Érika Gracielle Pinto

Isolamento, caracterização e atividade anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos bioativos de venenos de anfíbios brasileiros

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

São Paulo
2012

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Érika Gracielle

Isolamento, caracterização e atividade anti-*leishmania* e anti-*trypanosoma cruzi* de compostos bioativos de venenos de anfíbios brasileiros / Érika Gracielle Pinto. – São Paulo, 2012.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

Descritores: 1. ANFÍBIOS. 2. VENENOS. 3. PEPTÍDEOS. 4. LEISHMANIOSE VISCERAL. 5. DOENÇA DE CHAGAS. 6. FÁRMACOS

USP/IMTSP/BIB-01/2012.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: Érika Gracielle Pinto

Título da Dissertação: “Isolamento, caracterização e atividade anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos bioativos de venenos de anfíbios brasileiros”

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Examinador(a)

Assinatura

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

À meus pais: Rui e Sônia.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer á **Deus**, sem Ele, nada disso estaria se concretizando.

Aos meus pais, **Rui** e **Sônia** e meu irmão **Luiz Afonso** por todo apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo que sempre demonstraram. E, principalmente pela paciência e pelo amor incondicional. Obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. **André Gustavo Tempone** pela orientação e confiança depositada, estímulos e incentivos, paciência e ensinamentos passados dia após dia.

Ao **Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** e a **Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao **Instituto Adolfo Lutz** pela disponibilização da infra-estrutura.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão da bolsa de mestrado.

À banca de qualificação: Prof. Dr. **João Lago** e Prof. Dr. **Angelo Lindoso**.

Ao Prof. Dr. **Carlos Jared** e a Prof. Dra. **Marta M. Antoniazzi** do Instituto Butantan, pela colaboração na coleta dos venenos e por sempre deixarem as “portas abertas” do laboratório.

Ao Prof. Dr. **Daniel Pimenta** do Instituto Butantan, pelas análises e caracterização dos peptídeos.

Ao Prof. Dr. **João Lago** e Profa. Dra. **Patrícia Sartorelli** da Unifesp pela colaboração e análise dos espectros de RMN.

A Prof. Dra **Noemi Taniwaki** do Instituto Adolfo Lutz pela análise de microscopia eletrônica.

A técnica **Cleuza** da Universidade de São Paulo, pela inclusão, cortes do material e ajuda na microscopia eletrônica.

Aos técnicos **Matília** e **Vicente** do Instituto Adolfo Lutz, pela assistência prestada todos os dias no laboratório.

As amigas **Beatriz Maurício** e **Adriana Barsotti** do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan pela prestatividade e ajuda na coleta dos venenos bem como pelas conversas e bares sempre muito necessários. Obrigada pelas risadas, pela confiança e pelas palavras amigas.

As amigas de laboratório **Juliana Reimão**, **Juliana Tonini**, **Daniela Saraiva**, **Walkyria Camargo**, **Lígia Ferreira** e **Daiane Dias Ferreira** pela ajuda diária nos experimentos e principalmente pelas conversas nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre me ouvirem.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular **Thaís Alves**, **Cristina Meira**, **Gabriela Motoie**, **Inara Bastos**, **Tatiane Rodrigues**, **Fábio Colombo**, **Ricardo Dalla Zana**, **Alexandre Oliveira**, **Dan Jessé**, **Ricardo Gava**, pelos almoços, pelos cafés e principalmente pelos momentos de descontração.

A tantos outros amigos que estiveram torcendo.

E a todos aqueles que passaram de alguma forma e por algum período ao meu lado, torcendo.

Obrigada!

"Não é que vivo em eterna mutação, com novas adaptações a meu renovado viver e nunca chego ao fim de cada um dos modos de existir. Vivo de esboços não acabados e vacilantes. Mas equilibro-me como posso, entre mim e eu, entre mim e os homens, entre mim e o Deus."

