidade, toxicidade renal (CRUZ et al., 2009), a necessidade de administração por infusão lenta (ERIKSSON et al., 2001) e reações adversas como tromboflebite e febre alta com calafrio e rigidez (PASSERO et al., 2011).

Com a intenção de melhorar a solubilidade, aumentar a eficiência e diminuir os efeitos tóxicos da anfotericina B, foram desenvolvidas uma formulação lipossomal (AmBisome®) e uma dispersão coloidal (ABCD®) (CROFT; COOMBS, 2003) que têm mostrado boas performances na Índia, Quênia e Brasil, com altas porcentagens de cura para casos de leishmaniose visceral (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). Além disso, receberam a aprovação da FDA e tornou-se o tratamento de escolha para imunodeprimidos na região do Mediterrâneo e para co-infecção HIV/leishmaniose visceral (CASTELLI et al., 2016). Tais formulações lipídicas tem como fatores limitantes a baixa estabilidade ao calor que dificulta sua ampla e segura distribuição aos centros de cuidados de saúde primários, e o alto custo, que os torna impeditivo para populações de baixa renda, como é o caso das populações das regiões endêmicas das leishmanioses (RICHARD; WERBOVETZ, 2010).

O miltefosine, um derivado alquilfosfolípídeo (hexadecilfosfocoline) é um fármaco desenvolvido como um agente antitumoral e tem ação de inibição de vias de transdução de sinais importantes para a sobrevivência celular, tais como a proteína quinase B, e por isso é, como demonstrado por Verma e Dey (2004), um indutor de apoptose.

Vários estudos multicêntricos na Índia demonstraram altas taxas de cura (por volta de 94%) para o tratamento de leishmaniose visceral com miltefosine (GONTIJO; MELO, 2004). Tal eficácia pode também ser reportada em casos de resistência a antimoniais pentavalentes (SUNDAR et al., 2002). Esta medicação apresenta a vantagem de ser de uso oral e bem tolerada, ou seja, os efeitos adversos desse medicamento são leves a moderados distúrbios gastrointestinais, que incluem vômito, diarreia e toxicidade renal (SEN; CHATTERJEE, 2011). Contudo, é um medicamento potencialmente teratogênico, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrizes (RICHARD; WERBOVETZ, 2010).

As pentamidinas (sulfato e mesilato) cujo mecanismo de ação, embora não totalmente caracterizado. Há evidências que envolvem interferência nas funções mitocondriais, e apesar de ainda se encontrarem em fase de investigação (PEIXOTO et al., 2011), já foram usadas no tratamento de leishmaniose visceral na Índia até ser totalmente abandonadas por causa do declínio da eficácia e severos efeitos colaterais (SUNDAR et al., 2006), tais como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hiperglicemia (CRUZ et al., 2009). No Novo Mundo, são ainda usadas em tratamento de leishmaniose cutânea e muco-cutânea (GOTO; LINDOSO,

2010). Em 2007 a WHO recomendou que o uso das pentamidinas seja feito apenas quando não houver outras opções viáveis.

Estas novas drogas, principalmente AmBisome e miltefosine, têm mudado o perfil do tratamento da leishmaniose visceral, mas o custo das novas terapias leva a diferentes práticas de tratamento, de acordo com a condição socioeconômica e cultural de cada região (GONTIJO; MELO, 2004).

Assim como ocorre com a Doença de Chagas, vacinas contra leishmaniose para humanos, atualmente, ainda estão em estágio de desenvolvimento, sendo a quimioterapia o melhor caminho para o controle da doença (PASSERO et al., 2010).

A resolução dessas doenças envolvem muitos fatores correlacionados, incluindo saúde pública, ciência, economia, educação, política entre outros. No entanto o mais urgente é encontrar novos fármacos para o tratamento das doenças, pois, conforme descrito, os tratamentos existentes não são adequadamente efetivos e apresentam importantes efeitos indesejados. O desafio, portanto permanece na comunidade científica (SEN; CHATTERJEE, 2011).

1.7 A BUSCA POR ALTERNATIVAS

Observando essas informações, é evidente que o tratamento dessas doenças tropicais tem desafiado as pesquisas científicas, tendo em vista que os medicamentos existentes apresentam sérios efeitos colaterais e não possuem uma boa eficácia, exigindo novas buscas de quimioterapias menos tóxicas, mais baratas e com melhor atividade terapêutica (C; FRANCO et al.; 2016).

Companhias farmacêuticas têm diminuído drasticamente seus investimentos no desenvolvimento de novos compostos para doenças tropicais. O desenvolvimento de uma nova droga normalmente requer de U\$200 a 400 milhões para um produto bem sucedido e é nítido que a perspectiva de um retorno econômico razoável é pequena. Os fatores socioeconômicos dos países onde essas doenças são endêmicas influenciam diretamente nos níveis de financiamentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas (IZUMI et al., 2011).

Entre 1975 e 2004, somente 21 dos 1556 compostos aprovados foram especificamente direcionados para NTDs, embora NTDs corresponder a 11.4% da carga global de doenças (ESPUELAS et al., 2012)

Ambos os parasitas dispõem de diversos mecanismos que subvertem a resposta imune, porém podemos levar o conhecimento sobre esses mecanismos em consideração na pesquisa e desenvolvimento de novos quimioterápicos (DE MORAIS et al., 2015).

São grandes as diferenças entre as células dos tripanosomatídeos e dos mamíferos. Tais diferenças, assim como as vias bioquímicas diferenciais devem ser excelentes alvos para o design de novos fármacos (LEE et al., 2006). As ferramentas existentes na era pós genômica podem auxiliar na ampliação de alvos e fornecer suporte para o desenvolvimento de fármacos mais específicos e menos tóxicos para o hospedeiro. Entre os possíveis alvos podemos incluir marcadores mitocondriais, vias biossintética de ácidos graxos, esteróis, carboidratos e folatos (MICHELS et al., 2006), metabolismo de purinas e pirimidinas (EL KOUNI, 2003) e aminoácidos (REINA-SAN-MARTIN et al., 2000), biossíntese, transporte e metabolismo de poliaminas (MULLER et al., 2003), e o próprio ciclo celular (HAMMARTON et al., 2003; MAYA et al., 2007).

Os critérios primários na pesquisa de novos compostos efetivos contra essas doenças é a eficácia aliada ao menor impacto de efeitos colaterais quando comparado às modalidades terapêuticas correntes (SEN; CHATTERJEE, 2011).

Estudos realizados em vários países relatam que diversas substâncias, de origem sintética ou natural, inclusive, em alguns casos, originalmente desenvolvidas para outras finalidades, demonstraram certa atividade biológica contra os agentes etiológicos da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (URBINA, 2010; ESPUELAS et al., 2012) ou contra o gênero *Leishmania*, causador das leishmanioses (SINGH et al., 2014; ZUCCA et al., 2013).

A biossíntese de esteróis é um potencial alvo em tripanosomatídeos, uma vez que apresenta diferenças importantes entre o parasito e o hospedeiro. Além disso, o parasito é totalmente dependente dos esteróis endógenos para sobreviver e crescer, e não pode utilizar o colesterol do hospedeiro como suplemento. O ergosterol, juntamente com alguns outros esteróis, é o principal produto dessa via biossintética em tripanosomatídeos e corresponde à chave de inibição da via por compostos azóis. Por isso, azóis como cetoconazol e fluconazol (originalmente antifúngicos) demonstram eficácia no tratamento de algumas formas clínicas de leishmanioses (Khatami et al., 2007), enquanto posaconazol e ravuconazol têm sido reportados em tratamento de doença de Chagas (DUSCHAK, 2011).

Molina et al. (2014) em uma triagem randomizada do posaconazol no tratamento de doença de Chagas em adultos mostraram, através de testes quantitativos de PCR, supressão da parasitemia em comparação ao pré-tratamento. No entanto, após 12 meses, 90% dos pacientes voltaram a ter níveis detectáveis de parasitos no sangue.

Sitamaquina (8-aminoquinolina) é um medicamento oral para o tratamento de leishmaniose visceral que já completou a fase II de triagem na Índia e Quênia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). O alvo molecular da sitamaquina ainda é desconhecido, porém sabe-se que pode se ligar à esteróis para transitar pela membrana e induz mudanças no potencial de membrana mitocondrial (DE MORAIS et al., 2015).

A estratégia de comutação terapêutica de medicamentos existentes gera também uma gama de alternativas, que na sua origem foram desenvolvidas para outras finalidades biológicas. Entre os fármacos introduzidos e estudadas para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses, podemos incluir antibióticos (paromomicina, azitromicina e rifamicina), anticâncer (miltefosine) redutor de ácido úrico (alopurinol), antiarrítmico (amiodarona) e antifúngicos (posaconazol e anfotericina B). No entanto, a eficácia dessas substâncias difere drasticamente dependendo da forma clínica das doenças, das espécies dos parasitos envolvidas na infecção e região geográfica. A principal vantagem dessa abordagem de utilização racional de medicamentos com outras finalidades é a economia de tempo e financiamentos para todo o processo de desenvolvimento de um novo princípio ativo eficaz e seguro (ESPUELAS et al., 2012).

O desenvolvimento de novos fármacos sintéticos e semissintéticos está diretamente relacionado com o sucesso de estudos de química medicinal, uma ciência dirigida para o delineamento e design de compostos envolvendo tecnologias avançadas, principalmente nas áreas de biologia molecular, metabolômica (CANUTO et al., 2015), biologia estrutural e química computacional (LIÑARES et al., 2006). Dessa maneira, o desenvolvimento racional de medicamentos oferece novas perspectivas no modelamento de novos princípios ativos e na melhoria da atividade daqueles que já existem (LIMA; BARREIRO, 2005).

As propriedades leishmanicidas de análogos sintéticos do stilbeno, como o resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbeno) (MACHADO PDE et al., 2015) o *trans*-3,4',5-trimethoxy-3'-amino-stilbeno (CASTELLI et al., 2016) foram estudadas

recentemente e mostraram excelentes atividades *in vitro* sobre *Leishmania infantum* ($IC_{50} = 2.6 \mu\text{g/mL}$) e com baixa citotoxicidade sobre linhagens hematopoiéticas.

Outros compostos semissintéticos de destaque são as quinoxalinas pertencem aos compostos heterocíclicos nitrogenados. Perez-Silanes et al. (2016) e Cogo et al. (2015) sintetizaram e relataram propriedades tripanocida contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi in vitro*, de 46 derivados de quinoxalinas di-substituídos e observou que as modificações mais vantajosas foram as que incluíam grupos metilsulfoxil, metilsulfonil, amina e halogênios que tiveram maiores atividades líticas e com menores valores de IC_{50} , sendo indicativos de promissores ativos.

Juntamente com o entendimento molecular e características bioquímicas dos diversos compostos testados, é igualmente importante mitigar as chances de resistência aos fármacos, e com esta cautela, o uso de compostos oriundos da natureza em combinação com medicamentos convencionais é uma atrativa opção quimioterápica a ser considerada (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

A exploração de produtos de origem natural como fonte para a descoberta de novos aliados terapêuticos remonta à pré-história e normalmente revela compostos mais toleráveis e com menores custos. Atualmente, em paralelo ao campo da moderna química farmacêutica, os estudos de busca de novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas e das leishmanioses no Reino Vegetal e Fungi tem trazido novas e boas perspectivas, devido à abundância de famílias de compostos que exibem grande conectividade molecular e estereoquímica bem definidas (SWINNEY; ANTONY, 2011; KIM et al., 2014).

Entre as novas alternativas, mais eficazes e menos tóxicas, que têm sido buscadas na natureza (seja derivadas de microrganismos ou plantas) e estudadas para o tratamento de leishmaniose, podemos citar a de Weniger et al. (2001) e Kayser et al. (2001), que testaram, contra formas promastigotas e amastigotas *in vitro*, respectivamente, extratos de plantas nativas da costa do Pacífico da Colômbia e derivados do metabólito afidicolina, isolado do fungo *Nigrospora sphaerica*. Ambos obtiveram bons resultados contra *L.(V.)panamensis* e *L.donovani* quando comparados aos padrões, e com moderada citotoxicidade.

Braga et al., 2007 utilizou extratos metanólicos de 24 plantas da medicina tradicional brasileira, popularmente usadas em desordens inflamatórias, em testes contra formas promastigotas de *Leishmania* (*L.amazonensis* e *L.chagasi*) e observou

que *Vernonia polyanthes* e *Ocimum gratissimum* foram mais ativas que os fármacos de primeira linha sobre *L.amazonensis* (IC₅₀ 4 mg/ml) e *L.chagasi* (IC₅₀ 71 mg/ml), respectivamente.

No afã da elucidação de novas entidades químicas antichagásicas, podemos citar testes desenvolvidos com nove flavonoides extraídos da *Delphinium staphisagria* que exibiram atividade tripanocida com valores de IC₅₀ baixos quando comparados ao padrão (benzonidazol) e com alta seletividade, diminuindo, portanto, a citotoxicidade, o que ficou comprovado em testes com ratos tratados com estes flavonoides, que não apresentaram sinais de toxicidade e tiveram a carga parasítica diminuída significativamente em relação ao controle negativo (MARIN et al., 2011).

Estudos recentes têm reportado que a eupomatenóide-5, uma neolignana isolada das folhas da *Piper regnellii* var. *pallenscens*, apresenta efeitos leishmanicida e antichagásico (VENDRAMETTO et al., 2010) por exibir ação associada a disfunção mitocondrial e danos oxidativos (PELIZZARO-ROCHA et al., 2011). Finalmente, extrato hidroetanólico de *Selaginella sellowii* testados por via oral e intralesional em hamsters com lesões cutâneas leishmanióticas experimentais causaram uma diminuição na amplitude da lesão, em comparação aos controles (QUEIROZ et al., 2016).

Destarte, fica esclarecido que muitos são os compostos de origem natural envolvidos em estudos antitripanosomatídeos, e metabólitos secundários de plantas têm sido amplamente investigados por suas atividades antileishmanial e antitripanosomal (LOZANO et al., 2015). Como podemos observar, independente da classe metabólica (alcaloides, terpenoides, flavonoides e outros polifenóis), significantes efeitos antiprotozoário foram observados (QUEIROZ et al., 2016).

Apesar da pesquisa contínua por fármacos de origem natural contra doenças negligenciadas, ainda permanecemos em fases experimentais e os resultados promissores precisam ser levados a cabo para que o desenvolvimento de bioativos para o combate de formas resistentes desses parasitas protozoários se torne realidade. Além disso, poucas substâncias têm sido verificadas em sistema *in vivo* de avaliação biológica, o que tem ensejado o não aparecimento de um fármaco substituto aos medicamentos atualmente utilizados (SANDJO et al., 2016).

1.8 TERPENOS E ÁCIDO URSÓLICO

Dentre as famílias de metabólitos secundários, os terpenos são extensamente explorados (aproximadamente 30.000 compostos já identificados). Este grupo é dividido de acordo com o número de unidades isoprênicas presentes em sua estrutura (mono-, sesqui-, di-, sester-, tri-, tetra-, e poli-terpenos e, em associação com esteróis, formam os grupos de isoprenoides) (DZUBAK et al., 2006).

Os derivados terpênicos apresentam um vasto espectro de atividades biológicas demonstradas, como por exemplo ação anticâncer (THOPPIL; BISHAYEE, 2011), hepatoproteção (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2011), anti-inflamatório em doenças de pele (PASSOS et al., 2013) e analgésica (CHICCA et al., 2012).

Além das atividades citadas, vários terpenos têm sido estudados contra doença de Chagas e leishmaniose. Do Socorro et al. (2003) investigou o perfil biológico do óleo essencial de *Croton cajucara*, uma planta usada na medicina tradicional brasileira para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e em processos inflamatórios, contra formas promastigotas e amastigotas de *L.amazonensis*. Tal óleo essencial é rico em linalol, um álcool terpênico presente em várias plantas. A autora observou que mesmo em pequenas doses do extrato, assim como o linalol isolado, foram capazes de matar 100% dos parasitas sem toxicidade celular. O pré-tratamento de macrófagos com o óleo diminuiu a infecção parasitária dessas células enquanto aumentou a produção de óxido nítrico, um importante fator na defesa contra os parasitas (SANTOS et al., 2008). Recentemente, bons resultados *in vitro* e *in vivo* foram publicados da ação de monoterpenos advindos do óleo essencial da *Pistacia vera* contra várias espécies de *Leishmania* (MAHMOUDVAND et al., 2016).

Segundo Lozano et al. (2015), o gênero *Salvia* também tem sido largamente explorado como fonte de compostos antiparasitários e algumas moléculas efetivas contra diferentes estágios de vida do *T.cruzi* têm sido identificados. Entre tais estruturas estão os terpenoides e seus derivados, confirmando serem estes, atrativos candidatos para o tratamento da doença de Chagas (SANCHEZ et al., 2006). Este mesmo autor testou a atividade tripanocida *in vitro* contra formas epimastigotas, de diterpenos isolados da *Salvia cuspidata* (Lamiaceae) e alguns derivados químicos menos polares preparados por substituições de grupos

funcionais e obteve excelentes resultados indicativos de potencial antitripanosomal (LOZANO et al., 2012).

Os triterpenos constituem, dentre as subclasses de terpenos, uma das mais notáveis e importantes. Durante a última década, muitos artigos foram publicados, refletindo o tremendo interesse e progresso no entendimento de alguns triterpenoides e suas variadas estruturas que podem ser apresentadas como triterpenoides livres, glicosídeos triterpênicos (saponinas) e fitoesteróis (DZUBAK et al., 2006). Do ponto de vista biológico, os mais importantes tipos de triterpenos são os oleanos, ursanos, lupanos e damarenos-eufanos (IKEDA et al., 2008).

A biossíntese dos triterpenoides em plantas está esquematizada na figura 10 e pode ser, simplificada, descrita a partir da ação da enzima Farnesil difosfato sintase (FPS) que polimeriza o isopentil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) para farnesil difosfato (FPP), o qual é convertido em squaleno pela squaleno sintase (SQS). Então a squaleno epoxidase (SQE) oxida este squaleno para 2,3-óxidosqualeno que será ciclizado pela enzima óxidosqualeno ciclase (OSC) formando intermediários catiônicos (por exemplo os cátions protosteril, dammarenil e outros não apresentados no esquema) que serão transformados em álcoois, aldeídos ou ácidos triterpênicos dependendo da enzima de finalização da biossíntese (PHILLIPS et al., 2006).

Figura 10. Esquema da biossíntese de triterpenos em plantas (PHILLIPS et al., 2006)

Já nos primeiros escritos herbários, se pode encontrar referências ao uso de plantas com grandes concentrações de triterpenoides/saponinas como *Panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Platycodon grandiflorum*, (incenso-resina indiano da árvore *Boswellia serrata*) que eram altamente valorizadas como panaceia por excelência, relacionada aos efeitos de largo alcance. Cosmopolitas, triterpenoides

são também encontrados em uma grande variedade de plantas e frutas europeias (DZUBAK et al., 2006).

Inclui-se nos estudos acerca dos triterpenoides, o isolamento e purificação a partir de várias plantas e ervas, modificações químicas, pesquisas farmacológicas sob seus efeitos benéficos, estudos toxicológicos, e o uso clínico desses compostos em várias doenças, como quimioterapias anticâncer (APARECIDA REZENDE et al., 2006; LIU, 2005) e doenças parasitárias (TAN et al., 2002).

Além dessas, diversos tipos de atividade biológica, como a atividade antiproliferativa (WU et al., 2009), anti-inflamatória (OTUKI et al., 2005) e hepatoprotetora, foram descritas para triterpenos. Autores têm verificado a diminuição da necrose de células parenquimatosas do fígado, fibrose, prevenção da cirrose crônica e intensificação da regeneração do fígado ao utilizarem triterpenos em suas pesquisas (JEONG et al., 2005; SZUSTER-CIESIELSKA; KANDEFER-SZERSZEN, 2011; YAN et al., 2010). Além disso, a terapia com ácido oleanólico por via oral tem sido empregada com sucesso na China para o tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite aguda e crônica, bem como outras desordens do fígado (MOREIRA et al., 2013; SARAVANAN et al., 2006; LIU, 1995).

Plantas do gênero vegetal *Baccharis* também apresentam efeitos microbicidas graças, principalmente à sua riqueza, entre outros metabólitos, de derivados diterpenos e triterpenos (MUELAS-SERRANO et al., 2000; PIZZOLATTI et al., 2003). Grecco et al. (2010) e Passero et al. (2011) demonstraram que o extrato metanólico de *Baccharis retusa*, contendo esses compostos, tiveram efeito *in vitro* contra formas promastigotas de espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea da doença.

Atividades antiparasitárias de diversos triterpenos foram descritas contra espécies de *Plasmodium falciparum* (STEELE et al., 1999), *Trypanosoma sp* (CUNHA et al., 2003; FERREIRA DDA et al., 2010; TAKETA et al., 2004) e espécies de *Leishmania* (TORRES-SANTOS et al., 2004; GRAZIOSE et al., 2012).