Clarice Lispector

RESUMO

Pinto EG. Isolamento, caracterização e atividade anti-*leishmania chagasi* e anti-*trypanosoma cruzi* de compostos bioativos de venenos de anfíbios brasileiros (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Dentre as doenças parasitárias tropicais, as causadas por protozoários se apresentam como um grande desafio para a saúde pública, sendo representadas pela leishmaniose e doença de Chagas. Afetam grandes populações marginais ao processo econômico globalizado, e desta forma, não são vistas como mercados potenciais. O presente projeto visou o isolamento de novos compostos naturais de venenos animais com atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi*. O presente estudo fracionou por diferentes técnicas cromatográficas, os venenos dos anfíbios *Siphonops annulatus*, *Corythomantis greeningi*, *Aparasphenodon brunoi* e *Phyllomedusa hypochondrialis*, visando o isolamento de peptídeos e metabólitos secundários através de ensaios biomonitorados. Utilizando-se a espectrometria de massas e seqüenciamento por degradação química de Edman, foi possível a caracterização bioquímica de cinco peptídeos ativos da secreção de *Phyllomedusa hypochondrialis*, sendo estes a bradiginina, as dermaseptinas 1 e 4 e as filoseptinas 7 e 8. Os peptídeos apresentaram uma Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) variando entre 0,7 a 20 µg/mL em *L. (L.) infantum chagasi* e *T. cruzi*, com baixa ou nenhuma citotoxicidade para células de mamíferos nas concentrações testadas. Além disso, a separação química da secreção do anfíbio *Siphonops annulatus* forneceu uma fração altamente ativa em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, com CE₅₀ 0,065 µg/mL, porém com toxicidade bastante elevada para macrófagos peritoneais e nenhuma seletividade nas formas intracelulares. Estudos ultraestruturais de *Leishmania* demonstraram severos danos mitocondriais, além da formação de grande vacúolos citoplasmáticos, levando o parasita a morte em poucas horas. O presente estudo demonstrou o potencial de peptídeos e metabólitos secundários de venenos de anfíbios, que se adequadamente estudados, poderão contribuir como novos protótipos de fármacos para a doenças negligenciadas.

Descritores: Anfíbios. Venenos. Leishmaniose visceral. Doença de Chagas. Peptídeos. Fármacos.

ABSTRACT

Pinto EG. Isolation, characterization, antileishmanial and antitrypanosomal activity of bioactive compounds from brazilian amphibian poisons (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Among the tropical parasitic diseases, those caused by protozoa present a major challenge to public health, being represented by leishmaniasis and Chagas disease. Affect large populations marginal to the global economic process, and thus are not seen as potential markets. This project aimed the isolation of new natural compounds in animal venoms with anti-*Leishmania* activity and anti-*T. cruzi*. The present study fractionated by different chromatographic techniques, the poisons of the amphibians *Siphonops annulatus*, *Corythomantis greeningi*, *Aparasphenodon brunoi* and *Phyllomedusa hypochondrialis*, aiming the isolation of peptides and secondary metabolites through bioguided assays. By using mass spectrometry and sequencing by Edman degradation, it was possible to do the biochemical characterization of five active peptides from the poison of *Phyllomedusa hypochondrialis*, as bradykinin, dermaseptins 1 and 4 and phylloseptins 7 and 8. The peptides showed a 50% Effective Concentration (EC₅₀) ranging from 0.7 to 20 µg/mL in *L. (L.) infantum chagasi* and *T. cruzi*, with little or no cytotoxicity to mammalian cells at the tested concentrations. In addition, the chemical separation of the poison of the amphibian *Siphonops annulatus* provided a highly active fraction against promastigotes of *L. (L.) infantum chagasi*, with an EC₅₀ of 0.065 µg/mL, but highly toxicity to peritoneal macrophages and without selectivity against the intracellular forms of *Leishmania*. Ultrastructural studies of *Leishmania* showed severe mitochondrial damages and the formation of large cytoplasmic vacuoles, leading to parasite death within few hours. The present study demonstrated the potential of peptides and secondary metabolites of amphibian poisons, and if adequately studied, may contribute as prototypes of new drugs for neglected diseases.

Descriptors: Amphibians. Poison. Visceral leishmaniasis. Chagas disease. Peptides. Drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus Celsius

3D: três dimensões

A. brunoi: *Aparasphenodon brunoi*

AbFrHex: Fração em hexano de *A. brunoi*

AbFrAcEt: Fração em acetato de etila de *A. brunoi*

AbFrBut: Fração em butanol de *A. brunoi*

AbFrAq: Fração aquosa de *A. brunoi*

ACN: Aceto nitrila

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia líquida de alta resolução

CO₂: Gás carbônico

CE₅₀: Concentração efetiva 50%

CC₅₀: Concentração citotóxica 50%

C. greeningi: *Corythomantis greeningi*

CgFrHex: Fração em hexano de *Corythomantis greeningi*

CgFrAcEt: Fração em acetato de etila de *Corythomantis greeningi*

CgFrBut: Fração em butanol de *Corythomantis greeningi*

CgFrAq: Fração aquosa de *Corythomantis greeningi*

DCA: Doença de Chagas aguda

EFS: Extração de fase sólida

FrHex: Fração em hexano

FrAcEt: Fração em acetato de etila

FrBut: Fração em butanol

FrAq: Fração aquosa

FrPept: Fração peptídica

FDA: Food and drug administration

LC-MS: Cromatografia líquida – espectrômetria de massas

L. (L.)infantum chagasi: Leishmania (Leishmania) infantum chagasi

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutâneo difusa

L. longipalpis: Lutzomyia longipalpis

LCM: Leishmaniose mucocutânea

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

MeOH: Metanol

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium bromideo

OMS: Organização mundial da saúde

P. hypochondrilais: Phyllomedusa hypochondrialis

QSAR: Quantitative structure-activity relationship

RMN: Ressonância magnética nuclear

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TFA: Ácido trifluoroacético

S. annulatus: Siphonops annulatus

SaFrHex: Fração em hexano de *Siphonops annulatus*

SaFrAcEt: Fração em acetato de etila de *Siphonops annulatus*

SaFrBut: Fração em butanol de *Siphonops annulatus*

SaFrAq: Fração aquosa do *Siphonops annulatus*

T. brasiliensis: Triatoma brasiliensis

T. infestans: Triatoma infestans

T. pseudomaculata: Triatoma pseudomaculata

T. sordida: *Triatoma sordida*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

V/V: volume por volume

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fármacos desenvolvidos nos últimos 25 anos para doenças infecciosas.....	43
Tabela 2- Fármacos antiparasitários de origem natural ou derivado, desenvolvidas nos últimos 25 anos.....	43
Tabela 3- Alguns componentes químicos isolados da secreção de anfíbios.....	47
Tabela 4- Massa das frações e atividade anti- <i>Leishmania</i> das frações de <i>S. annulatus</i>	63
Tabela 5- Peptídeos e suas respectivas sequências de aminoácidos.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fêmea de Flebotomíneo.....	22
Figura 2- Forma promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 3- Leishmaniose cutânea (A), Leishmaniose mucocutânea (B), Leishmaniose visceral (C) e Leishmaniose cutâneo-difusa (D).....	24
Figura 4- Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i>	26
Figura 5- Casos e incidência da leishmaniose visceral no Brasil no período de 1999 a 2008.....	27
Figura 6- Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil no período de 1994 a 2008.....	27
Figura 7- Estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina.....	28
Figura 8- Estrutura química do estibogluconato de sódio.....	28
Figura 9- Estrutura química da anfotericina B.....	29
Figura 10- Estrutura química da miltefosina.....	29
Figura 11- Morfologia externa do Triatomíneo.....	32
Figura 12- Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Trypanosoma</i>	33
Figura 13- Ciclo de transmissão do <i>T. cruzi</i>	36
Figura 14- Estrutura química do nifurtimox (A) e benznidazol (B).....	39
Figura 15- Produtos naturais como fonte de novos fármacos no período de 1981 a 2006.....	42
Figura 16- <i>Siphonops annulatus</i> (A), <i>Corythomantis greeningi</i> (B), <i>Aparasphenodon brunoi</i> (C) e <i>Phyllomedusa hipochondrialis</i>	52 e 53
Figura 17- Esquema de partição líquido-líquido de <i>S. annulatus</i> , <i>C. greeningi</i> e <i>A. brunoi</i>	54
Figura 18- CE ₅₀ das frações hexano e acetato de etila de <i>S. annulatus</i>	64
Figura 19- Perfil cromatográfico da fração SaFrHex obtido por CLAE.....	65