O ácido ursólico (Figura 11) é um importante representante da classe de compostos triterpenoides ursanos. É amplamente distribuído no reino vegetal e tem sido frequentemente isolado como mistura isomérica com o ácido oleanólico, particularmente em plantas medicinais que fazem parte da dieta humana (LIU, 2005).

Figura 11. Estrutura química do ácido ursólico

Embora haja tantos trabalhos acerca da farmacologia do ácido ursólico, seu mecanismo de ação ainda permanece não totalmente esclarecido (SALVADOR et al., 2012). No entanto Shanmungan et al. (2013), descreve que o AU é capaz de inibir fatores de transcrição celular, inibe receptores de fatores de crescimento, modula citocinas inflamatórias, e outros alvos moleculares intracelulares que regulam a proliferação de células.

Uma variedade enorme de efeitos farmacológicos produzidos pelo ácido ursólico têm sido reportado, incluindo proteção cardiovascular (SOMOVA et al., 2003), anti-inflamatório (OVESNA et al., 2004; MICELI et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2006), antimutagênico (APARECIDA RESENDE et al., 2006), antibacteriano (SCALON CUNHA et al., 2007), e atividade anticâncer (LIU, 2005; IKEDA et al., 2008; WIEMANN et al., 2016).

Em adição, também têm sido relatados para este triterpeno, atividade anti-stress (RICHARD, 2016), pró-inflamatória (IKEDA et al., 2008), antiulcerativa e analgésica (GUPTA et al., 1981; MAIA et al., 2006), atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (HORIUCHI et al., 2007) e atividade antitumoral (DORAI; AGGARWAL, 2004; NOVOTNY et al., 2001; OVESNA et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

Efeitos sobre patógenos periodontais (WANG et al., 2002; HOLANDA PINTO et al., 2008), potencial antitubercular contra *Mycobacterium tuberculosis* (GUA et al., 2004), antiviral contra HIV (OVESNA et al., 2004) e antifertilidade (CHATTOPADHYAY et al., 2005) também já foram descritos.

Entre as várias atividades demonstradas para esse composto, destaca-se o potencial antitumoral por inibir a proliferação celular (DE ANGEL et al., 2010; RASHID et al., 2013), e a capacidade de agir profilaticamente, prevenindo o surgimento de células cancerosas (SHANMUGAM et al., 2013; WU et al., 2009), características essas que devem ser exploradas sobre doenças que necessitam de inibição proliferativa como as tripanosomíases em questão.

Ratificando o interesse do presente trabalho, estudos como de Teles et al. (2015), Yamamoto et al. (2015) e Gnoato et al. (2008) mostram o ácido ursólico com um potente ativo contra as diversas formas de várias espécies de *Leishmania* e dados apresentados por Cretton et al. (2015), Leite et al. (2006) e Saeidnia et al. (2005) explicitam a excelente atividade tripanocida do composto em estudo.

Aliado a isso, estudos prévios desta substância por nosso grupo de pesquisa demonstrou que este triterpeno ácido possui vigorosa atividade tripanocida, *in vitro* e *in vivo*, sobre *T.cuzi*, promovendo redução de até 80% da infecção (CUNHA et al., 2006; DA SILVA FERREIRA et al., 2013), em fase aguda, além do aumento da sobrevida de animais experimentalmente infectados. Em concordância, Begun et al. (2014) e Yamamoto et al. (2014), mostraram que frações de extratos naturais contendo ácido ursólico podem ser efetivos no combate de formas promastigotas de *L.major* e na terapia de lesões causadas por um quadro de leishmaniose cutânea, o que nos motivou a continuar os estudos com este composto contra as doenças causadas por tripanosomatídeos.

Por ser, o ácido ursólico, de característica extremamente lipofílica, ele apresenta baixas absorção e consequente baixa biotransformação (LIU, 2005) quando administrado oralmente. Por isso, em nosso trabalho, fizemos testes envolvendo o composto triterpênico em uma dispersão sólida, desenvolvida no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, para conseguirmos uma melhor biodisponibilidade *in vivo* visando potencializar o seu efeito terapêutico sobre as tripanosomíases em questão.

1.9 TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Juntamente com os estudos de desenvolvimento de produtos bioativos naturais, a utilização de modificações estruturais das moléculas e o emprego de tecnologia farmacêutica tem sido benéfica para a estabilização química dos compostos, ganho de resistência à transformação metabólica, maior possibilidade de

absorção com consequente aumento da biodisponibilidade e ajustes de polaridade para modular a ligação aos receptores, a permeabilidade pelo trato gastrointestinal ou o transporte através das membranas (HARROLD; ZAVOD, 2013). Várias substâncias com potenciais biológicos nunca chegaram a ser comercializadas devido a problemas estruturais moleculares que são incompatíveis com o sistema biológico (DE OLIVEIRA ELOY et al., 2012).

Nesse sentido, é flagrante que, essas estratégias que promovem um aumento na bioviabilidade das moléculas, têm sido exploradas por diversos grupos de pesquisa em todas as partes do mundo (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014).

Métodos para suplantar estes problemas incluem redução de tamanho, utilização de surfactantes, modificações químicas, ajuste de pH, formação de complexos, formulações de pró-drogas e preparação de lipossomas (MAULVI et al., 2001).

Os benefícios das modificações farmacêuticas são exibidos nos resultados de vários trabalhos recentemente publicados. Fármacos com ação anticâncer tiveram suas eficácias aumentadas graças à aplicação de tecnologia farmacêutica por Jin et al. (2013) que testou formulações líquido-cristalina nanoestruturada contendo 20(S)-protopanaxadiol e Ragelle et al. (2012) fez nanoemulsões de flavonoides (fisetina), e ambas tiveram sua absorção oral melhorada em comparação aos fármacos livres.

Numerosas publicações recentes descrevem a utilização de formulações contendo medicamentos como nifurtimox em nano *drug-delivery systems* (SANCHEZ et al., 2002) a anfotericina B em lipossomas (SANTOS et al., 2008; KOBETS et al., 2012), benzonidazol em dispersões sólidas (FONSECA-BERZAL et al., 2015) e a paramomicina em nanopartículas sólido-lipídicas (HEIDARI-KHARAJI et al., 2016) testados *in vitro* ou *in vivo* contra as várias formas evolutivas de diversas cepas dos parasitas causadores da doença de Chaga ou leishmanioses.

O triterpeno ácido ursólico apresenta sérios problemas de solubilidade, e por isso, para uma atividade biológica mais duradoura e efetiva, é nítido que aplicações farmacotécnicas são bem-vindas, uma vez que a solubilidade é um fator essencial no desenvolvimento de medicamentos (KOTTA et al., 2012). A sua alta hidrofobicidade faz com que haja restrições em futuras aplicações clínicas (GONG et al., 2012).

De acordo com essas informações e a real necessidade de alterar as propriedades desse composto a fim de aumentar sua eficácia, e gerar tratamentos

viáveis, muitos grupos de pesquisa empregaram o ácido ursólico em estruturas farmacotécnicas como nanolipossomas em testes antitumor (ZHU et al., 2013), em nanopartículas de poli(N-vinilpirrolidona)-block-poli(ε-caprolactona) como inibidor de crescimento de carcinoma hepático (ZHANG et al., 2015) e em nanopartículas de quitosana em testes antiangiogênese (JIN et al., 2016). Em todos, os resultados foram estimulantes no sentido de investir em tecnologia farmacêutica, além de abrirem novas janelas para a utilização desse composto.

Entre as tecnologias disponíveis, uma das mais eficazes são as dispersões sólidas. Estas são definidas como misturas de fármacos moleculares ou amorfas de baixa solubilidade com carreadores hidrofílicos, biologicamente inertes (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014) que melhoram o perfil de dissolução da droga (VERHEYEN et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2007). O uso farmacêutico desse tipo de sistema foi pela primeira vez estudado por Sekiguchi et al. (1964), e desde então, numerosos trabalhos têm sido publicados demonstrando o uso vantajoso dessa técnica na formulação de vários medicamentos (VO et al., 2013).

Tal efeito pode ser observado em resultados relatados por Onoue et al. (2014) que utilizou dispersões sólidas contendo nobiletina, uma flavona cítrica polimetoxilada, com o objetivo de aumentar suas propriedades biofarmacêuticas e hepatoprotetoras. Já Palmeiro-Roldán et al. (2014) produziu e testou dispersões sólidas contendo benzonidazol, em camundongos chagásicos e, além de alcançar uma melhora de solubilidade, conseguiu apresentar um perfil terapêutico mais vantajoso que o fármaco livre, relacionado a melhor biodisponibilidade.

Finalmente, o ácido ursólico também já fora aplicado em dispersões sólidas por Eloy et al. (2014) e demonstraram ter uma melhor solubilidade e atividade sobre cepas de *Trypanosoma cruzi*, motivando-nos a mergulhar no estudo dessa molécula e sua atividade, tanto em sua forma livre como contida em uma dispersão sólida contendo 10% de princípio ativo.

Tendo em vista os resultados prévios de nosso grupo com o ácido ursólico e levando em consideração a importância da aplicação de tecnologia farmacêutica sobre o nosso composto, visamos nesse trabalho, testar o ácido ursólico em sua forma livre e em dispersão sólida como alternativas para colaborar e ratificar a ideia de que a busca por novos ativos, menos tóxicos e mais viáveis contra as doenças causadas por tripanosomatídeos é de fundamental importância na saúde pública do Brasil e da América Latina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* do triterpeno ácido ursólico (AU) isolado e em dispersão sólida (DSAU), sobre tripanosomatídeos agentes etiológicos da doença de Chagas e leishmaniose cutânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a citotoxicidade do AU e de DSAU, sobre células LLMCK2 e P388DI, não infectadas, em protocolo *in vitro*, baseando os próximos passos do trabalho, que empregará formas amastigotas intracelulares dos parasitas.

2.2.2 Determinar a atividade biológica tripanocida *in vitro* do triterpeno ácido ursólico (AU), assim como de sua associação com benzonidazol (1:1) (AS) e de sua dispersão sólida (DSAU), contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*,

2.2.3 Averiguar a atividade biológica leishmanicida do triterpeno ácido ursólico (AU), assim como de sua associação anfotericina B (1:1) (AS) e de sua dispersão sólida (DSAU), contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis*, em protocolo *in vitro*.

2.2.4 Avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de AU e DSAU sobre doença de Chagas experimental através de ensaios utilizando animais experimentalmente infectados e tratados por via oral, nas doses 8 e 20 mg/Kg durante 20 dias.

2.2.5 Quantificar a carga parasitária tecidual no coração e fígado de animais tratados por AU e DSAU, por via oral, durante vinte dias, nas doses 8 e 20 mg/Kg.

2.2.6 Avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de AU e DSAU sobre leishmaniose cutânea experimental, através de ensaios utilizando animais experimentalmente infectados e tratados por via oral, nas doses 8 e 20 mg/Kg durante 20 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP apreciou e aprovou o presente trabalho sob o protocolo nº 2012.1.1702.53.3, por estar de acordo com os princípios éticos requeridos na experimentação animal.

3.2 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram requeridos junto ao Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 104 camundongos albinos da linhagem Balb/c, sendo 64 machos (para estudos de doença de Chagas experimental) e 40 fêmeas (para estudos de Leishmaniose experimental), pesando aproximadamente 20 g cada.

Os grupos experimentais foram formados aleatoriamente conforme descrito na seção 3.12 e 3.14, e após separados, foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*.

3.3 COMPOSTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

O triterpeno ácido ursólico (AU) (Figura 1) foi adquirido comercialmente da SIGMA-ALDRICH®, assim como o benzonidazol (BZ), a anfotericina B (AnB) e o Glucantime® (Glu), os quais analisamos em associações (AS) na proporção 1:1 com nosso fármaco candidato. Além disso, os testamos em todos os ensaios, em paralelo, para fins de comparação das atividades biológicas *in vitro* e como controle positivo, em ensaios *in vivo*.

A dispersão sólida contendo o ácido ursólico 10% (DSAU) foi obtida segundo protocolo desenvolvido e validado por De Oliveira Eloy et al. (2012), e cedida gentilmente pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. As partículas da dispersão sólida têm tamanho médio de 50 µm e são constituídas de Polaxamer 470, caprato de sódio e ácido ursólico, nas proporções (8:1:1), ou seja, contendo 10% do composto de interesse. Essa baixa proporção, aliada a solubilidade em água da dispersão sólida, permitiu-nos, para ensaios com essa formulação, utilizarmos dosagens maiores, *in*

vitro. Dispersão sólida com mesma constituição, porém isentas de AU foram testadas paralelamente em todos os ensaios.

Para ensaios *in vitro*, soluções estoques com concentração inicial de 20 mM de AU, benzonidazol e anfotericina B, assim como de suas associações, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). Alíquotas destas soluções estoques foram adicionadas ao meio contendo as formas parasitas ou células, de maneira a se obter concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128 μ M para cada substância. De maneira distinta, a solução estoque de DSAU foi preparada em água, devido a sua solubilidade. Destarte, nos testes com a dispersão sólida, adicionamos às concentrações citadas, as concentrações 512 e 1024 μ M. Por isso, a concentração da solução estoque dessa formulação foi de 64 mM.

3.4 PARASITAS

Para o presente trabalho foi utilizado o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, a qual é capaz de expressar a enzima β -galactosidase, o que confere à essa cepa uma especial característica para quantificação do número de parasitos, independente de estarem ou não no interior da célula hospedeira, por metabolização de substrato *Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside* (CPRG; Roche, Indianapolis, Ind.) gerador de cor púrpura, detectável em espectrofotômetro.

Em relação aos ensaios com parasitos do gênero *Leishmania* foi utilizada a linhagem (MHOM/BR/75/M2903) da espécie *Leishmania braziliensis*, responsável pelo desenvolvimento de leishmaniose muco-cutânea.

3.5 MANUTENÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS

Células da linhagem LLCMK2 (NORVAL, 1979), utilizadas para análise de citotoxicidade do AU, e nos ensaios sobre formas amastigotas de *T.cruzi*, foram mantidas por meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab®), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 μ g/mL) e ciprofloxacina (10 μ g/mL). Já as células P388DI utilizadas nos ensaios sobre formas amastigotas de *L.braziliensis* foram mantidas por meio de cultivo M199, com os mesmos suplementos.

Os cultivos foram mantidos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, sendo o meio renovado a cada dois dias, assim como parte das células removidas uma vez por semana.

3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A ação citotóxica de AU e DSAU, foi avaliada pelo método colorimétrico de XTT (X-4251Sigma-Aldrich®), o qual é utilizado para analisar atividade biológica *in vitro* assim como a viabilidade de células em cultura. Esse método é baseado na redução do sal de sódio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) por desidrogenases mitocondriais que produzem cristais de formazan (POLANCO-HERNANDEZ et al., 2013). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. As células da linhagem LLMCK2, cultivadas como descrito acima, foram desprendidas de sua cultura e 100 µL de meio contendo as células ($1,0 \times 10^5$ células/mL contados por meio de câmara de Neubauer) foram aliquotados na placa na presença de AU e benzonidazol nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM.

Esse sistema foi incubado por 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse tempo, foi adicionado a cada poço, 10 µL de solução de XTT (1 mg/mL), e a placa foi novamente incubada por 3 horas até que ocorresse a redução do sal de triazol. A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro Sunrise (TECAN®) a 460 nm.

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e como controle negativo, células sem nenhum tratamento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após as leituras, a citotoxicidade, ou porcentagem de lise de células, das formulações foram determinadas a partir da seguinte fórmula:

% Citotoxicidade = $100 - \{[(X-CP)/(CN-CP)] \times 100\}$, na qual:

X = Valor de densidade óptica das amostras;

CP = Valor de densidade óptica dos controles positivos;

CN = Valor de densidade óptica dos controles negativos.

3.7 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* CL Brener foram cultivadas a 28°C com meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina, como descrito por Castellani et al. (1967). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nas quais, 100 µL de meio de cultivo contendo formas epimastigotas ($1,0 \times 10^7$ formas/mL) obtidos de cultivo em fase logarítmica de crescimento, foram aliquotados na presença de AU e AS (1AU : 1BZ) nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM. Paralelamente, fizemos a avaliação com benzonidazol, nos mesmos moldes.

Essas placas foram incubadas por 72 horas a 28°C. Após esse tempo, foi adicionado a cada poço, 50 µL de solução (400 µM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) de *Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside* (CPRG; Roche, Indianapolis, Ind.) (1 mg/mL), e a placa foi novamente incubada por 6 horas até que ocorresse a metabolização do substrato pela β-galactosidase (BUCKNER et al., 1996). A reação colorimétrica foi quantificada em espectrofotômetro Sunrise (TECAN®) a 570 nm.

Após as leituras, as porcentagens de lise parasitária, causadas pelas formulações foram determinadas a partir da seguinte fórmula:

% Lise = $100 - \{[(X-CP)/(CN-CP)] \times 100\}$, na qual:

X = Valor de densidade óptica das amostras;

CP = Valor de densidade óptica dos controles positivos;

CN = Valor de densidade óptica dos controles negativos.

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e como controle negativo, tratamento com DMSO 1,6%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* CL Brener foram cultivadas em cultura celular de linhagem LLMCK2, em garrafas de cultura, em meio RPMI 1640 (Sigma®) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab®), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 µg/mL) e ciprofloxacina (10 µg/mL) a 37°C em

ambiente a 5% de CO₂. Após um período de 5 dias de infecção, inicia-se o processo de lise celular e liberação das formas tripomastigotas para o meio. Esse sobrenadante infectado foi removido e utilizado para o ensaio.

Em placas de 96 poços, 100 µL de meio de cultivo contendo formas tripomastigotas ($1,0 \times 10^6$ formas/mL), foram aliquotados na presença de AU e AS (1AU:1BZ) nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM. Paralelamente, realizamos a avaliação com benzonidazol, nos mesmos moldes.

Esse sistema foi incubado por 24 horas, a 37°C. Após este período, foi adicionado a cada poço, 50 µL de solução (400 µM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) de *Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside* (CPRG; Roche, Indianapolis, Ind.) (1 mg/mL), e as placas foram novamente incubadas por 6 horas até que ocorresse a metabolização do substrato pela β-galactosidase. A reação colorimétrica foi quantificada em espectrofotômetro Sunrise (TECAN®) a 570 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de lise parasitária, da mesma maneira como já descrito em 3.7.

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e como controle negativo, tratamento com DMSO 1,6%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

A avaliação biológica da atividade de AU e DSAU sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* CL Brener foi feita utilizando o Kit FluoReporter® LacZ/Galactosidade, que consiste em um método de quantificação dos níveis de atividade de β-galactosidase através de um substrato fluorogênico *3-carboxy-umbelliferyl-β-D-galactopyranoside* (CUG), seguindo as instruções do fabricante (Molecular Probes Life Technologies®). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. As células da linhagem LLMCK2, cultivadas como descrito em 3.5, foram desprendidas de sua cultura e 100 µL de meio contendo as células ($1,0 \times 10^5$ células/mL contados por meio de câmara de Neubauer) foram aliquotados na placa. Após 12 horas (*over night*), $1,0 \times 10^6$ formas tripomastigotas/mL de *Trypanosoma cruzi* CL Brener foram adicionadas a cada poço e incubados por 24 horas a 37°C em

estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de incubação, os poços foram lavados com meio RPMI-1640 para a retirada de formas tripomastigotas extracelulares. Os compostos em análise foram então adicionados nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM de AU, AS e benzonidazol, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM.

Esse sistema foi incubado por 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se a cada poço, 100 µL de solução Triton X-100 0,1% (v/v) afim de promover a lise das células e liberar a enzima β-galactosidase em solução. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a reação enzimática foi iniciada com a adição de 10 µL de solução 10 mM de substrato (CUG) em cada poço e a placa foi incubada novamente durante 30 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, após esse tempo, 50 µL de uma solução de finalização (Na₂CO₃ 0,2 M) foram adicionados em cada poço, parando a reação enzimática. A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro Synergy H1(Eppendorff®) a 390 nm (emissão) 460 nm (excitação) (Software Gen 5 2.01)

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e células da linhagem LLMCK2, e como controle negativo, células parasitadas tratadas com DMSO 1,6%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após as leituras, a atividade biológica das formulações foi determinada e os resultados foram expressos em porcentagem de lise parasitária, da mesma maneira como já descrito em 3.7.

3.10 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

O cultivo axênico dos parasitas ocorreu em meio M199 (Sigma®), suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina, a 22°C.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nas quais, as 100 µL de meio de cultivo contendo formas promastigotas ($1,0 \times 10^7$ formas/mL) obtidos de cultivo em fase logarítmica de crescimento, foram aliquotados na presença de AU e AS (1AU:1AnB) nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM.

Paralelamente, fizemos o teste com anfotericina B, nos mesmos moldes.

Esse sistema foi incubado por 72 horas a 22°C. Após esse tempo, a avaliação da atividade foi realizada pela técnica colorimétrica do XTT (X-4251 Sigma-Aldrich®). A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro Sunrise (TECAN®) a 460 nm.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a porcentagem de lise parasitária foi determinada, da mesma maneira como já descrito em 3.7.

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e como controle negativo, tratamento com DMSO 1,6%.

3.11 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

A avaliação biológica da atividade de AU e DSAU sobre formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* foi realizada em placas de 96 poços. As células (macrófagos) da linhagem P388D1, cultivadas como descrito em 3.5, foram desprendidas de sua cultura e 100 µL de meio contendo as células ($1,0 \times 10^5$ células/mL contados por meio de câmara de Neubauer) foram aliquotados na placa. Após 12 horas (*over night*), $1,0 \times 10^6$ formas promastigotas/mL de *Leishmania braziliensis*, de cultivo axênico, foram adicionadas a cada poço e incubados por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de incubação, os poços foram lavados com meio M199 para a retirada de formas promastigotas extracelulares. As formulações em análise foram então adicionadas nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM de AU e AS, e na presença de DSAU nas concentrações finais de 0,5; 2; 8; 32; 128; 512 e 1024 µM.

Esse sistema foi incubado por 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante de cada poço foi retirado e 50 µL de solução de tripsina (0,25%) foram adicionados a fim de promover o desprendimento das células do fundo da placa.

Observado o total desprendimento em microscópio, 15 µL de cada amostra foram coletados e reunidos, em tubo eppendorf, a 15 µL de corante (verde fluorescente) específico para ácidos nucleicos (SYTO® 9 green – Life Technologies™) e a porcentagem de formas amastigotas foi determinada em citômetro baseado em imagem (Tali®, Life Technologies™).

Os ensaios tiveram como controle positivo, poços contendo apenas meio de cultura e células da linhagem P388DI, e como controle negativo, células parasitadas tratadas com DMSO 1,6%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após as leituras, a atividade biológica das formulações foram determinadas e os resultados foram expressos em porcentagem de lise parasitária, da mesma maneira como já descrito nos métodos anteriores.

3.12 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA *IN VIVO* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Os ensaios foram realizados utilizando-se camundongos albinos, machos linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 20 g cada. Todos os animais foram infectados experimentalmente com inóculo intraperitoneal de 2×10^4 formas tripomastigotas advindos de cultura celular. Em seguida foram divididos randomicamente em 8 grupos de 8 animais cada, segundo descrição a seguir, e iniciou-se o tratamento por via oral (gavagem), 48 horas após a infecção, com duração de 20 dias. Foram analisados os potenciais terapêuticos de AU e DSAU, através da contagem parasitêmica, análise de sobrevivência (NEERVANNAN, 2006) e quantificação de parasitas teciduais por PCR em tempo real.

Os grupos experimentais utilizados foram:

- Grupo I – Controle negativo – 8 animais tratados com solução de DMSO a 5% em solução fisiológica (solvente utilizado na dissolução das substâncias)
- Grupo II e III – Controle positivo – Animais tratados com benzonidazol, sendo 8 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg).
- Grupo IV e V – Tratamento UA – Animais tratados com ácido ursólico (AU), sendo 8 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg)
- Grupo VI e VII – Tratamento DSAU – Animais tratados com dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), sendo 8 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg)
- Grupo VIII – Controle Placebo – Animais tratados com dispersão sólida isenta de ácido ursólico (20 mg/Kg)

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*.

As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de 5 µL de sangue da cauda de cada animal em experimentação, a cada dois dias, até o final do tratamento, sendo o número de parasitas quantificado de acordo com a técnica de Brener (1962). Os dados obtidos foram avaliados de acordo com o tempo de sobrevivência dos animais e estatisticamente avaliados a fim de compararmos as possíveis diferenças de comportamento entre os grupos experimentais.

3.13 PCR EM TEMPO REAL - QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS EM AMOSTRAS TECIDUAIS

Ao final do tratamento via oral proposto, 3 animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento de cervical e foram retirados, imediatamente, o fígado e o coração de cada um deles. Os órgãos foram perfundidos com solução fisiológica 0,9% para a retirada do excesso de sangue e consequentemente das células do parasita extracelulares do interior das amostras, e armazenados em freezer a - 80°C, a fim de fazermos a quantificação de parasitas presentes nos órgãos analisados por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

Nos grupos em que houve animais com uma sobrevivência de pelo menos 180 dias, sugerindo cronificação do quadro da doença de Chagas, foram selecionados 2 animais sobreviventes de cada grupo e o mesmo procedimento de quantificação foi aplicado.

3.13.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Para proceder a extração do DNA dos tecidos, uma fração do órgão (coração ou fígado) foi pesada e submetida às etapas do processo estabelecido pelo kit comercial *RealiaPrep™ dDNA Tissue Miniprep System*, seguindo as instruções do fabricante (Promega®) (ZUCOL et al., 2006). A massa de cada amostra foi utilizada *a posteriori* para o cálculo de número de parasitas por unidade de massa de tecido.

3.13.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA TOTAL

O DNA extraído foi em seguida quantificado utilizando o aparelho Qubit™ Assays segundo as instruções do fabricante (Invitrogen®). Após a

quantificação, todas as amostras tiveram sua concentração ajustadas para 10 ng/ μ L com água MilliQ autoclavada.

3.13.3 INTEGRIDADE DO DNA – ELETROFORESE

Após extraídas e quantificadas as amostras, passou-se a análise da integridade do material genético e verificação de possíveis fragmentações indesejadas. Tal avaliação foi feita por separação eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 8.0). Como tampão de carregamento, foi usado Gel *Loading Dye Blue* 6X (Biolabs®, USA).

As amostras foram preparadas para a corrida eletroforética de acordo com os valores descritos na Tabela 1.

Primeiramente, foi adicionado ao DNA amostral o tampão de carregamento (*loading buffer*), responsável pelo aumento da densidade do material genético e adição de agentes de mobilidade e doação de cor.

Na mesma amostra também foi acrescido um corante fluorescente para ácidos nucleicos (gel *red* (1:500)) que ao se ligar ao DNA emite intensa fluorescência quando exposto à luz ultravioleta.

Tabela 1 - Preparo das soluções amostrais para eletroforese

Amostra	Marcador Padrão
10 μ L DNA amostral	15 μ L DNA <i>ladder</i>
2 μ L <i>loading buffer</i>	3 μ L Gel <i>red</i>
3 μ L Gel <i>red</i>	-

3.13.4 DELINEAMENTO DE CURVAS PADRÃO

Uma vez verificada a integridade das amostras de DNA, passou-se a confecção das curvas padrão.

Foram construídas duas curvas padrão. A primeira a partir de diluições seriadas de DNA extraído de cultura de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e a segunda com diluições seriadas de DNA extraído de tecido hepático de camundongo Balb/c, a fim de quantificarmos o DNA do hospedeiro mamífero nas amostras.

Cada curva apresenta uma equação, através da qual é possível calcular a quantidade de fitas de DNA presentes na amostra, em função do Cq (indica o ciclo no qual a amostra iniciou a emissão de sinal fluorescente de amplificação). A partir daí, temos parâmetros para proceder aos cálculos matemáticos.

3.13.5 PRIMERS

Os *primers* utilizados na amplificação de amostras de *Trypanosoma cruzi* estão representados na tabela 2 (CUMMINGS; TARLETON, 2003). As sequências iniciadoras *forward* e *reverse* foram utilizadas nas concentrações 1 μ M. Para o procedimento da reação foi utilizado o kit *Master mix SYBR* (KAPA®) no qual estão contidos todos os insumos necessários (enzimas e nucleotídeos) para a realização da reação.

O material genético do camundongo também foi amplificado e quantificado em ensaios paralelos, através do gene de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), específico para camundongos, a fim de normalizarmos nossos valores, fazendo cálculos matemáticos relativos, excluindo diferenças na pesagem da amostra.

Os *primers forward* e *reverse* concernentes ao GAPDH também estão expressos na tabela 2, e foram utilizados nas concentrações 10 μ M. Da mesma maneira, a reação foi processada utilizando o kit *Master mix SYBR* (KAPA®).

Tabela 2 – *Primers forward e reverse para Trypanosoma cruzi e para GAPDH*

Primers			Concentração - μ M
<i>T.cruzi</i>	<i>forward</i>	5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3'	1
	<i>reverse</i>	5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'	1
GAPDH	<i>forward</i>	5'-GACTTCAACAGCAACTCCCAC-3'	10
	<i>reverse</i>	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	10

3.13.6 PREPARO DE AMOSTRAS E REAÇÕES RT-PCR

As soluções amostrais, todas na concentração 10 ng/ μ L foram amplificadas em placas de 48 poços, específica do equipamento termociclador, em duplicatas. O volume final aplicado em cada poço foi de 20 μ L conforme descrito na tabela 3, para *T.cruzi* e para GAPDH.

Tabela 3 – Constituição final, por poço, das amostras aplicadas na placa de 48 poços para a amplificação do material genético de *Trypanosoma cruzi* e para a amplificação do gene GAPDH.

<i>T.cruzi</i>		GAPDH	
Amostra	2 μ L	Amostra	2 μ L
<i>Primer forward</i>	4 μ L	<i>Primer forward</i>	4 μ L
<i>Primer reverse</i>	4 μ L	<i>Primer reverse</i>	4 μ L
Mix SYBR	10 μ L	Mix SYBR	10 μ L

Após seladas e centrifugadas a 1000 rpm por 90 segundos, as placas foram colocadas no termociclador (Illumina®), obedecendo o programa de ciclo de temperaturas expresso na Figura 12.

Figura 12. Programa de temperatura no termociclador

Ao final das amplificações, o programa EcoStudy, gerou valores de Cq para cada amostra. Obedecendo às equações das curvas padrão, calcularam-se as quantidades de DNA presentes nas amostras. Fizeram-se as médias para cada amostra e os valores com desvio padrão maior que 0,5 foram excluídos.

Em todas as placas, foram processadas as amplificações de controles de *T.cruzi*, GAPDH e água, em duplicatas.

3.13.7 EFICIÊNCIA DA AMPLIFICAÇÃO E CÁLCULOS

A fórmula utilizada em experimentos de PCR-RT para determinação da eficiência (E) da amplificação é:

$$E = [10^{(-1/slope)} - 1],$$

na qual *slope* é a inclinação da reta da curva padrão.

A partir da determinação dos valores das quantidades de DNA de *T.cruzi* e GAPDH, foram feitos os seguintes cálculos:

- 1) número de fitas de *T.cruzi* / número de fitas de GAPDH, para expressar, dessa maneira, a quantidade de parasitas por células de tecido do camundongo.
- 2) número de fitas de *T.cruzi* / massa de amostra (ng), para expressar, dessa maneira, a quantidade de parasitas por unidade de massa do tecido.

3.14 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA *IN VIVO* SOBRE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

Os ensaios foram realizados utilizando-se camundongos albinos, fêmeas linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 20 g cada. Todos os animais foram infectados experimentalmente com 2×10^6 formas promastigotas de *L.braziliensis*, inoculados subcutaneamente na base da cauda. Em seguida foram divididos randomicamente em 8 grupos de 5 animais, cada. Os tratamentos propostos por via oral (gavagem) iniciaram-se após o período pré-patente da doença, com duração de 20 dias (exceto o controle positivo – Glucantime® – Intraperitoneal, 15 dias) (LIMA et al., 2010), nos quais foram analisados os potenciais terapêuticos de AU e DSAU, através da medida das lesões cutâneas causadas pela infecção. Os grupos experimentais foram:

- Grupo I – Controle negativo – 5 animais tratados com solução de DMSO a 5% em solução fisiológica (solvente utilizado na dissolução das substâncias)
- Grupos II e III – Controle positivo – Animais tratados com Glucantime® (Intraperitoneal – 15 dias), sendo 5 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg).

- Grupo IV e V – Tratamento AU – Animais tratados com ácido ursólico (AU), sendo 5 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg)
- Grupo VI e VII – Tratamento DSAU – Animais tratados com a dispersão sólida contendo ácido ursólico (DSAU), sendo 5 animais para cada dosagem (8 mg/Kg e 20 mg/Kg)
- Grupo VIII – Controle Placebo - Animais tratados com dispersão sólida isenta de ácido ursólico (20 mg/Kg)

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Durante o período de tratamento, as extensões das lesões foram avaliadas utilizando-se paquímetro digital (Mitutoyo, Kawasaki®, Japan), a cada 3 dias. Essa avaliação foi utilizada como parâmetro clínico auxiliar de cura.

3.15 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística foi realizada por meio do programa Prisma v.5.0. Nos testes *in vitro*, a concentração inibitória (IC₅₀) foi calculada pela curva dose-resposta sigmoideal. Para os testes *in vivo*, foram empregados os métodos estatísticos de Kruskal-Wallis ou One-way ANOVA, com testes complementares correspondentes mais adequados para cada tipo de avaliação, com o objetivo de estabelecer os níveis de atividade dos compostos. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca por novas entidades terapêuticas para o tratamento de doenças como doença de Chagas e leishmaniose, o reino vegetal apresenta-se como uma formidável fonte de possibilidades (SEN; CHATTERJEE, 2011). Extratos de plantas, frações de extratos e compostos purificados, têm sido extensivamente testados em diferentes tipos de experimentos objetivando encontrar fármacos mais efetivos e menos tóxicos (CAMARGOS et al., 2014).

Pesquisas nessa área apresentam-se para os cientistas, sem dúvida, como um grande desafio, pois além de requerer estudos multidisciplinares, envolvendo estudos de botânica, fitoquímica, parasitologia, toxicologia e medicina, ainda depende de avanços tecnológicos nos modelos biológicos empregados para avaliar os resultados encontrados com perícia e validade (FOURNET; MUNOZ, 2002).

Certamente, a investigação da atividade antiprotozoária, especificamente, de metabólitos secundários de plantas tem sido de contribuição crucial para o desenvolvimento de novas quimioterapias antiparasíticas (KASHYAP et al., 2016). Na literatura já foram reportados vários alcaloides, antraquinonas, chalconas, flavonoides e terpenos com atividade inibitória sobre *Leishmania* (SCHMIDT et al., 2012; ROCHA et al., 2005) e espécies de *Trypanosoma* Africano (HOET et al., 2004). Por isso, as avaliações de potencial antiparasítico de metabólitos previamente isolados, pertencentes a essas classes, têm sido motivadas (SANDJO et al., 2016).

O grande interesse acerca dos triterpenos é justificado pela ampla indicação de atividades farmacológicas obtidas em testes utilizando esta classe de metabólitos secundários vegetais (IZUMI et al., 2011; GERBETH et al., 2013; LI et al., 2013; MOREIRA FDE et al., 2013).

O ácido ursólico é um representante da classe dos triterpenos, tendo apresentado muitas atividades biológicas como ações antitumoral (CUNHA et al., 2008; LIU, 1995), antimutagênica (APARECIDA RESENDE et al., 2006), antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2008), analgésica, e anti-inflamatória (SPESSOTO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2006) e mostra-se amplamente distribuído no reino vegetal.

Algumas das espécies de plantas das quais o ácido ursólico já fora extraído e testado em sistemas biológicos são *Kleinia odora* (AL MUSAYEIB et al., 2013) *Lantana camara* (BEGUM et al., 2014) *Miconia* sp. (CUNHA et al., 2003) *Baccharis*

uncinella (PASSERO et al., 2010) *Dracocephalum subcapitatum* (SAEIDNIA et al., 2005) *Salvia cilicica* (TAN et al., 2002) *Pourouma guianensis* (TORRES-SANTOS et al., 2004) *Miconia langsдорffii* (PEIXOTO et al., 2011) *Cornus officinalis* (CHEN et al., 2011) *Folium Eriobotryae* (LI et al., 2015) *Oldenlandia diffusa* (ZHAO et al., 2015; WU et al., 2009) *Sambucus chinensis* (LIAO et al., 2005) *Pulsatilla chinensis* (LIU et al., 2013) *Staphylea holocarpa* (NOVOTNY et al., 2001) *Eriobotrya japonica* (QIAN et al., 2015) casca de maçã (MA et al., 2005) e muitas outros vegetais populares, incluindo, manjeriço, mirtilo, amora, sabugueiro, hortelã-pimenta, alecrim, lavanda, orégano, tomilho e ameixa (YANG et al., 2012).

Embora presente em tantos vegetais, nós fizemos, no presente trabalho, a utilização do ácido ursólico adquirido comercialmente, para evitarmos as eventuais perdas de concentração em um processo de extração ineficaz (ZHAO et al., 2015) e as influências de outros compostos isoméricos (LI et al., 2011) ou de outras classes moleculares, que poderiam interferir, positiva ou negativamente na atividade tripanocida e leishmanicida do triterpeno de interesse. Foi possível determinarmos, desse modo, a ação do composto isolado.

Muitos estudos já reconheceram o ácido ursólico, como sendo possuidor de atividades tripanocida (COGO et al., 2015) e leishmanicida (YAMAMOTO et al., 2015), e apresentando baixa toxicidade em diferentes modelos experimentais (WANG et al., 2013; ALVARADO et al., 2015), propondo, dessa maneira, ser este composto um interessante protótipo para o tratamento dessas doenças.

4.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Nos experimentos *in vitro*, valores de absorbância obtidos nas leituras espectrométricas das placas, pelos diferentes métodos colorimétricos (CPRG, XTT ou FluoReporter® LacZ/Galactosidase), ou pela citometria baseada em imagem, foram plotados como descrito. A partir desses valores obtivemos as porcentagens de lise celular, e construímos gráficos em função do logaritmo das concentrações. Por regressão não linear da curva, obtivemos o IC₅₀ para cada uma das substâncias testadas. Esse indicador mostra a concentração necessária para induzir a lise de 50% das células (TAN et al., 2002). Ou seja, quanto menor o IC₅₀, maior a atividade biológica da substância em questão.

4.1.1 CITOTOXICIDADE DE AU E DSAU SOBRE CÉLULAS LLCMK2

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* aplicam-se na indicação da segurança ou não, de compostos em fase de testes, ao demonstrarem que estes geram danos biológicos às estruturas celulares, causando a lise celular da linhagem submetida ao desafio, sendo considerada, portanto, citotóxica. Por outro lado, após a exposição por tempo determinado, não promovendo lise das células, os compostos podem ser considerados seguros para iniciar estudos *in vivo*.

Nestes experimentos, o IC_{50} demonstra o potencial citotóxico do fármaco, de maneira inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o seu valor, menor sua ação citotóxica.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade de AU e DSAU, sobre a linhagem celular LLCMK2, demonstrados na tabela 4 e na figura 13, caracterizam o baixo efeito citotóxico de nossas substâncias de interesse, após 72h de exposição das células aos fármacos. As baixas porcentagens de lise celular apresentadas em todas as concentrações impossibilitaram o cálculo de IC_{50} , que teriam valores muito elevados.

Ma et al. (2005) em conformidade com nossos resultados, demonstraram que o AU e seus derivados semissintéticos, têm elevada citotoxicidade sobre células tumorais, principalmente quando substituídos no carbono da posição 3 (C-3) da estrutura pentacíclica, porém são seletivos, e portanto não citotóxico quando as células de linhagem de macrófago são normais. Neste mesmo trabalho, o mecanismo de ação do ácido ursólico sobre as células, gerando o efeito antiproliferativo foi proposto e indica que a inibição da proliferação se dá via bloqueio do ciclo celular na fase G1 da interfase, desencadeando apoptose e fragmentação do DNA.

Em paralelo, o ácido oleanólico, isômero sempre encontrado juntamente com o ácido ursólico na natureza, também demonstrou ser quimiopreventivo para células normais e quimioterápico para fibroblastos transformadas experimentalmente em células cancerosas (WU et al., 2009).

Os carreadores polaxamer 407 e caprato de sódio, da dispersão sólida, também não atuaram de maneira lítica sobre as células, mostrando-se inertes, como esperado. Os dados de citotoxicidade para DSAU aqui apresentados compactuam com resultados de De Oliveira Eloy et al. (2012), nos quais a mesma linhagem celular aqui utilizada (LLCMK2) foi exposta às formulações de dispersões sólidas

compostas de diferentes carreadores em proporções variadas, e nenhuma delas apresentou efeito citotóxicos, mostrando ser esse tipo de tecnologia segura na aplicação em sistemas biológicos.

O benzonidazol, embora ainda não seja considerado citotóxico, causou maiores porcentagens de lise celular (36,5% na dose 128 μM) que os compostos testados e valor de IC_{50} de 126,6 μM .

Tabela 4 - Valores de porcentagem de lise celular – citotoxicidade - de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU) e benzonidazol (BZ) sobre células da linhagem LLMCK2.

Concentração (μM)	% lise + DP		
	Benzonidazol	AU	DSAU
0,5	26,5 $\pm$ 4,1	18,6 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 1,6
2,0	27,3 $\pm$ 3,4	7,2 $\pm$ 5,4	9,5 $\pm$ 5,7
8,0	25,8 $\pm$ 5,7	6,0 $\pm$ 2,4	6,6 $\pm$ 4,9
32,0	25,6 $\pm$ 2,7	8,6 $\pm$ 3,0	8,0 $\pm$ 3,8
128,0	36,5 $\pm$ 4,5	7,5 $\pm$ 2,2	10,8 $\pm$ 4,9
512,0	-	-	6,3 $\pm$ 4,7
1024,0	-	-	5,1 $\pm$ 3,8
$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	126.6	-	-

Controle Positivo – Meio RPMI-1640 não-infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio RPMI-1640 infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

Figura 13. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU) e benzonidazol (BZ), sobre as células da linhagem LLMCK2.