Figura 20- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrHex obtido por CLAE.....	66
Figura 21- Perfil cromatográfico da SaFrAcEt obtido por CLAE.....	67
Figura 22- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrAcEt obtido por CLAE.....	67
Figura 23- Representação esquemática por CLAE da SaFrHexAcEt.....	68
Figura 24- Perfil cromatográfico da SaFrBut obtido por CLAE.....	69
Figura 25- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrBut obtido por CLAE.....	69
Figura 26- Representação esquemática por CLAE da SaFrBut.....	70
Figura 27- Perfil cromatográfico da fração SaFrBut4 obtido por CLAE.....	70
Figura 28- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrBut4 obtido por CLAE.....	71
Figura 29- Perfil cromatográfico da SaFrHexAcEt5 obtido por CLAE.....	72
Figura 30- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrHexAcEt5 obtido por CLAE.....	72
Figura 31- CE ₅₀ da fração SaFrHexAcEt5 sobre formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	73
Figura 32- CC ₅₀ da fração SaFrHexAcEt5 sobre macrófagos peritoniais.....	74
Figura 33- CE ₅₀ da fração SaFrHexAcEt5 sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	75
Figura 34- Microscopia eletrônica de transmissão em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> incubado com a fração SaFrHexAcEt5.....	77
Figura 35- Curva da permeabilidade celular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> incubado com a fração SaFrHexAcEt5.....	78
Figura 36- Perfil cromatográfico da CgFrHex obtido por CLAE.....	80
Figura 37- Perfil cromatográfico em 3D da CgFrHex obtido por CLAE.....	80
Figura 38- Perfil cromatográfico da CgFrAcEt obtido por CLAE.....	81
Figura 39- Perfil cromatográfico em 3D da CgFrAcEt obtido por CLAE.....	81
Figura 40- Representação esquemática por CLAE da CgFrHex.....	82
Figura 41- Representação esquemática por CLAE da CgFrAcEt.....	82
Figura 42- Perfil cromatográfico da FrPept obtido por CLAE.....	85

Figura 43- CE ₅₀ da Bradicinina e Filoseptina 7 sobre formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	87
Figura 44- CE ₅₀ das Filoseptina 7 e 8 e das Dermaseptina 1 e 4 sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	88
Figura 45- Curva dose-resposta da citotoxicidade sobre macrófagos peritoniais da filoseptina 7.....	89
Figura 46- Representação gráfica da toxicidade da dermaseptina 1 e 4 e da filoseptina 8.....	89

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
 1 INTRODUÇÃO	 20
1.1 Leishmanioses	20
1.1.2 Histórico	20
1.1.3 Distribuição geográfica	21
1.1.4 Vetores	21
1.1.5 Agente etiológico	22
1.1.6 Manifestações clínicas	23
1.1.7 Ciclo biológico	24
1.1.8 Situação da LV no Brasil	26
1.1.9 Tratamento	27
1.2 Doença de Chagas	31
1.2.1 Histórico	31
1.2.2 Distribuição geográfica	31
1.2.3 Vetores	32
1.2.4 Agente etiológico	33
1.2.5 Manifestações clínicas	33
1.2.6 Ciclo biológico	35
1.2.7 Situação no Brasil	36
1.2.8 Tratamento	37
1.3 A importância dos produtos naturais como novos protótipos farmacêuticos	40
1.4 Venenos dos anfíbios	45
 2 OBJETIVOS	 49
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 51
3.1 Coleta da secreção dos anfíbios	51
3.2 Obtenção dos extratos orgânicos (metabólitos secundários)	54
3.2.1 Obtenção de metabólitos secundários dos anfíbios através da partição líquido-líquido	54
3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de <i>S. annulatus</i> (Protocolo 1)	55
3.2.2.1 Elucidação estrutural	55
3.2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	55
3.2.3 Fracionamento do veneno de <i>S. annulatus</i> (Protocolo 2)	56
3.2.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS) em coluna Sep-Pak C ₁₈	56
3.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de <i>S. annulatus</i>	56
3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência de <i>Corythomantis greeningi</i>	57
3.3 Isolamento de peptídeos de <i>P. hypochondrialis</i>	57
3.3.1 Espectrometria de massas	58
3.3.2 Sequenciamento dos peptídeos	58
3.4 Cultura celular e animais de experimentação	58
3.4.1 Parasitas	58
3.4.2 Animais	59
3.4.3 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos compostos	59