4.1.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma Cruzi*

Antes de passarmos aos testes *in vivo*, fizemos experimentos de avaliação biológica *in vitro* do ácido ursólico (AU) e da dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), assim como da associação (AS) de AU com benzonidazol (BZ) (1:1) contra todas as formas evolutivas (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas) de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener B5, para confirmar a existência de atividade tripanocida de interesse, e preconizar dessa maneira os experimentos *in vivo*.

Primeiramente, a análise dos resultados obtidos da avaliação *in vitro* dos compostos AU, AS e DSAU, sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, após 72h de exposição, indicam, como pode-se observar na tabela 5, que o ácido ursólico é o composto mais ativo, com IC₅₀ de 54,8μM e porcentagem de lise de 58,3% na concentração 128μM. A associação (AU:BZ) apesar de um valor de IC₅₀ maior (111,8 μM) que AU, na concentração de 128 μM, apresentou uma porcentagem de lise de 53,9%. Ambos apresentaram menores valores de IC₅₀ e maiores porcentagens de lise quando comparados ao benzonidazol. Já o DSAU, embora

tenha demonstrado um valor de IC_{50} muito elevado (5747,0 μ M), na concentração 1024 μ M, obtivemos 40,8% de lise, mesmo com apenas 10% de princípio ativo.

Estudos prévios envolvendo terpenoides sobre formas epimastigotas de *T.cruzi* são raros, porém Lozano et al. (2015) mostrou que diterpenos oriundos de partes aéreas da *Salvia cuspidate* e seus derivados com modificações químicas de acetilação, promoveram a inibição do crescimento parasitário em baixas concentrações. Da mesma maneira, em fração etanólica de extrato da *Dracocephalum subcapitatum* contendo mistura de flavonoides e triterpenos, dentre os quais o ácido ursólico apresenta-se em maior concentração, estudos indicam inibição de proliferação das formas epimastigotas com pequenos valores de IC_{50} (SAEIDNIA et al, 2005)

Nossas avaliações convergem com os resultados de Abe et al. (2002), nos quais o ácido ursólico presente em extrato metanólico de folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) inibiu completamente a mobilidade das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 2 mg/ml. Da mesma maneira, os triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico) isolados do mesmo extrato foram testados e, dentre eles, o AU mostrou-se com maior atividade antimotilidade, sendo os isômeros pouco ou inativos frente às formas epimastigotas.

As formas epimastigotas de *T.cruzi* estão presentes no interior do trato gastrointestinal do artrópode transmissor da doença de Chagas, e é inviável em mamíferos. Não obstante, resultados de ensaios com formas epimastigotas, estabelecem um precedente importante nos estudos de um composto candidato a antichagásico porque, embora não presente em mamíferos trata-se de uma forma proliferativa da espécie e, ao ser total ou parcialmente inibida, pode ser um bom indicativo de ação do fármaco contra o protozoário.

A figura 14 representa a curva dose-resposta das substâncias avaliadas pelas quais foram calculados os valores de IC_{50} .

Tabela 5 - Atividade tripanocida *in vitro* de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Concentração (μM)	% lise + DP			
	Benzonidazol	AU	AS (1BZ:1AU)	DSAU
0,5	10,4 $\pm$ 5,4	14,8 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 9,6	11,4 $\pm$ 1,0
2,0	9,7 $\pm$ 5,3	14,9 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 7,4	21,9 $\pm$ 1,4
8,0	17,1 $\pm$ 7,1	12,0 $\pm$ 2,2	13,1 $\pm$ 5,7	25,3 $\pm$ 1,6
32,0	18,4 $\pm$ 6,9	53,6 $\pm$ 0,7	26,6 $\pm$ 3,8	24,6 $\pm$ 2,5
128,0	36,4 $\pm$ 4,5	58,3 $\pm$ 6,2	53,9 $\pm$ 3,3	24,0 $\pm$ 7,7
512,0	-	-	-	37,3 $\pm$ 0,7
1024,0	-	-	-	47,1 $\pm$ 0,8
IC ₅₀ (μM)	932,7	54,81	111,8	5747,0

Controle Positivo – Meio LIT não-infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio LIT infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

Figura 14. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

4.1.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* SOBRE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Na sequência, estudos com os mesmos compostos e associação foram realizados contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Esta, além de ser a forma infectante (metacíclica), também está, no ciclo da doença, presente no sangue de mamíferos. Dessa forma, a análise da atividade biológica contra essa forma evolutiva do parasita se faz muito importante, especialmente na previsão do tratamento da fase aguda da doença de Chagas, quando a parasitemia (número de formas circulantes) é alta.

Da mesma maneira como ocorreu sobre as formas epimastigotas, nossos compostos testados foram mais, ou igualmente, ativos que o benzonidazol ($IC_{50} = 21,11 \mu M$) também sobre as formas tripomastigotas de *T.cruzi*. (Tabela 6)

AU e AS apresentaram em média, respectivamente, 99,8% e 97,7% de lise na concentração 128 μM ($IC_{50} = 14,1 \mu M$ e $IC_{50} = 22,5 \mu M$). Frente a essa forma do parasita, DSAU mostrou, nas concentrações 512 e 1024 μM , causar 100% de lise e com IC_{50} menor ($IC_{50} = 18,5 \mu M$) que o do benzonidazol. Destarte, os estudos em modelos *in vivo* seriam viabilizados, com grande expectativa de ação dos fármacos estudados, em fase aguda da doença de Chagas.

Tabela 6 - Atividade tripanocida *in vitro* de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Concentração (μM)	% lise + DP			
	Benzonidazol	AU	AS (1BZ:1AU)	DSAU
0,5	32,9 $\pm$ 1,5	25,4 $\pm$ 5,3	41,1 $\pm$ 1,7	33,9 $\pm$ 1,5
2,0	28,1 $\pm$ 4,2	17,6 $\pm$ 8,3	24,6 $\pm$ 7,8	38,7 $\pm$ 1,9
8,0	40,5 $\pm$ 5,8	10,3 $\pm$ 1,7	22,4 $\pm$ 1,8	41,8 $\pm$ 4,9
32,0	17,22 $\pm$ 1,8	95,8 $\pm$ 5,7	31,1 $\pm$ 1,2	34,2 $\pm$ 1,9
128,0	86,4 $\pm$ 3,2	99,8 $\pm$ 0,2	97,7 $\pm$ 4,0	32,7 $\pm$ 1,8
512,0	-	-	-	100,0 $\pm$ 0,0
1024,0	-	-	-	100,0 $\pm$ 0,0
IC ₅₀ (μM)	21,11	14,09	22,54	18,55

Controle Positivo – Meio RPMI-1640 não-infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio RPMI-1640 infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

Figura 15. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A literatura contém inúmeras publicações de ensaios com triterpenoides sobre as formas tripomastigotas de tripanosomatídeos de interesse médico, devido à importância dessa forma evolutiva nos ciclos das doenças.

A espécie *Trypanosoma brucei*, causadora da Tripanosomíase Humana Africana (popularmente conhecida como “doença do sono”), tem em sua forma tripomastigotas circulante o principal alvo no tratamento da doença. Dessa maneira a indicação de atividade contra essa espécie pode sugerir bom retrospecto para o composto testado contra o *Trypanosoma cruzi*, devido ao parentesco filogenético entre ambas. Cretton et al (2015), estudaram a atividade de triterpenos e alcaloides, isolados de extrato de raízes de *Waltheria indica*, sobre formas tripomastigotas de diferentes linhagens das subespécies *Trypanosoma brucei brucei* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* e os triterpenos mostraram-se com maior potencial tripanocida.

O ácido ursólico já foi desafiado frente à tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* por Al Musayeib et al. (2013) e apresentaram atividade considerável quando comparado ao controle positivo.

Os presentes resultados confirmam estudos prévios que demonstraram a atividade biológica do ácido ursólico contido em extratos ou isolado sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Leite et al., (2006) além de extrair o AU das folhas de *Arrabidaea triplinervia* fez modificações químicas nos grupos hidroxila e carboxila da estrutura pentacíclica, gerando composto acetilados, esterificados e reduzidos a aldeído. Em todas as comparações, o AU *in natura* foi mais efetivo que seus derivados, deduzindo, dessa maneira, a importância de tais grupos funcionais polares para a atividade tripanocida da molécula (CUNHA et al., 2003; CUNHA et al., 2006).

Em publicações recentes advindas de nosso grupo de pesquisa, o triterpeno ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico foram avaliados *in vitro* contra formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi* e por análise de IC₅₀ e porcentagem de lise, o AU mostrou-se mais eficaz que seu isômero (FERREIRA DDA et al., 2010).

Os dados referentes à atividade da dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU) nesta etapa do trabalho surpreendem pelo fato de que nas concentrações 512 e 1024 µM terem praticamente eliminado as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Tamanha atividade pode ser justificada pela maior hidrossolubilidade da formulação, como já havia demonstrado De Oliveira Eloy et al. (2012) quando testou

as mesmas dispersões sólidas citadas na seção 4.1.1, e observou maior atividade contra tripomastigotas em comparação ao AU livre.

4.1.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios *in vitro* sobre formas amastigotas de *T.cruzi* ensejam mostrar a capacidade dos compostos testados em penetrar a célula do mamífero e atuar sobre as formas intracelulares e proliferativas do parasita. Este é um grande desafio do ponto de vista do *design* farmacológico do medicamento, uma vez que na fase crônica da doença de Chagas, as formas circulantes penetram os tecidos (especialmente muscular, hepático e nervoso) e formam "ninhos" que após o período de incubação acaba por romper as células e gerar lesões teciduais (FOURNET; MUNOZ, 2002).

Moléculas capazes de eliminar patógenos intracelulares e exercer, ao mesmo tempo, o mínimo de efeitos adversos, podem ser interessantes no desenvolvimento de novos agentes antichagásicos (PASSERO et al., 2011).

Os fármacos existentes no mercado apresentam baixas absorção intestinal e permeabilidade celular, dificultando assim sua atividade e gerando baixa eficácia no tratamento da fase crônica.

O ácido ursólico é sabidamente de característica lipofílica, o que gera sérios problemas de absorção e consequente biodisponibilidade quando administrado oralmente. Por isso, além de testarmos o AU em sua forma livre, trabalhamos com uma formulação de dispersão sólida contendo ácido ursólico (10%) na expectativa de otimizar o efeito do triterpeno gerando assim uma maior atividade, especialmente contra essas formas que geram maior desafio ao desenvolvimento de novos fármacos.

Os resultados de porcentagem de lise parasitária apresentados na tabela 7 trazem boas perspectivas para o composto em estudo. Como demonstrado na seção 4.1.1, nossos fármacos não causaram citotoxicidade às células de tecido animal, e nos resultados aqui ilustrados, percebemos também a seletividade contra as formas parasitas intracelulares amastigotas. Tanto AU quanto AS atuaram com IC₅₀ (0,19 µM e 0,16 µM, respectivamente) menores que o do benzonidazol (1,73 µM). Em todas as concentrações analisadas, o ácido ursólico foi mais efetivo e causou maior porcentagem de lise de formas amastigotas, chegando a 93,1% na concentração

128 μM . O mesmo se deu para a associação de AU (1:1) com benzonidazol, porém com atividade lítica menos intensa.

Embora na concentração 1024 μM haja tido 96,1% de lise parasitária, o DSAU não conseguiu exercer uma robusta atuação contra formas intracelulares, como sobre as formas tripomastigotas ($\text{IC}_{50} = 2,89 \mu\text{M}$). Mesmo assim, ainda demonstrou, com apenas 10% de princípio ativo, ser mais eficaz que o benzonidazol. A exploração da maior solubilidade em água da dispersão sólida, parece ter sido uma boa estratégia em sistemas *in vitro* sobre *Trypanosoma cruzi*, tendo de ser confirmado a seguir em experimentos *in vivo*.

Tabela 7 - Atividade tripanocida *in vitro* de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Concentração (μM)	% lise + DP			
	Benzonidazol	AU	AS (1BZ:1AU)	DSAU
0,5	47,9 $\pm$ 0,4	63,3 $\pm$ 1,9	55,5 $\pm$ 2,7	39,8 $\pm$ 1,7
2,0	50,9 $\pm$ 1,5	66,2 $\pm$ 0,8	57,3 $\pm$ 5,0	42,0 $\pm$ 1,5
8,0	46,8 $\pm$ 0,5	70,2 $\pm$ 1,1	63,8 $\pm$ 3,1	61,1 $\pm$ 0,9
32,0	59,4 $\pm$ 0,1	94,4 $\pm$ 6,3	70,1 $\pm$ 0,2	70,3 $\pm$ 1,4
128,0	80,1 $\pm$ 1,8	93,1 $\pm$ 4,8	72,0 $\pm$ 4,9	69,7 $\pm$ 1,8
512,0	-	-	-	75,8 $\pm$ 1,5
1024,0	-	-	-	96,1 $\pm$ 1,7
$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	1,73	0,19	0,16	2,89

Controle Positivo – Meio RPMI-1640 não infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio RPMI-1640 infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

Na figura 16 está representada a curva dose-resposta das substâncias avaliadas pelas quais foram calculados os valores de IC_{50} .

Figura 16. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e benzonidazol (BZ) sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Devido às dificuldades experimentais do emprego de ensaios com formas intracelulares, é compreensível que os estudos envolvendo testes sobre amastigotas sejam menos numerosos. Não obstante, recentemente alguns autores apresentaram dados em comunhão com nosso trabalho.

Metabólitos secundários de diversas classes (chalconas, flavona, antraquinonas e alcaloides), incluindo terpenos, foram avaliados em sua atividade tripanocida e leishmanicida contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (TELES et al., 2015). Os IC_{50} obtidos pelos terpenos ou em associação com eles, foram menores que dos compostos de outras classes, indicando potencial promissor referente à estrutura de nosso composto candidato.

Ácido ursólico isolado de extratos vegetais também foi avaliado contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* por Cretton et al, (2015) e por Al Musayeib et al.,

(2013), e assim como no presente trabalho, indicam que AU tem melhor permeabilidade pela membrana plasmática, possivelmente devido ao seu caráter lipofílico e estrutura semelhante ao colesterol, constituinte obrigatório das membranas celulares.

4.1.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

Com o intuito de demonstrar atividade contra protozoários da família Trypanosomatidae, procedemos também aos estudos com o parasita *Leishmania braziliensis*, um dos causadores da forma muco-cutânea da leishmaniose, sendo uma das mais temidas devido ao seu poder de destruição tecidual e consequente desfiguração do indivíduo infectado.

Dessa forma, ensaios sobre as formas evolutivas promastigotas (presente na probóscida do artrópode transmissor da doença e também forma infectante) e amastigotas (tecidual intracelular) foram processados *in vitro*, com intuito de termos precedentes biológicos para a execução de experimentos *in vivo*, pois de acordo com Bettiol et al. (2009) e Sharlow et al. (2009) a varredura por compostos leishmanicidas pode ser baseada no decréscimo da viabilidade das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*.

Em conformidade, Sen e Chatterjee (2011) explicam que, em geral, a detecção de metabólitos secundários de plantas com atividade leishmanicida é através da realização de experimentos em promastigotas devido sua facilidade de manutenção nas condições *in vitro*. No entanto, a sua eficácia deve ser complementada com avaliação em amastigotas intracelulares, pois frequentemente, compostos eficazes contra promastigotas são igualmente tóxico para células hospedeiras, excluindo assim a sua condução para estudos futuros (GNOATTO et al., 2008).

Os dados a seguir demonstram que obtivemos resultados tão promissores quanto os encontrados nos estudos com *T. cruzi*, embora a anfotericina B, fármaco usado no tratamento de leishmanioses, ainda seja mais ativo.

Em primeiro lugar, em experimentos sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, determinamos o potencial lítico dos compostos testados. Como está descrito na tabela 8, a atividade da anfotericina B (AnB) é alta desde a concentração de 0,5 μM , com 64,6% de lise, chegando a 94,2% em 128 μM . Além disso o valor de IC_{50} é extremamente baixo ($6,7 \times 10^{-4} \mu\text{M}$). Por isso, o AU, embora

tenha chegado a 91,9% de lise na concentração de 128 μM ($\text{IC}_{50} = 44,4 \mu\text{M}$), não conseguiu ser mais ativo que o fármaco de escolha. Porém, na associação (AS) equimolar das duas substâncias, encontramos um IC_{50} de $2,9 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ e 97,4% de lise na concentração de 128 μM , demonstrando haver um efeito sinérgico entre elas.

Tabela 8 - Atividade leishmanicida *in vitro* de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB) sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

Concentração (μM)	% lise + DP			
	Anfotericina B	AU	AS (1AnB:1AU)	DSAU
0,5	64,6 $\pm$ 4,1	44,2 $\pm$ 7,5	44,9 $\pm$ 1,2	25,7 $\pm$ 1,2
2,0	82,7 $\pm$ 0,7	40,5 $\pm$ 1,8	81,1 $\pm$ 2,4	30,5 $\pm$ 1,5
8,0	89,7 $\pm$ 3,0	38,5 $\pm$ 0,7	89,9 $\pm$ 4,2	33,4 $\pm$ 3,7
32,0	89,6 $\pm$ 2,2	46,0 $\pm$ 1,9	92,9 $\pm$ 3,3	44,1 $\pm$ 3,8
128,0	94,24 $\pm$ 4,4	46,0 $\pm$ 1,9	97,4 $\pm$ 2,4	-
512,0	-	-	-	-
1024,0	-	-	-	56,2 $\pm$ 2,4
$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	$6,7 \times 10^{-4}$	44,46	$2,9 \times 10^{-4}$	1623,0

Controle Positivo – Meio M199 não-infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio M199 infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

As associações são estratégias de curto prazo, pois ao promover ação conjunta de duas ou mais substâncias de mecanismos de ação diferentes, podem causar efeito positivos. Várias doenças, como a tuberculose, hanseníase e AIDS ficaram sob controle apenas após serem tratadas com associações de drogas (COURA; DIAS, 2009). Dessa maneira, nossos achados indicam que a associação do AU com fármacos existentes pode ser uma estratégia viável para o tratamento das leishmanioses, promovendo menores efeitos tóxicos e menores custos.

Alguns estudos precedentes contra leishmaniose compactuam com nosso intento. A combinação de miltefosine e paromomicina com outros medicamentos antileishmaniais (antimoniais pentavalente, anfotericina B) mostrou eficácia superior no tratamento de leishmaniose visceral do que os medicamentos isolados (VAN GRIENSVEN et al., 2010) e a combinação de stibogluconato de sódio intralesional

com cetoconazol oral promoveu 92.3% de cura de lesões em pacientes humanos (EL-SAYED; ANWAR, 2010).

A dispersão sólida foi pouco efetiva frente às formas extracelulares do parasita ($IC_{50} = 1623,0 \mu M$), como pode ser visto na figura 17.

Figura 17. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB), sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Embora não presentes no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são as responsáveis pela infecção e alojamento nos tecidos, além de ser uma forma proliferativa. Ou seja, estudos acerca da inibição do crescimento de promastigotas da espécie de *Leishmania braziliensis*, e da redução da internalização do parasita pelos macrófagos (TIUMAN et al., 2005) podem ensejar ação inibitória no desenvolvimento da doença.

Os resultados apresentados no presente trabalho, sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* são uma confirmação do que foi apresentado por e Passero et al. (2011) e Begun et al. (2014), que mostraram que extratos naturais nos quais há a presença do AU, foram extremamente efetivos sobre formas promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis* de *Leishmania major*, respectivamente.

Em adição, derivados semissintéticos do ácido ursólico extraído de diversas plantas dos gêneros *Ilex* e *Miconia*, também apresentaram atividade leishmanicida *in vitro* (GNOATTO et al., 2008; PEIXOTO et al., 2011) contra formas promastigotas de, respectivamente, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*.

4.1.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

Após a invasão celular (principalmente macrófagos) pelas formas promastigotas, o parasita sofre evolução para a forma amastigota que tem a capacidade de se proliferar intracelularmente, até o rompimento celular, que gera lesões cutâneas ou viscerais, muitas vezes irreversíveis.

Sendo assim, da mesma maneira que em face das formas amastigotas de *T.cruzi*, faz-se indispensável que o fármaco em estudo tenha a capacidade intrínseca de atravessar a membrana plasmática para encontrar o parasita no citoplasma celular.

A tabela 9 traz a relação de média de porcentagem de lise dos compostos em cada dosagem utilizada e os respectivos IC_{50} . Analisando os dados é possível perceber a alta capacidade da anfotericina B em agir contra formas amastigotas da *Leishmania braziliensis*, chegando a 92,3% de inibição parasitária na concentração 128 μM , com baixo IC_{50} (0,40 μM).

Embora o ácido ursólico não tenha apresentado tamanha eficácia ($IC_{50} = 5,12 \mu M$), pode-se dizer que sua atividade foi considerável na concentração 128 μM , causando, em média, 90,2% de inviabilidade parasitária. Sobre formas amastigotas, a associação equimolar não mostrou a mesma efetividade como contra formas promastigotas ($IC_{50} = 7,13 \mu M$).

Tabela 9 - Atividade leishmanicida *in vitro* de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB) sobre formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*

Concentração (μM)	% lise + DP			
	Anfotericina B	AU	AS (1AnB:1AU)	DSAU
0,5				
2,0	67,0 $\pm$ 1,2	45,2 $\pm$ 6,4	35,4 $\pm$ 4,1	33,7 $\pm$ 1,4
8,0	81,3 $\pm$ 1,0	48,9 $\pm$ 1,8	45,2 $\pm$ 4,4	51,9 $\pm$ 1,9
32,0	88,2 $\pm$ 1,1	60,0 $\pm$ 5,2	75,9 $\pm$ 3,1	61,6 $\pm$ 1,1
128,0	92,3 $\pm$ 2,7	90,2 $\pm$ 1,9	82,9 $\pm$ 2,9	72,2 $\pm$ 1,4
512,0	-	-	-	82,4 $\pm$ 1,2
1024,0	-	-	-	87,0 $\pm$ 1,5
IC ₅₀ (μM)	0,40	5,12	7,13	9,07

Controle Positivo – Meio M199 não infectado (100% lise);

Controle Negativo – Meio M199 infectado com adição de 1,6% DMSO (0% lise)

Figura 18. Curvas dose-resposta de porcentagem de lise em função do log das concentrações de ácido ursólico (AU), dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), associação (AS) e anfotericina B (AnB), sobre formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Baseado no relativo sucesso das modificações farmacêuticas empregadas sobre a anfotericina B, e tendo em vista a baixa hidrossolubilidade do ácido ursólico, aqui também se aplica as vantagens da dispersão sólida.

O comportamento lítico de DSAU sobre formas amastigotas, como pode ser visto na figura 18, não obstante o elevado IC_{50} (9,07 μ M), é proporcionalmente crescente em relação à dose. Levando em consideração o fato de a dispersão sólida apresentar apenas 10% de princípio ativo, temos uma melhora de atividade do ácido ursólico quando aplicado à formulação quando comparado ao seu estado livre. Sendo assim, entusiasmados com tais resultados, experimentos *in vivo* foram feitos no intuito de confirmar esta ação leishmanicida.

Em concordância com nossos resultados, o ácido ursólico presente em frações de extratos de diferentes plantas, apresentou boa atividade anti-amastigota (TORRES-SANTOS et al., 2004). Sendo interessante notar que, embora não citotóxico para células de mamíferos (assim como demonstrado em 4.1.1), AU demonstrou ser mais eficaz contra as formas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major*, do que contra formas promastigotas (TAN et al., 2002; PASSERO et al., 2011), exatamente como observado em nossos ensaios com *Leishmania braziliensis*.

O óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos durante a infecção por amastigotas de *Leishmania*, é o estabelecido mecanismo para o combate celular ao parasita (HIBBS et al., 1988). Especificamente nos estudos de Passero et al. (2010), células de macrófagos infectadas e tratadas com frações de extrato contendo ácido ursólico, não tiveram níveis de NO substancialmente aumentados, o que indica a ação anti-amastigota direta do AU contra as espécies de *Leishmania* ao invés de ativar os macrófagos a produzirem o mediador imunológico.

4.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Após vigoroso e promissor trabalho *in vitro*, passamos aos estudos *in vivo* com camundongos Balb/c, devido a sua maior susceptibilidade à infecção pelos parasitas e consequente apresentação dos sintomas e características de ambas as doenças de estudo.

Segundo Osakabe et al. (2004), os ensaios *in vivo* são necessários para averiguar se substâncias que apresentaram ação antiparasitária *in vitro*, tem tal

efeito confirmado em animais de experimentação. Tais experimentos são feitos no intuito de se encontrar substâncias mais eficazes que as disponíveis no mercado.

No entanto, Chatelain e Konar (2015) alertam que sempre, em condições experimentais, modelos *in vivo* envolvem diversos parâmetros não controláveis, incluindo a relação entre exposição e cura, rotas de administração, duração do tratamento, linhagens animais, interações parasita-hospedeiro e tipo de resposta imune.

A abordagem empírica ligada aos testes biológicos *in vitro* contra as fases extra ou intracelulares dos parasitas causadores dessas doenças negligenciadas é amplamente utilizada pelos grupos de pesquisa, no entanto, alguns compostos, mesmo parecendo ter potencial terapêutico, nunca chegam à fase de testes *in vivo*, devido ao limitado interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos (FOURNET; MUNOZ, 2002). Por isso, acreditando na colaboração que este trabalho pode trazer ao campo da busca de tratamentos alternativos para a doença de Chagas e leishmaniose, procedemos aos ensaios *in vivo*.

A via de administração escolhida para os tratamentos dos animais foi a oral. Esta via é considerada a mais conveniente para o uso de medicamentos (LI et al., 2013) por ser fácil, segura, confortável e não requerer ajuda profissional. Os estudos com fármacos que podem ser administrados oralmente sempre apresentam grande vantagem na passagem para teste em humanos. Os problemas relacionados à absorção, biodisponibilidade e metabolismo de primeira passagem serão discutidos mais adiante (CROFT; COOMBS, 2003).

Além disso, resultados publicados por Da Silva Ferreira et al. (2013) em estudos com modelos animal, demonstrou que os picos parasitêmicos dos parasitas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram exacerbados em relação ao controle sem tratamento, quando tratados com ácido ursólico por via intraperitoneal, possivelmente devido a modulação imunológica causada pelo triterpeno.

Dessa forma, na doença de Chagas experimental, analisamos o potencial terapêutico dos compostos em teste, pela contagem parasitária, observação da sobrevivência dos animais e pela quantificação parasitária em tecidos por PCR em tempo real.

Já na Leishmaniose muco-cutânea experimental, fizemos a avaliação da medida das extensões das lesões durante o período de tratamento.

4.2.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO *IN VIVO* DO AU E DSAU SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Em experimentos com camundongos Balb/c, machos, infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa CL Brener B5, analisamos o perfil terapêutico de AU e DSAU nas doses de 8 e 20 mg/Kg, através da determinação da parasitemia durante o período do tratamento por via oral (20 dias) e pela observação da sobrevivência desses animais. Grupos animais tratados com as mesmas doses de benzonidazol foram o controle positivo, e animais tratados com solução fisiológica com 5% de DMSO, o controle negativo. Em paralelo, um grupo de animais, nas mesmas condições, receberam durante o período de tratamento, as mesmas doses de dispersão sólida isentas de ácido ursólico (Placebo), a fim de analisarmos a influência dos carreadores. Em todas as análises, esse grupo apresentou o mesmo comportamento do controle negativo, excluindo dessa maneira a interferência dos carreadores (Polaxamer 407 e caprato de sódio) na atividade do AU.

Na figura 19, estão representados os valores da parasitemia apresentados por animais tratados na dose de 8 mg/Kg.

Figura 19. Avaliação parasitêmica de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Avaliação estatística realizada por método de Kruskal-Wallis com teste complementar de Dunn.

Analizando os resultados obtidos, é possível verificar que na dose 8 mg/Kg, as substâncias não demonstraram atividade biológica significativa ($p > 0,05$). Para os animais tratados com o DSAU, verificou-se uma curva parasitêmica semelhante a do grupo controle negativo. O pico parasitêmico característico da cepa (14º dia) foi deslocado para o 17º dia, mas houve uma pequena redução (16,2%) do número de formas parasitas sanguíneas ($p > 0,05$). Além disso, no 18º dia da infecção, todos os animais do grupo morreram (figura 7), não havendo diferença dos animais do grupo controle negativo, os quais morreram no 16º dia.

Para o grupo tratado com AU, observamos uma redução da parasitemia de 25,1% (tabela 10), e um deslocamento do pico parasitêmico para o 17º dia, a partir do qual houve uma redução parasitária. Apesar da pequena redução parasitária no

sangue, a sobrevivência dos animais, nessa dosagem, foi de 100%, assim como no controle positivo.

Figura 20. Sobrevivência de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições.

Já na figura 21, estão representados os valores da parasitemia de animais tratados na dose de 20 mg/Kg.

Figura 21. Avaliação Parasitária de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Avaliação estatística realizada por método de Kruskal-Wallis com teste complementar de Dunn.

Verificamos que na dose 20 mg/Kg, as substâncias candidatas apresentaram melhor atividade, embora não estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O grupo de animais tratados com o DSAU apresentou uma redução parasitária de 61,6% no dia do pico, quando comparado ao controle negativo. Além disso, o pico parasitário, assim como na dosagem 8 mg/Kg, foi deslocado para o 17º dia, após o qual houve uma redução dos parasitas circulantes. Em adição, a sobrevivência dos animais deste grupo foi de 80% (figura 22), apenas 20% menor que a sobrevivência dos animais do grupo controle positivo.

Figura 22. Sobrevida de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições.

No grupo tratado com AU, verificou-se uma redução do número de parasitas circulantes de 60,2% (tabela 10), além de um deslocamento do pico parasitêmico para o 17º dia, com posterior queda. Em adição a grande redução parasitária no sangue, a sobrevida dos animais, nessa dosagem, também foi de 80%.

Tabela 10 - Redução da parasitemia em valores absolutos dos animais tratados, comparados ao grupo controle negativo, no dia do pico parasitêmico.

Substâncias administradas	Redução parasitária (%)	
	8 mg/kg	20mg/kg
AU	25,1	60,2
DSAU	16,2	61,6
Benzonidazol	90,7	99,3

Em estudos prévios *in vivo* na fase aguda da doença de Chagas experimental, com a cepas Bolívia (FERREIRA DDA et al., 2010) e Y de *T.cruzi*, Da

Silva Ferreira et al (2013) apresentou resultados de parasitemia de animais tratados com 20 mg/Kg de AU isolado, por via oral, mais baixos que de animais tratados por via intraperitoneal, e além disso, comparáveis aos resultados obtidos no presente trabalho, confirmando que a atividade desse composto demonstrado *in vitro*, pode também ser observado *in vivo*. Anteriormente, Cunha et al. (2006) utilizou extrato de plantas do gênero *Miconia*, dos quais o AU foi isolado. Aplicando então este triterpeno no tratamento de animais em fase aguda da doença de Chagas, observou diminuição do pico parasitêmico de 75,7% e aumento na sobrevivência de todos os animais tratados, corroborando nossos resultados.

É importante salientar que as porcentagens de redução parasitêmica para DSAU são similares a AU, embora a dispersão sólida contenha apenas 10% de princípio ativo. Assim, acreditamos ter havido uma melhor absorção e biodisponibilidade do fármaco, devido a modificação farmacotécnica empregada.

Yang et al. (2012) mostraram que essas características são aumentadas pela utilização de nanotecnologia. Consequentemente, a abordagem tecnológica pode promover a potencialização do efeito antichagásico do composto (ROMERO; MORILLA, 2010).

4.2.2 QUANTIFICAÇÃO PARASITÁRIA POR PCR EM TEMPO REAL

Após o período de tratamento (20 dias), 3 animais por grupo foram eutanasiados e foi feita a coleta do coração e do fígado para a extração de DNA, conforme descrito na seção 3.12.1, e os estudos de quantificação de carga parasitária nesses tecidos foram feitos por RT-PCR.

Além de um excelente método de diagnóstico moderno, por ser rápido e garantir uma alta especificidade, a PCR pode ser uma importante técnica geradora de parâmetros para análise da eficiência de fármacos em etapas de teste. No presente trabalho, a quantificação da carga parasitária auxiliou-nos no entendimento da ação do AU e DSAU, frente à infecção aguda e crônica da doença de Chagas experimental e no potencial terapêutico desses compostos em comparação ao benzonidazol.

Para a análise dos dados fornecidos pelas PCRs em tempo real, foram feitos dois cálculos, conforme explicitado em 3.13.7 sendo, através destes, possível estimar a quantidade de parasitas por células de hospedeiro e a quantidade de parasita por unidade de massa de tecido extraído. Assim, pudemos relacionar a

carga parasitária com a eficácia do tratamento em relação à formas intracelulares amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em sistema *in vivo*.

4.2.2.1 CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*

Para a confecção da curva padrão, a partir da qual as quantificações de *T. cruzi* nos tecidos foram feitas, foi extraído o DNA de formas epimastigotas advindos de cultura pura.

De acordo com Freitas et al. (2006) a massa de uma cópia do material genético do *T. cruzi* com o qual trabalhamos é 43,5 fg, a partir da qual se pode estimar o número de cópias em concentrações conhecidas.

Após a extração, as concentrações de DNA nas amostras foram determinadas com o auxílio do (Quibit™ Assays) e ajustadas para 21,75 ng/μL (solução mãe - equivalente a 10^6 cópias) (dentro de cada poço foi adicionado 2 μL de amostra), a partir da qual foram feitas diluições seriadas como descrito na tabela 11.

Tabela 11 – Massa equivalente ao número de cópias do material genético de *Trypanosoma cruzi* e concentrações utilizadas na confecção da curva padrão a partir da diluição seriada da solução mãe

<i>T. cruzi</i>			
Nº Fitas	Massa	Concentração	Volume
10^6	43,5 ng	21,75 ng/μL	2 μL
10^5	4,35 ng	2,175 ng/μL	0,2 μL
10^4	435 pg	217,5 pg/μL	0,02 μL
10^3	43,5 pg	21,75 pg/μL	2 nL
10^2	4,35 pg	2,175 pg/μL	0,2 nL
10^1	435 fg	217,5 fg/μL	0,02 nL
10^0	43,5 fg	21,75 fg/μL	2 pL

A curva padrão obtida está representada na figura X. A equação determinada por ela foi:

$$Y = -3,3X + 28,3$$

onde, Y é o valor de C_q , $-3,3$ é o *slope* (inclinação da reta), $28,3$ é a intersecção da reta com o eixo Y . Desta maneira é possível calcular X (quantidade de DNA de *T.cruzi*) a partir dos valores de C_q .

Figura 23. Curva padrão para quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Valores de C_q em função da quantidade de fitas de DNA. (A) material genético de fígado de camundongo. (B) água isenta de material genético.

A eficiência da curva é maior que 90% e o valor de R^2 é 0,994.

Na figura 23 é possível observar também os pontos A e B, referentes à material genético de fígado de camundongo e amostra controle contendo apenas água, respectivamente, comprovando dessa maneira a especificidade do primer para DNA de *T.cruzi*, uma vez que tais pontos se referem aos últimos ciclos, o que indica dimerização de *primers*, e não amplificação amostral.

4.2.2.2 CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE GAPDH

Utilizando o DNA de camundongo Balb/c extraído de tecido hepático, procedeu-se ao desenvolvimento da curva padrão para quantificação do GAPDH.

Embasado em Kara et al. (2006) a massa de uma cópia do material genético do camundongo com o qual trabalhamos é 1,3 pg, a partir da qual se pode estimar o número de cópias em concentrações conhecidas.

Após a extração, as concentrações de DNA nas amostras foram determinadas (Quibit™ Assays) e ajustadas para 65 ng/μl (solução mãe - equivalente a 10^5 cópias), a partir da qual foram feitas diluições seriadas como descrito na tabela 12.

Tabela 12 – Massa equivalente ao número de cópias do material genético de camundongo e concentrações utilizadas na confecção da curva padrão a partir da diluição seriada da solução mãe

GAPDH			
Nº Fitas	Massa	Concentração	Volume
10^5	130 ng	65 ng/μL	2 μL
10^4	13 ng	6,5 ng/μL	0,2 μL
10^3	1,3 ng	0,65 ng/μL	0,02 μL
10^2	130 pg	65 pg/μL	2 nL
10^1	13 pg	6,5 pg/μL	0,2 nL
10^0	1,3 fg	0,65 pg/μL	0,02 nL

A curva padrão obtida está representada na figura 24. A equação determinada por ela foi:

$$Y = -3,3X + 28,3$$

onde, Y é o valor de Cq, -3,3 é o *slope* (inclinação da reta), 28,3 é a intersecção da reta com o eixo Y. Desta maneira é possível calcular X (quantidade de fitas de GAPDH) a partir dos valores de Cq.

Figura 24. Curva padrão para quantificação de GAPDH. Valores de Cq em função da quantidade de fitas de DNA.

A eficiência da curva é maior que 90% e o valor de R^2 é 0,996.

Todas as amostras de DNA, antes de analisadas, foram testadas quanto à suas integridades por eletroforese. Os geis obtidos estão presentes no ANEXO A.

4.2.2.3 DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA EM ANIMAIS TRATADOS COM 8 mg/kg DE AU E DSAU

4.2.2.3.1 CORAÇÃO

Na análise da figura 25, é possível perceber que entre os grupos de camundongos tratados na dose 8 mg/Kg, apenas o benzonidazol conseguiu diminuir a carga parasitária do coração dos animais em relação ao controle negativo, sendo essa redução estatisticamente significativa. Por outro lado, tanto o AU quanto o DSAU não apresentaram potencial em impedir a entrada e multiplicação dos parasitas no tecido cardíaco nessa dosagem, sendo a relação células de parasitas / células de hospedeiro próxima a 1:1, como no controle negativo.

O grupo placebo apresentou carga parasitária muito parecida com o controle negativo, indicando serem os carreadores da dispersão sólida, realmente inertes.

Figura 25. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,005$ (**).

Confirmando os resultados descritos acima, a análise da figura 26 demonstra o mesmo perfil, embora utilizando cálculos totalmente diferentes. O coração de animais tratados com benzonidazol apresentou carga parasitária de, em média 10 células de parasitas / ng de tecido, enquanto os grupos tratados com AU e DSAU, apresentaram, em média, o dobro, tal qual o controle negativo e o grupo placebo.

Figura 26. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

4.2.2.3.2 FÍGADO

Na figura 27, observamos que na dose 8 mg/Kg, assim como aconteceu nas análises de tecido cardíaco, apenas o benzonidazol conseguiu diminuir a carga parasitária do fígado dos animais em relação ao grupo controle negativo, sendo essa redução estatisticamente significativa. Em contraste, tanto o AU quanto o DSAU não apresentaram potencial em impedir a inserção dos parasitas no tecido hepático nessa dosagem, sendo, em específico a relação células de parasitas / células de hospedeiro de AU, um pouco mais elevada que a do controle negativo.

Figura 27. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*).

Congruentemente, os resultados do cálculo de número de parasitas / massa de tecido, como demonstrado na figura 28, apresenta comportamento muito semelhante, demonstrando coerência em nossas análises. O fígado de animais tratados com benzonidazol apresentou carga parasitária, em média, aproximadamente 50% menor que do controle negativo, enquanto os grupos tratados com AU e DSAU, apresentaram, em média, a mesma carga dos animais sem tratamento.

Em ambas as análises, embora não estatisticamente significante, a expressão de *Trypanosoma cruzi* em fígado de animais tratados com DSAU foi menor em comparação a animais tratados com AU, sugerindo uma melhor atividade tripanocida

da dispersão sólida, possivelmente por conseguir fazer o ácido ursólico alcançar os parasitas sem ser antes metabolizado pelo próprio fígado (LIAO et al., 2005).

Figura 28. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*).

4.2.2.4 DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA EM ANIMAIS TRATADOS COM 20 mg/kg DE AU E DSAU

4.2.2.4.1 CORAÇÃO

No que tange às análises por PCR em tempo real dos grupos animais que receberam tratamento na dose 20 mg/Kg, as cargas parasitárias em relação ao número de células de hospedeiro mostram a baixa efetividade de AU e DSAU que apresentaram valores muito próximos ao controle negativo (1:1). Apenas o

benzonidazol, conseguiu uma diminuição efetiva da carga parasitária do coração dos animais em relação ao controle negativo, sendo essa redução estatisticamente significativa.

O grupo placebo apresentou carga parasitária muito parecida com o controle negativo, indicando serem os carreadores da dispersão sólida, realmente inertes.

Figura 29. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ [$p < 0,0005$ (***)].

Em comunhão com os cálculos apresentados acima, a análise da número de cópias de DNA do *Trypanosoma cruzi* em relação à massa do coração analisado, demonstrou o mesmo perfil, como pode ser visto na figura 30. Enquanto os grupos tratados com AU e DSAU apresentaram, em média, as mesmas cargas parasitárias

no coração em comparação ao grupo controle negativo, os corações de animais tratados com benzonidazol apresentou carga parasitária muito inferior a todos os outros grupos.

Figura 30. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*).