3.4.3.1 Viabilidade dos parasitas em estudos biomonitorados	60
3.4.4 Determinação da CE ₅₀ em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	60
3.4.5 Determinação da citotoxicidade e da CC ₅₀ em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	61
3.4.6 Análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	61
3.4.7 Avaliação de um mecanismo de ação “Sytox Green” em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	62
3.4.8 Análises estatísticas	62
4 RESULTADOS	63
4.1 Estudo da secreção de <i>Siphonops annulatus</i>	63
4.1.1 Estudos biomonitorados e partição líquido-líquido	63
4.1.2 Determinação da Concentração Efetiva 50% das frações em hexano e em acetato de etila em <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	64
4.1.3 Estudos biomonitorados e fracionamento por CLAE	65
4.1.4 Isolamento de um possível composto ativo da secreção de <i>S. annulatus</i>	71
4.1.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da SaFrHexAcEt5	72
4.1.6 Determinação da CE ₅₀ em promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> da fração SaFrHexAcEt5	73
4.1.7 Determinação da CC ₅₀ da fração SaFrHexAcEt5	74
4.1.8 Determinação da CE ₅₀ da fração SaFrHexAcEt5 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
4.1.9 Análise de microscopia eletrônica de transmissão da fração SaFrHexAcEt5 em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	75
4.1.10 Avaliação da permeabilidade da membrana celular com “Sytox Green” da fração SaFrHexAcEt5 em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	78
4.2 Estudo da secreção de <i>Corythomantis greeningi</i>	79
4.2.1 Obtenção de extratos e fracionamento por CLAE	79
4.3 Estudo da secreção de <i>Aparasphenodon brunoi</i>	83
4.3.1 Obtenção de extratos e biomonitoramento.....	83
4.4 Estudo da secreção de <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	84
4.4.1 Isolamento dos peptídeos	84
4.4.3 Espectrometria de massas	85
4.4.4 Sequenciamento dos peptídeos	85
4.4.4 Determinação da CE ₅₀ dos peptídeos em <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	86
4.4.5 Determinação da CE ₅₀ dos peptídeos em <i>T. cruzi</i>	87
4.4.6 Determinação da CC ₅₀ dos peptídeos	88
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causam um grande sofrimento a milhões de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, incluindo um forte impacto na economia e problemas à Saúde Pública (Trouiller *et al.*, 2002). Dentre as principais doenças tropicais, as causadas por protozoários apresentam alta morbidade e/ou mortalidade, sendo representadas pela leishmaniose, doença de Chagas e malária (Remme *et al.*, 1993). Segundo a OMS, tanto a leishmaniose quanto a doença de Chagas são denominadas doenças negligenciadas, uma vez que não há interesse do setor farmacêutico privado em desenvolver novas terapias. Verifica-se que a indústria farmacêutica teve uma participação crucial na luta contra doenças tropicais endêmicas, porém, dentre os 1393 novos medicamentos desenvolvidos no período compreendido entre 1975 e 1999, menos de 1% foi destinado às doenças tropicais (Trouiller *et al.*, 2002).