4.2.2.4.2 FÍGADO

Os gráficos expressos na figura 31 e 32 trazem as quantidades de fitas de DNA de parasita em relação ao número de células de camundongo e à massa do tecido analisado, respectivamente. Na primeira, observamos que na dose 20 mg/Kg, assim como aconteceu nas análises de tecido hepático na dose 8 mg/Kg, o benzonidazol (controle positivo) foi o único tratamento a diminuir a carga parasitária do fígado dos animais em relação ao controle negativo, sendo essa redução

estatisticamente significativa. Ao contrário, tanto o AU quanto o DSAU não apresentaram potencial em impedir, nesta dose, o povoamento do fígado pelos parasitas, pois ambos, apresentaram a relação células parasitas / células de hospedeiro muito próximas ao grupo sem tratamento.

Figura 31. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$. [$p < 0,005$ (**)].

No mesmo sentido, a segunda figura traz os resultados do cálculo de número de parasitas / massa de tecido. Estes apresentam comportamento muito semelhante ao descrito anteriormente. O fígado de animais tratados com benzonidazol apresentou carga parasitária, em média, 70% menor que do controle negativo,

enquanto os grupos tratados com DSAU e placebo, apresentaram, em média, a mesma carga dos animais sem tratamento.

Especificamente nessa análise, embora não estatisticamente significativa, houve uma diminuição na expressão de *Trypanosoma cruzi* em fígado de animais tratados com AU em relação ao controle sem tratamento sugerindo uma maior atividade tripanocida proporcional ao aumento da dose. No entanto, em desacordo com o que apresentou na dose 8 mg/kg, o DSAU não promoveu efeito potencializado do fármaco, mesmo estado sendo administrado em uma dosagem maior.

Figura 32. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol. Controle negativo: animais tratados com solução DMSO 5% nas mesmas condições. Placebo: Animais tratados com dispersão sólida isenta de AU. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*) [$p < 0,005$ (**)].

4.2.2.5 DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA EM ANIMAIS SOBREVIVENTES TRATADOS COM 8 mg/kg DE AU E DSAU

Ao final do período de tratamento proposto, os animais sobreviventes foram mantidos nas mesmas condições, para a análise da sobrevida. Após 180 dias, 2 animais por grupo (daqueles que ainda tinham animais sobreviventes), foram eutanasiados e os estudos de PCR-RT foram feitos da mesma maneira como feito para animais eutanasiados na fase aguda.

Na dose 8 mg/Kg todos os animais dos grupos tratados com DSAU, controle negativo e placebo morreram antes do término do tratamento em fase aguda da infecção. Apenas animais dos grupos tratados com benzonidazol e AU sobreviveram.

Dessa maneira, podemos também avaliar o potencial do AU frente à cronificação da doença de Chagas e seu papel na manutenção da sobrevida dos animais.

4.2.2.5.1 CORAÇÃO

Os dados fornecidos por PCR em tempo real, de tecido cardíaco de animais sobreviventes à infecção aguda da doença de Chagas, mostraram o potencial de ambos os compostos (BZ e AU) no controle da carga parasitária no coração (Figura 33). Ambos causaram diminuição drástica (69,1% e 76,4%, respectivamente) no número de parasitas por células de camundongo, em comparação com animais do mesmo grupo, sacrificados em fase aguda (figura 25). Sendo, portanto, o ácido ursólico capaz de uma redução parasitária intracelular maior que o benzonidazol, posto que não há, entre os grupos BZ e AU, diferenças estatisticamente significantes de quantidade de parasitas no coração de animais sobreviventes (Tabela 13).

Figura 33. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

Confirmando os resultados descritos acima, a análise da figura 34 demonstra o mesmo perfil, embora utilizando cálculos diferentes. Os corações de animais tratados com benzonidazol apresentaram cargas parasitárias / ng de tecido, muito próximas às apresentadas pelas amostras coletadas de animais tratados com AU, mostrando o potencial de ambos em reduzir o número de células do parasita no tecido cardíaco de animais sobreviventes, quando administrados na dose de 8 mg/Kg.

Tabela 13 - Redução da carga parasitária média (%) no coração e no fígado (fase crônica em comparação à fase aguda) dos animais tratados na dose 8 mg/kg com benzonidazol e ácido ursólico (AU).

	Redução de carga parasitária – 8 mg/kg			
	Coração		Fígado	
	<i>T.cruzi</i> /GAPDH	<i>T.cruzi</i> /massa	<i>T.cruzi</i> /GAPDH	<i>T.cruzi</i> /massa
Benzonidazol	69,1%	70,0%	49,4%	20,0%
AU	76,4%	72,3%	71,3%	68,0%

Figura 34. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

4.2.2.5.2 FÍGADO

No mesmo sentido dos dados apresentados pelos corações de animais que sobreviveram à fase aguda da doença de Chagas, após serem tratados com benzonidazol ou ácido ursólico, os dados obtidos a partir do fígado desses mesmos animais mostram baixas concentrações parasitárias hepáticas / número de células de hospedeiro (Figura 35) e com diferenças não significantes entre eles. Quando

comparados aos valores de carga parasitária em fase aguda (Figura 27), ambos os fármacos causaram grande diminuição de carga parasitária no fígado dos camundongos, sendo a redução promovida pelo AU mais intensa que a promovida pelo benzonidazol (Tabela 13) em ambos os cálculos.

Figura 35. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

Em comunhão com os cálculos apresentados acima, a análise da número de cópias de DNA do *Trypanosoma cruzi* em relação à massa do fígado de animais sobreviventes analisados, demonstrou o mesmo perfil, como pode ser visto na figura 36. Os fígados de animais tratados com benzonidazol apresentaram cargas parasitárias / ng de tecido, muito próximas às apresentadas pelas amostras coletadas de animais tratados com AU, mostrando o potencial de ambos em reduzir o número de células do parasita no tecido hepático de animais sobreviventes, quando administrados na dose de 8 mg/Kg.

Figura 36. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

4.2.2.6 DETERMINAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA EM ANIMAIS SOBREVIVENTES TRATADOS COM 20 mg/kg DE AU E DSAU

Em ensaios *in vivo* cujo tratamento se deu com administração de doses de fármacos a 20 mg/Kg, todos os animais dos grupos controle negativo e placebo morreram antes do término do tratamento em fase aguda da infecção. Nessa dosagem, animais dos grupos tratados com benzonidazol e AU e DSAU sobreviveram.

Dessa maneira, podemos também avaliar o potencial do AU e DSAU frente à cronificação da doença de Chagas e seu papel na manutenção da sobrevivência dos animais.

4.2.2.6.1 CORAÇÃO

Na figura 37 temos os dados fornecidos por PCR em tempo real, de tecido cardíaco de animais sobreviventes à infecção aguda da doença de Chagas após terem sido submetidos à tratamento oral, na dose de 20 mg/kg pelos compostos

estudados no presente trabalho. Juntamente com BZ e AU, nessa dosagem, a dispersão sólida de ácido ursólico mostrou a sua potencialidade em controlar a carga parasitária no coração. Como pode se ver na tabela 13, ambos causaram diminuição drástica no número de parasitas por de células de camundongo em comparação com animais do mesmo grupo sacrificados em fase aguda (figura 29). Sendo, portanto, o AU e DSAU capazes de uma redução parasitária intracelular maior que o benzonidazol, posto que não há, entre os grupos BZ, AU e DSAU, diferenças estatisticamente significantes de quantidade de parasitas no coração de animais sobreviventes.

Figura 37. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10^2 células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

Na mesma linha dos resultados descritos acima, os cálculos de cargas parasitárias / ng de tecido explicitados na figura 38, demonstra valores que indicam o mesmo perfil de redução parasitária no coração de animais tratados com BZ, AU e DSAU, embora utilizando cálculos diferentes. Os corações de animais tratados com

benzonidazol apresentaram quantidade de expressão do parasita muito próximas às apresentadas pelas amostras coletadas de animais tratados com AU e DSAU, mostrando o potencial de ambos em reduzir o número de células do parasita no tecido cardíaco de animais sobreviventes, quando administrados na dose de 20 mg/Kg.

Tabela 14 - Redução da carga parasitária média (%) no coração e no fígado (fase crônica em comparação à fase aguda) dos animais tratados na dose 20 mg/kg com benzonidazol, ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU).

	Redução de carga parasitária – 20 mg/kg			
	Coração		Fígado	
	<i>T.cruzi</i> /GAPDH	<i>T.cruzi</i> /massa	<i>T.cruzi</i> /GAPDH	<i>T.cruzi</i> /massa
Benzonidazol	53,3%	45,7%	38,8%	27,6%
AU	79,3%	77,9%	47,3%	+28,3%
DSAU	75,9%	68,3%	58,9%	45,0%

Figura 38. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de coração de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo, animais tratados com benzonidazol.

4.2.2.6.2 FÍGADO

Os gráficos expressos na figura 39 e 40 trazem, respectivamente, as quantidades de fitas de DNA de parasita em relação ao número de células de camundongo e à massa do tecido analisado. Na primeira, observamos que na dose 20 mg/Kg, assim como aconteceu nas análises de tecido hepático de animais sobreviventes na dose 8 mg/Kg, o benzonidazol e o ácido ursólico diminuíram o número de parasitas / células de fígado dos animais em relação aos animais do mesmo grupo que foram eutanasiados na fase aguda da doença (Figura 31). Da mesma forma, o DSAU, confirmando os resultados apresentados acerca de amostras cardíacas, também promoveu níveis parasitários tão baixos quanto do controle positivo, demonstrando que, por conter apenas 10% do princípio ativo, a dispersão sólida potencializou a atividade tripanocida do ácido ursólico. Não houve, entre os três grupos, diferenças estatisticamente significantes.

Figura 39. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por 10² células de mamífero (determinadas pelo GAPDH), em fígado de animais infectados com 1,0x10⁴ formas tripomastigotas da cepa CL Brener e tratados, por via oral, com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 20 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

A segunda figura traz os resultados do cálculo de número de parasitas / massa de tecido. Estes apresentam comportamento muito semelhante ao descrito anteriormente para o benzonidazol e DSAU, pois os fígados de animais sobreviventes tratados estes compostos apresentaram concentração parasitária baixa e menor que dos animais do mesmo grupo na fase aguda da doença.

Especificamente nessa análise, embora não estatisticamente significativa, houve uma maior expressão de *Trypanosoma cruzi* em fígado de animais tratados com AU em relação aos outros grupo, porém, 28,3% maior que nos fígados dos animais do mesmo grupo sacrificados em fase aguda.

Figura 40. Quantidade de fitas de DNA de *Trypanosoma cruzi* por ng de tecido de fígado de animais infectados com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral com ácido ursólico (AU) e dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU), na dose de 8 mg/Kg durante 20 dias, e sobreviveram mais de 180 dias após o período do tratamento. Controle positivo: animais tratados com benzonidazol.

Este conjunto de dados obtidos no estudo da atividade terapêutica de nossos compostos candidatos sobre a doença de Chagas experimental *in vivo*, em modelo animal, geram importantes indicações do potencial tripanocida do ácido ursólico e especialmente de sua dispersão sólida.

É sabido que, na passagem para a fase crônica, da doença de Chagas, a parasitemia atinge índices muito baixos, ao contrário do perfil parasitêmico no início da infecção. Porém, essa diminuição não evidencia a cura, e sim o controle imunológico pelo hospedeiro, auxiliado pela quimioterapia empregada.

Devido à sua localização silenciosa e oculta, as formas amastigotas intracelulares são os principais responsáveis por cerca de 50.000 mortes anuais causadas pela lesões teciduais chagásicas crônicas (ROMERO; MORILLA, 2010).

Em nossos estudos é possível perceber, em todos as análises de quantificação parasitária no coração e no fígado de animais que receberam 8 e 20 mg/Kg de AU, embora não tenham alcançado à cura, sobreviveram à fase aguda da

doença de Chagas e apresentaram cargas parasitárias, nos órgãos analisados, equivalentes às encontradas em órgãos de camundongos tratados com benzonidazol nas mesmas doses, sendo de eficácia terapêutica similar ao fármaco disponível no mercado, porém com menores ações tóxicas e possivelmente promovendo efeitos positivos, como hepatoproteção (SARAVANAN et al., 2006).

Destaca-se aqui a atividade verificada para a dispersão sólida de ácido ursólico (DSAU). Embora contendo 10% do fármaco, promoveu a sobrevivência de 80% dos animais tratados na dose de 20 mg/Kg. Esse perfil terapêutico gera boas expectativas pois, sendo os carreadores da dispersão sólida inertes, atóxicos e de baixo custo (ELOY et al., 2014), vislumbra-se que o caminho a ser trilhado para o desenvolvimento de um novo tratamento, eficaz e seguro desta parasitose, passa pela utilização de tecnologia farmacêutica como estratégia.

Adicionalmente, os corações e fígados dos animais do grupo tratado com DSAU apresentaram cargas parasitárias (tanto relativas às células de camundongo quanto à massa de tecido analisado) nos mesmos níveis do controle positivo e do AU livre. Dessa maneira infere-se que, possivelmente, a biodisponibilidade do fármaco foi potencializada graças à melhor dissolução em água e maior absorção intestinal da formulação (KOTTA, et al., 2012).

Conforme demonstrado em estudos recentes, os sistemas de entrega de fármacos (*Delivery systems*) podem ser usados para melhorar as propriedades da molécula, como por exemplo, aumentar a solubilidade em água, a semi-vida ativa, a modulação da farmacocinética e garantindo a segurança do tratamento medicamentoso (HEIDARI-KHARAJI et al., 2016).

Liao et al. (2005) estudou em modelo animal, a farmacocinética do ácido ursólico administrado por via oral, e mostrou que este composto, embora absorvido rapidamente (pico de concentração após 1h da administração, característico de compostos lipofílicos) indicando ter baixo volume de distribuição, seja por baixa absorção intestinal, ou por metabolismo de primeira passagem no fígado, prejudicando a biodisponibilidade oral.

Verifica-se que o estudo farmacocinético sobre ativos oriundos de plantas medicinais são muito úteis para explicar e prever uma variedade de eventos relacionados com a eficácia e a toxicidade do fármaco (YANG et al., 2011). Por isso é notório o crescente interesse em desvendar os parâmetros farmacocinéticos dos

compostos para, dessa forma poder aplicar algum tipo de estratégia afim de viabilizar o princípio ativo, especialmente para a via oral.

Obviamente, por motivos moleculares, compostos como as saponinas (LI et al., 2013; LIU et al., 2013), amirinas (MOREIRA et al., 2013) e ácido oleanólico (XU et al., 2013) da classe dos terpenos, tem mostrado, na literatura, os mesmos problemas farmacocinéticos que o ácido ursólico.

A biodisponibilidade oral está limitada por fatores, tais como permeabilidade em membrana e a solubilidade do fármaco. Faz-se necessário então, a aplicação de modificações químicas ou farmacotécnicas, que tem como objetivo aumentar a área da superfície da molécula e a taxa de dissolução das partículas, por conseguinte, a pesquisa atual está focada na geração de estados amorfos ou redução de tamanho de partícula (YANG et al., 2012).

O ácido ursólico tem integrado diversos sistemas nanoestruturados (Jin et al., 2016) e lipossomais (QIAN et al., 2015), que comprovam ser eficazes em aumentar a eficiência terapêutica, reduzir os efeitos secundários e aumentar a sua biodisponibilidade.

Baseados nessas informações e dados, podemos afirmar que resultados compilados no presente trabalho sugerem que o emprego das dispersões sólidas como sistemas de liberação do composto é uma boa estratégia e gera alternativas para melhorar a quimioterapia limitada da doença de Chagas (FONSECA-BERZAL et al., 2015).

4.2.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO *IN VIVO* DO AU E DSAU SOBRE A LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL

Devido às questionáveis eficácias dos medicamentos antileishmaniais, aos altos preços das alternativas atualmente apresentadas e aos incômodos ocasionados pelos diversos efeitos colaterais, justifica-se a importância de pesquisas por novos compostos leishmanicidas (KOBETS et al., 2012). Desde a descoberta do primeiro medicamento contra leishmaniose (antimoniais pentavalentes), até os dias atuais, a busca por substâncias com atividade biológica contra este parasita, isentos de efeitos tóxicos e capaz de superar questões de resistência, permanece como objetivo recorrente (SANTOS et al., 2008). Uma vasta gama de princípios ativos, sintéticos e naturais, têm sido estudados, sendo dada

especial atenção a compostos oriundos do metabolismo secundário de vegetais, como os terpenos, seus análogos e derivados (CHEN et al., 1994; ARRUDA et al., 2009).

Em ensaios com camundongos Balb/c, machos, infectados com 2×10^6 formas promastigotas de *L.braziliensis*, avaliamos o potencial terapêutico dos compostos AU e DSAU nas doses de 8 e 20 mg/Kg, através da medida do diâmetro da lesão leishmaniótica e pela variação total do tamanho da lesão durante o período do tratamento por via oral (20 dias). O Glucantime® foi utilizado como controle positivo (sendo administrado intraperitonealmente) nas mesmas doses, e como controle negativo, um grupo de animais infectados foi tratado com solução fisiológica com 5% de DMSO. Paralelamente, um grupo de animais, nas mesmas condições, foi tratado com 20 mg/Kg de dispersão sólida isenta de ácido ursólico (grupo placebo), com intuito de observar a influencia dos carreadores poliméricos no tratamento.

A figura 41 mostra a variação média do diâmetro das lesões, ao longo do tratamento, dos grupos de animais tratados com uma dose de 8 mg/Kg.

Figura 41. Variação média das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* durante o tratamento oral com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico, na dose de 8 mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Percebemos que na dosagem 8 mg/Kg, a variação média, ao longo do tratamento, das lesões dos animais tratados com AU foram menores que do controle negativo, e nos primeiros dias do tratamento, apresentaram variações menores que dos animais tratados com glucantime, tendo estes dois grupos, posteriormente, perfis muito semelhantes de variação. Embora a cura não tenha sido alcançada, no final do ensaio pudemos observar a variação total das lesões, e como demonstrado na figura 42, os animais tratados com AU tiveram a extensão da lesão no mesmo patamar que dos animais do grupo tratado com glucantime, e ambos, consideravelmente menores que dos animais do grupo controle negativo. O grupo de animais tratados com DSAU demonstrou variações de tamanho das lesões ao longo do tratamento e variação total, semelhantes ao controle negativo, não conseguindo estatisticamente, nessa dose, conter o avanço da lesão muco-cutânea leishmaniótica.

Figura 42. Variação total das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* após o período de tratamento (20 dias) com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico na dose de 8 mg/kg, oralmente. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método

One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*).

Nas figuras 43 e 44, pode-se observar, visualmente, a lesão no início e após o tratamento com dose 8 mg/Kg, respectivamente.

Figura 43. Aspectos iniciais das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após período de pré-latência. Início do tratamento com dose 8 mg/Kg de acordo com os grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico.

Figura 44. Aspectos das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após 20 dias de tratamento com dose 8 mg/Kg. Grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico.

Já nos ensaios empregando doses de 20 mg/Kg, o composto AU apresentou redução do diâmetro médio das lesões, com menores variações durante o tratamento, quando comparados ao controle negativo (Figura 45), embora, no início do tratamento, a variação média das lesões tenham sido maiores, com posterior perfil de estabilização.

O grupo tratado com DSAU apresentou variações no diâmetro das lesões semelhante ao controle negativo durante grande parte do tratamento, porém nos últimos dias houve uma diminuição no crescimento dos ferimentos. Possivelmente, a dispersão sólida contendo ácido ursólico, liberaram o composto lentamente, fazendo com que o efeito fosse retardado, tornando-se, após 20 dias, semelhante ao AU, mesmo contendo apenas 10% do princípio ativo.

Figura 45. Variação média das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* durante o tratamento oral com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico, na dose de 20 mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet. Os resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Além disso, as variações total das lesões ao final do tratamento dos grupos AU e DSAU, como podem ser observadas na figura 46, foram menores que o controle negativo. Em adição, o grupo controle positivo apresentou variações médias, durante o tratamento, semelhantes aos nossos compostos, assim como a variação total.

Destaca-se aqui o benefício demonstrado pela aplicação da tecnologia farmacêutica sobre o ácido ursólico. A dispersão sólida (DSAU) empregada em nossos ensaios contém apenas 10% em massa do triterpeno. Sendo assim, infere-se que a obtenção de efeito terapêutico semelhante ao fármaco livre, tem respaldo na melhor solubilidade, absorção e biodisponibilidade da formulação. De acordo com Immordino et al. (2006) e Tiuman et al. (2011) sistemas de liberação prolongada e em alvos específicos (*delivery systems*) como nanopartículas, lipossomas e dispersões sólidas acarretam aumento na atividade terapêutica dos fármacos.

Figura 46. Variação total das lesões de animais infectados por *Leishmania braziliensis* após o período de tratamento (20 dias) com (AU) ácido ursólico e (DSAU) dispersão sólida de ácido ursólico na dose de 20 mg/kg, oralmente. Controle positivo: animais tratados com Glucantime (intraperitoneal); Controle negativo: Animais tratados com solução 5% DMSO. Avaliação estatística feita pelo método One-way ANOVA com teste complementar de Dunnet, sendo significantes quando $p < 0,05$ (*).

O valor da aplicação de modificações farmacotécnicas não se dá apenas no que se refere à efetividade biológica, mas também na diminuição dos efeitos tóxicos dos medicamentos. Como é sabido, os efeitos adversos da anfotericina B tem sido bastante controlados com o advento das suas formulações lipídicas, que “mascaram” a anfotericina B de tecidos susceptíveis e facilitam a entrada da molécula preferencialmente em células reticulo-endoteliais, sendo assim entregue nos alvos onde se encontra o parasita, resultando em maior eficácia e reduzida toxicidade (KOBETS et al., 2012).

Ao contrário do que se observa nas dispersões sólidas, que geralmente são constituídas por insumos de baixo custo (ELOY et al., 2014) a utilização das

formulações lipídicas da anfotericina B é limitada pelo alto preço delas (MOORE; LOCKWOOD, 2010).

Nas figuras 47 e 48, pode-se observar, visualmente, a lesão no início e após o tratamento com dose 20 mg/Kg, respectivamente.

Figura 47. Aspectos iniciais das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após período de pré-latência. Início do tratamento com dose 8 mg/Kg de acordo com os grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico.

Figura 48. Aspectos das lesões de camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* após 20 dias de tratamento com dose 8 mg/Kg. Grupos: CP – Controle Positivo (Glucantime); CN – Controle Negativo; AU – ácido ursólico; DSAU – Dispersão sólida de ácido ursólico.

Os resultados aqui apresentados demonstram que, embora não tenhamos alcançado a cura, os compostos avaliados apresentaram potencial terapêutico similar ao glucantime, fármaco largamente utilizado na clínica.

Em ambas as doses propostas, o perfil de variação das lesões dos animais tratados com AU corrobora os resultados apresentados por Yamamoto et al. (2014), em cujo trabalho, lesões cutâneas nas patas de camundongos Balb/c infectados com *Leishmania amazonenses*, tratados com frações triterpênicas purificadas de folha de *Baccharis uncinella*, contendo AU, sofreram diminuição de tamanho em comparação ao controle negativo, e os animais apresentaram menor parasitismo na pele, concluindo o autor, que AU apresenta eficácia superior em tratamento de leishmaniose experimental em comparação ao glucantime.

Embora poucos trabalhos tenham sido feitos e publicados com ensaios *in vivo*, Arruda et al. (2005), testou o nerolidol (presente em óleos essenciais de várias plantas) intraperitonealmente em ratos experimentalmente infectados com *Leishmania braziliensis* e observou boa eficiência na redução das lesões cutâneas. Em contraste, aplicações tópicas não geraram efeitos satisfatórios e após o encerramento do tratamento, as lesões reapareceram, sugerindo a necessidade de tratamentos mais longos.

O triterpeno ácido ursólico mostra-se vantajoso em relação a este composto, uma vez que sendo administrado oralmente, mostrou maior eficácia em relação ao controle negativo e como atividade muito semelhante ao glucantime nas mesmas doses.

Da mesma maneira, Queiroz et al. (2016), após previamente observar a atividade do extrato hidroetanólico da *Selaginella sellowii* contra formas intracelulares amastigotas de *Leishmania amazonenses* (*in vitro*), efetuou testes em hamsters infectados com o mesmo parasita. Os biflavonoides e fenilpropanoides glicosídeos, maiores constituintes de tal extrato, mostraram serem capazes de suprimir em quase 100% os parasitas do local da infecção quando administrados localmente na dose de 50 mg/Kg. Quando administrados por via oral, a supressão foi menor, mas comparável aos valores de supressão apresentados pelo controle positivo (antimonial (Sb) N-metilglucamina).

Com todos esses dados encontrados reforça-se a certeza do potencial dos produtos naturais como candidatos a futuros medicamentos contra leishmaniose cutânea americana, assim como o emprego de tecnologia farmacêutica no intuito de potencializar a eficácia dos tratamentos disponíveis (HEIDARI-KHARAJI et al., 2016).

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, apresentados e discutidos em nosso trabalho permitiu-nos chegar às seguintes conclusões:

- O triterpeno ácido ursólico não é citotóxico às células de mamíferos e, portanto, seguro para ser utilizado em testes *in vivo*. Da mesma maneira, a dispersão sólida contendo 10% de AU também não apresentou citotoxicidade, sendo os carreadores (caprato de sódio e Polaxamer 407) realmente inertes.
- Nos ensaios *in vitro* sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*, nossos candidatos mostraram melhores resultados de ação tripanocida que o benzonidazol.
- Sobre formas promastigotas de *L.braziliensis*, a associação equimolar (1AU:1AnB) mostrou ser tão eficaz quanto a Anfotericina B.
- Ensaios com formas intracelulares (amastigotas) de ambos os parasitas revelaram a dificuldade de permeabilidade do ácido ursólico, porém, os valores de IC₅₀ demonstram boa atividade biológica.
- Embora não tenha ocorrido a cura parasitológica em nenhum dos casos, os experimentos *in vivo* demonstraram que nossos compostos propostos apresentaram bons níveis de atividade quando comparados aos controles negativos.
- O ácido ursólico é um potente candidato a quimioterápico para o tratamento de doenças determinadas por tripanosomatídeos. Associá-lo a fármacos estabelecidos, pode ser uma boa estratégia para futuros testes *in vivo*.
- A utilização de formulações envolvendo tecnologia farmacêutica parece ter um efeito potencializador, ou seja, com maior eficácia mesmo com o princípio ativo em menores concentrações, possivelmente, graças às propriedades estruturais que promovem melhor absorção e consequente biodisponibilidade, a ser comprovado com estudos futuros de farmacocinética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. et al. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 11, p. 1485-7, Nov 2002. ISSN 0918-6158
- ABRAHAM, G. et al. A case report of visceral leishmaniasis in Singapore. **Ann Acad Med Singapore**, v. 26, n. 5, p. 713-6, Sep 1997. ISSN 0304-4602
- ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-31, Mar 6 2007. ISSN 0009-7322.
- ADL, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol**, v. 59, n. 5, p. 429-93, Sep 2012. ISSN 1066-5234.
- AL MUSAYEIB, N. M. et al. In vitro antiprotozoal activity of triterpenoid constituents of *Kleinia odora* growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9207-18, 2013. ISSN 1420-3049.
- ALBRECHT, H. Leishmaniosis--new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. **Aids**, v. 12, n. 16, p. 2225-6, Nov 12 1998. ISSN 0269-9370
- ALVARADO, H. L. et al. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 130, p. 40-7, Jun 1 2015. ISSN 0927-7765.
- ANDRADE, S. G. et al. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotypes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 2006. ISSN 0037-8682
- APARECIDA RESENDE, F. et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sci**, v. 79, n. 13, p. 1268-73, Aug 22 2006. ISSN 0024-3205
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 145-6, Apr-Jun 1996. ISSN 1080-6040
- ARRUDA, D. C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1679-87, May 2005. ISSN 0066-4804
- ARRUDA, D. C. et al. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomed Pharmacother**, v. 63, n. 9, p. 643-9, Nov 2009. ISSN 0753-3322.

- BAILY, G. G.; NANDY, A. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. **J Infect**, v. 29, n. 3, p. 241-7, Nov 1994. ISSN 0163-4453
- BARRETT, M. P.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 82-8, Feb 1999. ISSN 0966-842X
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007. ISSN 0020-7519
- BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania-host interactions: what has imaging taught us? **Cell Microbiol**, v. 13, n. 11, p. 1659-67, Nov 2011. ISSN 1462-5814.
- BEGUM, S. et al. Leishmanicidal Triterpenes from Lantana camara. **Chem Biodivers**, v. 11, n. 5, p. 709-18, May 2014. ISSN 1612-1872.
- BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; HANSEN, B. D. Leishmania mexicana: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. **Exp Parasitol**, v. 64, n. 1, p. 127-31, Aug 1987. ISSN 0014-4894
- BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, v. 373, n. 5, p. 456-66, Jul 30 2015. ISSN 0028-4793.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Adv Parasitol**, v. 75, p. 19-47, 2011. ISSN 0065-308x.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 5, p. e52-4, Sep 1 2009. ISSN 1058-4838.
- BETTIOL, E. et al. Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular Trypanosoma cruzi by chemical library screening. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 2, p. e384, 2009. ISSN 1935-2727.
- BOCK, M. et al. The structure-activity relationship of 4-(5'-nitrofurfurylidene-amino)-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxides active against Trypanosoma cruzi. **Arzneimittelforschung**, v. 22, n. 9, p. 1564-9, Sep 1972. ISSN 0004-4172
- BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1221-34, Jun 2008. ISSN 1462-5814.
- BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 396-402, May 4 2007. ISSN 0378-8741

- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962. ISSN 0036-4665
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2592-7, Nov 1996. ISSN 0066-4804
- BURKI, F. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 5, p. a016147, May 2014.
- C, B. M.; FRANCO, C. H. Novel drug discovery for Chagas disease. **Expert Opin Drug Discov**, Mar 11 2016. ISSN 1746-0441.
- CAMARGOS, H. S. et al. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104429, 2014. ISSN 1932-6203.
- CANUTO, G. A. et al. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**, Jun 10 2015. ISSN 0173-0835.
- CARON, D. A. Past President's address: protistan biogeography: why all the fuss? In: (Ed.). **J Eukaryot Microbiol**. United States, v.56, 2009. p.105-12. ISBN 1550-7408 (Electronic) 1066-5234 (Linking).
- CARTER, K. C. et al. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 88-95, Jan 2006. ISSN 0066-4804
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V.; FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J Protozool**, v. 14, n. 3, p. 447-51, Aug 1967. ISSN 0022-3921
- CASTELLI, G. et al. In vitro Antileishmanial Activity of trans-Stilbene and Terphenyl Compounds. **Exp Parasitol**, Mar 4 2016. ISSN 0014-4894.
- CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-9, Aug 2006. ISSN 0960-3271
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biol Lett**, v. 6, n. 3, p. 342-5, Jun 23 2010. ISSN 1744-9561.
- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb 6 2015. ISSN 0049-8114

- CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 4807-23, 2015. ISSN 1177-8881.
- CHATTOPADHYAY, D. et al. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. **Contraception**, v. 71, n. 5, p. 372-8, May 2005. ISSN 0010-7824
- CHEN, M. et al. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 6, p. 1339-44, Jun 1994. ISSN 0066-4804
- CHEN, Q. et al. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, n. 8, p. 2877-84, Mar 2011.
- CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. **Br J Pharmacol**, v. 167, n. 8, p. 1596-608, Dec 2012. ISSN 0007-1188.
- COGO, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2,3-disubstituted quinoxaline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. **Eur J Med Chem**, v. 90, p. 107-23, Jan 27 2015. ISSN 0223-5234.
- CONTI, R. V. et al. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. **J Vector Borne Dis**, v. 53, n. 2, p. 99-104, Apr-Jun 2016. ISSN 0972-9062
- COSTA, M. A. et al. Ancient Leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e6983, 2009. ISSN 1932-6203.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 113-22, Oct 30 2007. ISSN 0074-0276
- COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-54, Jul 2009. ISSN 0074-0276.
- COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962-7, Dec 2013. ISSN 0074-0276.

- COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 0074-0276.
- CRETTON, S. et al. Chemical constituents from *Waltheria indica* exert in vitro activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Fitoterapia**, v. 105, p. 55-60, Sep 2015. ISSN 0367-326x.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 502-8, Nov 2003. ISSN 1471-4922
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006. ISSN 0893-8512
- CRUZ, A. K. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Curr Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 178-92, Mar 2009. ISSN 1389-4501.
- CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, n. 1, p. 53-9, Jun 2003. ISSN 0166-6851
- CUNHA, W.R. et al. *In vitro* inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. **Pharm. Biol.**, v.46, p.292-294. 2008.
- CUNHA, W. R. et al. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytother Res**, v. 20, n. 6, p. 474-8, Jun 2006. ISSN 0951-418X
- CUNHA, W. R. et al. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *miconia* species. **Planta Med**, v. 69, n. 5, p. 470-2, May 2003. ISSN 0032-0943
- DA SILVA FERREIRA, D. et al. In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol**, v. 134, n. 4, p. 455-9, Aug 2013. ISSN 0014-4894.
- DE ANGEL, R. E. et al. Antitumor effects of ursolic acid in a mouse model of postmenopausal breast cancer. **Nutr Cancer**, v. 62, n. 8, p. 1074-86, 2010. ISSN 0163-5581.
- DE CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, Aug 2001. ISSN 0367-326X

- DE FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 3, p. e24, Mar 2006. ISSN 1553-7366.
- DE MORAIS, C. G. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 324915, 2015.
- DE OLIVEIRA ELOY, J. et al. Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1436-45, Dec 2012. ISSN 1530-9932.
- DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 9, p. 822-38, 2008. ISSN 1381-6128.
- DIAS, J. C.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C. J. [Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 669-78, Nov-Dec 2002. ISSN 0037-8682
- DO SOCORRO, S. R. M. S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 6, p. 1895-901, Jun 2003. ISSN 0066-4804
- DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Lett**, v. 215, n. 2, p. 129-40, Nov 25 2004. ISSN 0304-3835
- DUJARDIN, J. C. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1013-8, Jul 2008. ISSN 1080-6040.
- DUSCHAK, V. G. A decade of targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 6, n. 3, p. 216-59, Sep 1 2011. ISSN 1574-891x.
- DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 3, p. 394-411, Jun 2006. ISSN 0265-0568
- EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 3, p. 283-309, Sep 2003. ISSN 0163-7258
- ELOY, J.O. et al. Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 51, n. 1, p. 101-109, Mar. 2015

- EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 3, p. 335-40, Mar 2010. ISSN 0926-9959.
- ERIKSSON, U.; SEIFERT, B.; SCHAFFNER, A. Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. **Bmj**, v. 322, n. 7286, p. 579-82, Mar 10 2001. ISSN 0959-8138
- ESPUELAS, S. et al. Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 25, p. 4259-88, 2012. ISSN 0929-8673.
- FERREIRA DDA, S. et al. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitol Res**, v. 106, n. 4, p. 985-9, Mar 2010. ISSN 0932-0113.
- FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. **Traffic**, v. 5, n. 12, p. 905-13, Dec 2004. ISSN 1398-9219
- FIELD, M. C. et al. Intracellular trafficking in the trypanosomatids. **Traffic**, v. 8, n. 6, p. 629-39, Jun 2007. ISSN 1398-9219
- FONSECA-BERZAL, C. et al. Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. **Exp Parasitol**, v. 149, p. 84-91, Feb 2015. ISSN 0014-4894.
- FOURNET, A.; MUNOZ, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 11, p. 1215-37, Nov 2002. ISSN 1568-0266
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, Jul-Aug 2010. ISSN 0001-706x.
- GERBETH, K. et al. In vitro metabolism, permeation, and brain availability of six major boswellic acids from *Boswellia serrata* gum resins. **Fitoterapia**, v. 84, p. 99-106, Jan 2013. ISSN 0367-326x.
- GNOATTO, S. C. et al. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 23, n. 5, p. 604-10, Oct 2008. ISSN 1475-6366.
- GONG, C. et al. Efficient inhibition of colorectal peritoneal carcinomatosis by drug loaded micelles in thermosensitive hydrogel composites. **Nanoscale**, v. 4, n. 10, p. 3095-104, May 21 2012. ISSN 2040-3364.

- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004. ISSN 1415-790X.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 419-33, Apr 2010. ISSN 1478-7210.
- GRAZIOSE, R. et al. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 2, p. 456-61, Jul 13 2012. ISSN 0378-8741.
- GRECCO, S. S. et al. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Parasitol Res**, v. 106, n. 5, p. 1245-8, Apr 2010. ISSN 0932-0113.
- GUA, J. Q. et al. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. **Z Naturforsch C**, v. 59, n. 11-12, p. 797-802, Nov-Dec 2004. ISSN 0939-5075
- GUARINO, A. et al. Visceral leishmaniasis in a child with HIV-1 infection. **Eur J Pediatr**, v. 153, n. 4, p. 301-2, Apr 1994. ISSN 0340-6199
- HAANSTRA, J. R. et al. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. **Biochim Biophys Acta**, Sep 16 2015. ISSN 0006-3002
- HAMILTON, P. B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 12, p. 1393-404, Nov 2004. ISSN 0020-7519
- HAMMARTON, T. C.; MOTTRAM, J. C.; DOERIG, C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. **Prog Cell Cycle Res**, v. 5, p. 91-101, 2003. ISSN 1087-2957
- HARROLD, M.W.; ZAVOD, R.M. *Basic Concepts in Medicinal Chemistry*. American Society of Health-System Pharmacists. 440pp. 2013. Available from
- HASHIM, F. A. et al. Apparently successful treatment of two cases of post kala-azar dermal leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 4, p. 440, Jul-Aug 1995. ISSN 0035-9203
- HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C. J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 45, 2012. ISSN 1756-3305.

- HEGER, T. J. et al. A resurgence in field research is essential to better understand the diversity, ecology, and evolution of microbial eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 214-23, Mar-Apr 2014. ISSN 1066-5234.
- HEIDARI-KHARAJI, M. et al. Solid lipid nanoparticle loaded with paromomycin: in vivo efficacy against Leishmania tropica infection in BALB/c mice model. **Appl Microbiol Biotechnol**, Mar 10 2016. ISSN 0175-7598.
- HIBBS, J. B., JR. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 157, n. 1, p. 87-94, Nov 30 1988. ISSN 0006-291X
- HOARE, C. A. The classification of mammalian trypanosomes. **Ergeb Mikrobiol Immunitatsforsch Exp Ther**, v. 39, p. 43-57, 1966. ISSN 0367-1003
- HOET, S. et al. In vitro antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants. **J Ethnopharmacol**, v. 91, n. 1, p. 37-42, Mar 2004. ISSN 0378-8741
- HOFSTRAAT, K.; VAN BRAKEL, W. H. Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. **Int Health**, v. 8 Suppl 1, p. i53-i70, Mar 2016.
- HOLANDA PINTO, S. A. et al. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 630-4, Aug 2008. ISSN 0944-7113.
- HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **J Protozool**, v. 10, p. 20-63, Feb 1963. ISSN 0022-3921
- HORIUCHI, K. et al. Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 6, p. 1147-9, Jun 2007. ISSN 0918-6158
- HOTEZ, P. J. Stigma: the stealth weapon of the NTD. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 4, p. e230, 2008. ISSN 1935-2727.
- HOTEZ, P. J. et al. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.368, 2006. p.1865-6. ISBN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).
- HOUGHTON, R. L. et al. A cloned antigen (recombinant K39) of Leishmania chagasi diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. **J Infect Dis**, v. 177, n. 5, p. 1339-44, May 1998. ISSN 0022-1899

- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 1, p. 26-42, Jan 2008. ISSN 1613-4125
- IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **Int J Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297-315, 2006. ISSN 1176-9114
- IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat Prod Rep**, v. 28, n. 4, p. 809-23, Apr 2011. ISSN 0265-0568.
- JEONG, H. G.; KIM, H. G.; HWANG, Y. P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicol Lett**, v. 155, n. 3, p. 369-76, Mar 15 2005. ISSN 0378-4274
- JIN, H. et al. Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. **Appl Microbiol Biotechnol**, Feb 17 2016. ISSN 0175-7598.
- JIN, X. et al. Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline nanoparticles containing piperine: in vitro and in vivo studies. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 641-52, 2013. ISSN 1176-9114.
- KARA, P. D. et al. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus. **Arch Virol**, v. 148, n. 7, p. 1335-56, Jul 2003. ISSN 0304-8608
- KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sci**, v. 146, p. 201-13, Feb 1 2016. ISSN 0024-3205.
- KATZ, L. A. Origin and diversification of eukaryotes. **Annu Rev Microbiol**, v. 66, p. 411-27, 2012. ISSN 0066-4227.
- KAYSER, O. et al. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 288-92, Jan 2001. ISSN 0066-4804
- KHATAMI, A. et al. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. **J Am Acad Dermatol**, v. 57, n. 2, p. 335.e1-29, Aug 2007. ISSN 0190-9622.
- KIM, J.; KIM, H.; PARK, S. B. Privileged structures: efficient chemical "navigators" toward unexplored biologically relevant chemical spaces. **J Am Chem Soc**, v. 136, n. 42, p. 14629-38, Oct 22 2014. ISSN 0002-7863.

- KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 10, p. 1443-74, 2012. ISSN 0929-8673.
- KOTTA, S. et al. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 9, n. 5, p. 585-98, May 2012. ISSN 1742-5247.
- LAGUNA, F. et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 16, n. 12, p. 898-903, Dec 1997. ISSN 0934-9723
- LEE, S. H. et al. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 691-9, Aug 25 2006. ISSN 0092-8674
- LEITE, J. P. et al. Trypanocidal activity of triterpenes from Arrabidaea triplinervia and derivatives. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 11, p. 2307-9, Nov 2006. ISSN 0918-6158
- LI, H. L. et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of swertiamarin in rat plasma and its application in pharmacokinetics. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 19, p. 1653-8, Jun 1 2011. ISSN 1570-0232.
- LI, S. X.; MU, Y.; ZHENG, F. Y. Influence of gastrointestinal digestion and edible plant combination on oral bioavailability of triterpene saponins, using a biomimetic digestion and absorption system and determination by HPLC. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 44, p. 10599-603, Nov 6 2013. ISSN 0021-8561.
- LI, Z. H. et al. Simultaneous determination of five triterpene acids in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Folium Eriobotryae effective fraction. **Biomed Chromatogr**, v. 29, n. 12, p. 1791-7, Dec 2015. ISSN 0269-3879.
- LIAO, Q. et al. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. **Yakugaku Zasshi**, v. 125, n. 6, p. 509-15, Jun 2005. ISSN 0031-6903
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005. ISSN 0929-8673
- LIMA, M. I. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 3, p. 227-32, Mar 2010. ISSN 0340-5761.

- LINARES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 3, p. 335-60, 2006. ISSN 0929-8673
- LIPOLDOVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 4, p. 294-305, Apr 2006. ISSN 1471-0056
- LITT, E.; BAKER, M. C.; MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases and mental health: a perspective on comorbidity. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 5, p. 195-201, May 2012. ISSN 1471-4922.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v. 49, n. 2, p. 57-68, Dec 1 1995. ISSN 0378-8741
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 92-4, Aug 22 2005. ISSN 0378-8741
- LIU, Y. et al. Validated rapid resolution LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinenosides from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel in rat plasma: application to pharmacokinetics and bioavailability studies. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 942-943, p. 141-50, Dec 30 2013. ISSN 1570-0232.
- LOPEZ-GARCIA, P.; MOREIRA, D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. **Res Microbiol**, v. 159, n. 1, p. 67-73, Jan-Feb 2008. ISSN 0923-2508
- LOZANO, E. et al. Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, v. 61, n. 4, p. 628-33, Dec 2012. ISSN 1383-5769.
- LOZANO, E. S. et al. An abietane diterpene from *Salvia cuspidata* and some new derivatives are active against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 23, p. 5481-4, Dec 1 2015. ISSN 0960-894x.
- LUKES, J. et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, v. 195, n. 2, p. 115-22, Jul 2014. ISSN 0166-6851.
- MA, C. M. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **Eur J Med Chem**, v. 40, n. 6, p. 582-9, Jun 2005. ISSN 0223-5234
- MACHADO, C. M. et al. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 6, p. 309-24, Oct-Dec 2009. ISSN 0036-4665.

- MACHADO PDE, A. et al. High selective antileishmanial activity of vanadium complex with stilbene derivative. **Acta Trop**, v. 148, p. 120-7, Aug 2015. ISSN 0001-706x.
- MAHMOUDVAND, H. et al. In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activities of Pistacia vera Essential Oil. **Planta Med**, v. 82, n. 4, p. 279-84, Mar 2016. ISSN 0032-0943.
- MAIA, J. L. et al. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. **Pharmacol Res**, v. 54, n. 4, p. 282-6, Oct 2006. ISSN 1043-6618
- MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **Am J Med**, Jun 4 2015. ISSN 0002-9343.
- MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 617521, 2010. ISSN 1110-7243.
- MARIN, C. et al. In vitro and in vivo trypanocidal activity of flavonoids from Delphinium staphisagria against Chagas disease. **J Nat Prod**, v. 74, n. 4, p. 744-50, Apr 25 2011. ISSN 0163-3864.
- MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 1, p. 43-52, Jan 2013. ISSN 1471-4922.
- MAULVI, F.A. et al. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. **Powder Technol**. 207, p.47–54. 2001.
- MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 601-20, Apr 2007. ISSN 1095-6433
- MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 15 2010. ISSN 0036-8075.
- MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiol Rev**, v. 44, n. 1, p. 140-73, Mar 1980. ISSN 0146-0749
- MERZLYAK, E. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia. **J Eukaryot Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 161-9, Mar-Apr 2001. ISSN 1066-5234

- MICELI, N. et al. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 261-6, Feb 28 2005. ISSN 0378-8741
- MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-77, Dec 2006. ISSN 0006-3002
- MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SANCHEZ-MONTALVA, A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, v. 371, n. 10, p. 966, Sep 4 2014. ISSN 0028-4793.
- MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 151-8, May 2010. ISSN 0974-777x.
- MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 5, p. 1861-75, Sep 2004. ISSN 1466-5026
- MOREIRA FDE, L. et al. A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 84, p. 14-9, Oct 2013. ISSN 0731-7085.
- MOREIRA, V. M. et al. Novel oleanolic vinyl boronates: synthesis and antitumor activity. **Eur J Med Chem**, v. 63, p. 46-56, May 2013. ISSN 0223-5234.
- MORONI, G.; BOSSI, L. Don't forget visceral leishmaniasis in transplant patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 10, n. 4, p. 563-4, 1995. ISSN 0931-0509
- MUELAS-SERRANO, S. et al. In vitro screening of american plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *trichomonas vaginalis*. **J Ethnopharmacol**, v. 71, n. 1-2, p. 101-7, Jul 2000. ISSN 0378-8741
- MULLER, S. et al. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 7, p. 320-8, Jul 2003. ISSN 1471-4922
- NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 5, p. 715-31, Oct 2006. ISSN 1742-5255
- NG, L. G. et al. Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 10, p. 2058-68, Oct 2011. ISSN 0022-202x.
- NORVAL, M. Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK2 cells. **J Gen Virol**, v. 43, n. 2, p. 289-98, May 1979. ISSN 0022-1317

- NOVOTNY, L.; VACHALKOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. Minireview. **Neoplasma**, v. 48, n. 4, p. 241-6, 2001. ISSN 0028-2685
- OLLIARO, P. L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 12, p. 763-74, Dec 2005. ISSN 1473-3099
- ONOUÉ, S. et al. Biopharmaceutical characterization of nanocrystalline solid dispersion of coenzyme Q10 prepared with cold wet-milling system. **Eur J Pharm Sci**, v. 53, p. 118-25, Mar 12 2014. ISSN 0928-0987.
- OSAKABE, N. et al. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 549-57, Apr 2004. ISSN 0143-3334
- OTUKI, M. F. et al. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 1, p. 310-8, Apr 2005. ISSN 0022-3565
- OVESNA, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVA, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutat Res**, v. 600, n. 1-2, p. 131-7, Aug 30 2006. ISSN 0027-5107
- OVESNA, Z. et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Minireview. **Neoplasma**, v. 51, n. 5, p. 327-33, 2004. ISSN 0028-2685
- PALMEIRO-ROLDAN, R. et al. Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **Int J Pharm**, v. 472, n. 1-2, p. 110-7, Sep 10 2014. ISSN 0378-5173.
- PASSERO, L. F. et al. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). **Parasitol Res**, v. 108, n. 3, p. 529-36, Mar 2011. ISSN 0932-0113.
- PASSOS, G. F. et al. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 413-20, Jan 5 2013. ISSN 0014-2999.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 12, p. e1032-9, Dec 2010. ISSN 1201-9712.

- PAWLOWSKI, J. et al. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. **PLoS Biol**, v. 10, n. 11, p. e1001419, 2012. ISSN 1544-9173.
- PEIXOTO, J. A. et al. Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1825-33, 2011. ISSN 1420-3049.
- PELIZZARO-ROCHA, K. J. et al. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 13, n. 12-13, p. 1018-24, Nov 2011. ISSN 1286-4579.
- PEREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, Jul 28 2015. ISSN 1473-3099.
- PEREZ-SILANES, S. et al. Synthesis and biological evaluation of quinoxaline di-N-oxide derivatives with in vitro trypanocidal activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 3, p. 903-6, Feb 1 2016. ISSN 0960-894x.
- PERRY, M. R. et al. Visceral leishmaniasis and arsenic: an ancient poison contributing to antimonial treatment failure in the Indian subcontinent? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 9, p. e1227, Sep 2011. ISSN 1935-2727.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-4, Aug 15 2008. ISSN 0036-8075.
- PHILLIPS, D. R. et al. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Curr Opin Plant Biol**, v. 9, n. 3, p. 305-14, Jun 2006. ISSN 1369-5266
- PINAZO, M. J.; GASCON, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Trop**, Jul 15 2015. ISSN 0001-706x.
- PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 422-6, 2003. ISSN 0944-7113
- POLANCO-HERNANDEZ, G. et al. Synergistic Effect of Lupenone and Caryophyllene Oxide against *Trypanosoma cruzi*. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 435398, 2013. ISSN 1741-427X
- POSTIGO, J. A. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S62-5, Nov 2010. ISSN 0924-8579.

- QIAN, Z. et al. A phase I trial to evaluate the multiple-dose safety and antitumor activity of ursolic acid liposomes in subjects with advanced solid tumors. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 809714, 2015.
- QUEIROZ, D. P. et al. In vivo antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from *Selaginella sellowii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Feb 19 2016. ISSN 0074-0276.
- RAGELLE, H. et al. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. **Int J Pharm**, v. 427, n. 2, p. 452-9, May 10 2012. ISSN 0378-5173.
- RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Int J Dermatol**, v. 34, n. 2, p. 85-91, Feb 1995. ISSN 0011-9059
- RASHID, S. et al. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **Eur J Med Chem**, v. 66, p. 238-45, Aug 2013. ISSN 0223-5234.
- RASSI, A., JR. Prognostic utility of coronary computed tomography angiography: are we looking at the correct outcomes and making appropriate comparisons? In: (Ed.). **JACC Cardiovasc Imaging**. United States, v.2, 2009. p.914; author reply 915. ISBN 1876-7591 (Electronic) 1876-7591 (Linking).
- RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 0891-5520.
- RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 0140-6736.
- REINA-SAN-MARTIN, B.; COSSON, A.; MINOPRIO, P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. **Parasitol Today**, v. 16, n. 2, p. 62-7, Feb 2000. ISSN 0169-4758
- REQUENA-MENDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003540, Feb 2015. ISSN 1935-2727.
- RIBEIRO, T. T. et al. Serologic validation of HIV infection in a tropical area. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 6, n. 3, p. 319-22, Mar 1993. ISSN 0894-9255
- RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 4, p. 447-55, Aug 2010. ISSN 1367-5931.

- ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 514-35, Jun 2005. ISSN 0944-7113
- RODRIGUES, J. et al. Antimicrobial activity of Miconia species (Melastomataceae). **J Med Food**, v. 11, n. 1, p. 120-6, Mar 2008. ISSN 1096-620X
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 4-5, p. 576-88, Mar 18 2010. ISSN 0169-409x.
- ROSATELLI, J. B. et al. Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 10, n. 3, p. 229-32, May 1998. ISSN 0926-9959
- ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-2, Nov 14 1903. ISSN 0007-1447
- SAEIDNIA, S. et al. Bioactive constituents from *Dracocephalum subcapitatum* (O. Kuntze) Lipsky. **Z Naturforsch C**, v. 60, n. 1-2, p. 22-4, Jan-Feb 2005. ISSN 0939-5075
- SALVADOR, J. A. et al. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Nat Prod Rep**, v. 29, n. 12, p. 1463-79, Dec 2012. ISSN 0265-0568.
- SAMUELS, A. M. et al. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2358, 2013. ISSN 1935-2727.
- SANCHEZ, A. M. et al. A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v. 98, n. 2, p. 118-24, May 2006. ISSN 0001-706X
- SANCHEZ, G. et al. Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. **Biol Res**, v. 35, n. 1, p. 39-45, 2002. ISSN 0716-9760
- SANDJO, L. P. et al. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 7, p. 1772-5, Apr 1 2016. ISSN 0960-894x.
- SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitol Res**, v. 103, n. 1, p. 1-10, Jun 2008. ISSN 0932-0113

- SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sci**, v. 78, n. 7, p. 713-8, Jan 11 2006. ISSN 0024-3205
- SCALON CUNHA, L. C. et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Z Naturforsch C**, v. 62, n. 9-10, p. 668-72, Sep-Oct 2007. ISSN 0939-5075
- SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 14, p. 2128-75, 2012. ISSN 0929-8673.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010. ISSN 0001-706x.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 583-8, Dec 2006. ISSN 1471-4922
- SEKIGUCHI, K.; OBI, N.; UEDA, Y. STUDIES ON ABSORPTION OF EUTECTIC MIXTURE. II. ABSORPTION OF FUSED CONGLOMERATES OF CHLORAMPHENICOL AND UREA IN RABBITS. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 12, p. 134-44, Feb 1964. ISSN 0009-2363
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056-69, Sep 15 2011. ISSN 0944-7113.
- SERENO, D. et al. In vitro antileishmanial activity of nicotinamide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 808-12, Feb 2005. ISSN 0066-4804
- SHANMUGAM, M. K. et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 11, p. 1579-87, Jun 1 2013. ISSN 0006-2952.
- SHARLOW, E. R. et al. Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 11, p. e540, 2009. ISSN 1935-2727.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012. ISSN 1058-4838.
- SILVERMAN, R.B.; HOLLADAY, M.W. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3rd ed. Elsevier Science & Technology., 2014.

- SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 4, p. 168-74, Apr 2006. ISSN 1471-4922
- SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 1, p. 18-45, Jan 1 2014. ISSN 0968-0896.
- SOMOVA, L. O. et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 115-21, Mar 2003. ISSN 0944-7113
- SPESSOTO, M. A. et al. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 606-9, 2003. ISSN 0944-7113
- STEELE, J. C. et al. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytother Res**, v. 13, n. 2, p. 115-9, Mar 1999. ISSN 0951-418X
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 1, p. 53-63, Jan 2013. ISSN 1465-6566.
- SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 345-52, Mar 2006. ISSN 0971-5916
- SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v. 347, n. 22, p. 1739-46, Nov 28 2002. ISSN 0028-4793.
- SUNDAR, S. et al. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 5, p. 608-13, Mar 1 2006. ISSN 1058-4838.
- SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 7, p. 507-19, Jul 2011. ISSN 1474-1776.
- SZOOR, B. et al. Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids. **Curr Opin Microbiol**, v. 22, p. 79-87, Dec 2014. ISSN 1369-5274.
- SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Pharmacol Rep**, v. 57, n. 5, p. 588-95, Sep-Oct 2005. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140.
- SZUSTER-CIESIELSKA, A. et al. Betulin and betulinic acid attenuate ethanol-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS),

cytokine (TNF-alpha, TGF-beta) production and by influencing intracellular signaling.

Toxicology, v. 280, n. 3, p. 152-63, Feb 27 2011. ISSN 0300-483x.

TAKETA, A. T. et al. Triterpenoids from Brazilian Ilex species and their in vitro antitrypanosomal activity. **J Nat Prod**, v. 67, n. 10, p. 1697-700, Oct 2004. ISSN 0163-3864

TAN, N. et al. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 881-4, Dec 2002. ISSN 0031-9422

TARLETON, R. L. et al. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med**, v. 4, n. 12, p. e332, Dec 2007. ISSN 1549-1277.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug 2006. ISSN 0074-0276

TELES, C. B. et al. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania* (L.) *amazonensis* in vitro. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 165, 2015. ISSN 1472-6882.

TERRAZAS, C. A.; TERRAZAS, L. I.; GOMEZ-GARCIA, L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 357106, 2010. ISSN 1110-7243.

THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World J Hepatol**, v. 3, n. 9, p. 228-49, Sep 27 2011.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. e525-32, Aug 2011. ISSN 1201-9712.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 114-20, Feb 2004. ISSN 0944-7113

TSUTSUMI, A. et al. The quality of life, mental health, and perceived stigma of leprosy patients in Bangladesh. **Soc Sci Med**, v. 64, n. 12, p. 2443-53, Jun 2007. ISSN 0277-9536

TUON, F. F.; NETO, V. A.; AMATO, V. S. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 158-66, Nov 2008. ISSN 0928-8244

- URBANIAK, M. D.; GUTHER, M. L.; FERGUSON, M. A. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36619, 2012. ISSN 1932-6203.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, Jul-Aug 2010. ISSN 0001-706x.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 495-501, Nov 2003. ISSN 1471-4922
- VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 3, p. 184-94, Mar 2010. ISSN 1473-3099.
- VASCONCELOS, M. A. et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z Naturforsch C**, v. 61, n. 7-8, p. 477-82, Jul-Aug 2006. ISSN 0939-5075
- VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 23-24, p. 1068-75, Dec 2007. ISSN 1359-6446
- VASIEVICH, M. P.; VILLARREAL, J. D.; TOMECKI, K. J. Got the Travel Bug? A Review of Common Infections, Infestations, Bites, and Stings Among Returning Travelers. **Am J Clin Dermatol**, Jun 25 2016. ISSN 1175-0561.
- VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitol Int**, v. 59, n. 2, p. 154-8, Jun 2010. ISSN 1383-5769.
- VERHEYEN, S. et al. Mechanism of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersions. **Int J Pharm**, v. 249, n. 1-2, p. 45-58, Dec 5 2002. ISSN 0378-5173
- VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3010-5, Aug 2004. ISSN 0066-4804
- VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int J Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 1317-31, Dec 1994. ISSN 0020-7519
- VIEIRA-GONCALVES, R. et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 9, p. 926-32, Sep 2008. ISSN 0011-9059.

- VO, C. L.; PARK, C.; LEE, B. J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 85, n. 3 Pt B, p. 799-813, Nov 2013. ISSN 0939-6411.
- VOTYPKA, J. et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol**, v. 31, n. 10, p. 460-9, Oct 2015. ISSN 1471-4922.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, Mar 2009. ISSN 0944-7113.
- WANG, Q. et al. Extract and identify ingredient from Ligustrum Lucidum Ait and study its effect to periodontal pathogen. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 37, n. 5, p. 388-90, Sep 2002. ISSN 1002-0098
- WANG, X. et al. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1323-30, Jun 2013. ISSN 0143-3334.
- WEISS, M. G.; RAMAKRISHNA, J.; SOMMA, D. Health-related stigma: rethinking concepts and interventions. **Psychol Health Med**, v. 11, n. 3, p. 277-87, Aug 2006. ISSN 1354-8506
- WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J Ethnopharmacol**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, Dec 2001. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.
- WESTENBERGER, S. J. et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 5, p. 537-47, Nov 2004. ISSN 0031-1820
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases (2007), Geneva,. **WHO Technical Report Series**. 22–26.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. **Technical Report Series nº.905**, Geneva. 2002; 96pp.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Technical Report of the TDR Disease Reference Group on report of a meeting of the WHO expert committee on

Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis (2013), Geneva,. **WHO Technical Report Series**.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: A roadmap for implementation. (2012), Geneva,. **WHO Technical Report Series**. Full report available at www.who.int/neglected_diseases/en

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record* (2014), Geneva,. **WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases**. 11p. No. 22, 2016, 91, 285–296

WIEMANN, J.; HELLER, L.; CSUK, R. Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 3, p. 907-9, Feb 1 2016. ISSN 0960-894x.

WU, P. K. et al. Oleanolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa* exhibits a unique growth inhibitory effect against ras-transformed fibroblasts. **Life Sci**, v. 85, n. 3-4, p. 113-21, Jul 17 2009. ISSN 0024-3205.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 39925-32, Sep 17 2004. ISSN 0021-9258

XU, G. L. et al. Comparative pharmacokinetics of swertiamarin in rats after oral administration of swertiamarin alone, Qing Ye Dan tablets and co-administration of swertiamarin and oleanolic acid. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 1, p. 49-54, Aug 26 2013. ISSN 0378-8741.

YAMAMOTO, E. S. et al. The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144946, 2015. ISSN 1932-6203.

YAMAMOTO, E. S. et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasitol Res**, v. 113, n. 1, p. 333-9, Jan 2014. ISSN 0932-0113.

YAN, S. L. et al. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 3, p. 842-8, Apr 2010. ISSN 0887-2333.

- YANG, C. et al. Determination and pharmacokinetic study of chiisanogenin in rat plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Phytochem Anal**, v. 22, n. 3, p. 225-9, May-Jun 2011. ISSN 0958-0344.
- YANG, L. et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 319-325, 5/1/ 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611015366> >.
- ZHANG, H. et al. Efficient delivery of ursolic acid by poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles for inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. In: (Ed.). **Int J Nanomedicine**. New Zealand, v.10, 2015. p.1909-20. ISBN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).
- ZHAO, L. et al. Simultaneous Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Rat Plasma by HPLC-MS: Application to a Pharmacokinetic Study After Oral Administration of Different Combinations of QingGanSanJie Decoction Extracts. **J Chromatogr Sci**, v. 53, n. 7, p. 1185-92, Aug 2015. ISSN 0021-9665.
- ZHU, Z. et al. A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 129-36, 2013. ISSN 1176-9114.
- ZINK, A. R. et al. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 10, p. 1616-7, Oct 2006. ISSN 1080-6040
- ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. New chemotherapeutic strategies against malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 4, p. 502-26, 2013. ISSN 0929-8673.
- ZUCOL, F. et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2750-9, Aug 2006. ISSN 0095-1137

ANEXO A – Geis de eletroforese (Integridade do material genético das amostras)

ANEXO B - Gráficos de amplificação de DNA de *T.cruzi* e GAPDH após diluição seriada para confecção da curva padrão. *Threshold* = 0,257 e *Baseline* com ajuste automático.