1.1 Leishmanioses

1.1.2 Histórico

A leishmaniose visceral (LV) foi descrita no século XVIII na Grécia e Índia. Em 1903, Laveran e Mesnil descreveram o parasita através de material fornecido por Leishman e Donovan. Nicolle em 1908 sugere o cão como reservatório e em 1915 na Índia, Mackie aponta o flebótomo como vetor (Alencar, 1982). No Brasil, o primeiro registro de LV data de 1913, um caso proveniente, provavelmente, do Mato Grosso e diagnosticado por Migone no Paraguai (Ministério da Saúde, 1999). Em 1913, Gaspar Viana descobre o uso do tártaro emético para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Em 1923, o médico pernambucano Armando Tavares, em relato à Sociedade de Medicina de Pernambuco, comunicou o primeiro caso de LV em Pernambuco (Pereira, 1985). Evandro Chagas, em 1936

aponta o *Lutzomyia longipalpis* como vetor (Alencar, 1982) e documenta o primeiro caso em humano à época do diagnóstico (Machado, 1987). Castro e Ferreira reconhecem o cão como reservatório em 1937. A partir da década de 50, com os trabalhos de Deane no Ceará, a doença passa a ser reconhecida em todo território nacional (Machado, 1987).

1.1.3 Distribuição geográfica

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta principalmente países tropicais e subtropicais onde é considerada uma doença endêmica. Ela ocorre atualmente em 98 países ou territórios, sendo que destes, 16 são países desenvolvidos e 72 em desenvolvimento (Balaña-Fource *et al.*, 1998; WHO, 2010). A LV é endêmica em 65 países, sendo que mais de 90% dos casos concentram-se em cinco países: Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (Alvar *et al.*, 2004; Desjeux, 2004; WHO, 2010; Michel *et al.*, 2011). Com relação à LTA, 90% dos casos incide em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 1996).

Atualmente, estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com relatos de dois milhões de novos casos por ano, fazendo da leishmaniose uma das seis endemias mais importantes para a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Guerin *et al.*, 2002).

1.1.4 Vetores

Os vetores da leishmaniose são insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*. Cerca de 30 espécies estão envolvidas na transmissão da LV no mundo (Desjeux, 1996). Nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão da LV é o *Lutzomyia*

longipalpis (Figura 1). Os insetos desta família são pequenos e têm como características a coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semi-abertas. Por essas características, são também conhecidos como mosquito-palha, asa-dura, podendo ser chamados em algumas regiões do estado de SP de birigui, cangalhinha, entre outros (Sucen, 2010).

Figura 1- Fêmea de Flebotomíneo. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

1.1.5 Agente Etiológico

O agente etiológico da LV é um protozoário da família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida que apresenta basicamente duas formas: uma promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Figura 2). No Brasil, as principais espécies envolvidas na infecção tegumentar (LTA) são: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) guianensis*. *Leishmania (L.) infantum chagasi*, ocorre nas Américas, sendo responsável pela infecção visceral (LVA) em seres humanos e cães (Lainson e Shaw, 1987; Cupolillo *et al.*, 1994; Mauricio, 2001; Sucen, 2010).

Figura 2- Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* spp. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

1.1.6 Manifestações clínicas

As leishmanioses são definidas como um conjunto de doenças classificadas em quatro grupos (Rey, 2001):

- a) Leishmaniose cutânea (LC)- Formas que produzem lesões cutâneas, ulcerosas ou não;
- b) Leishmaniose cutâneo mucosa (LCM)- Formas com lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe;
- c) Leishmaniose visceral (LV) - Formas viscerais, em que os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides;
- d) Leishmaniose cutâneo difusa (LCD)- Formas cutâneas que acomete indivíduos anérgicos ou pacientes que já foram tratados de LV (pós-calazar na Índia).

As manifestações clínicas das leishmanioses são mostradas na figura 3.

Figura 3- Leishmaniose cutânea- lesão ulcerada única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso (A); Leishmaniose mucocutânea- lesões ulceradas em palato mole e lábio superior com áreas de infiltração local (hiperemia nas bordas) (B); Leishmaniose visceral- período final (C); Leishmaniose cutâneo-difusa- polimorfismo lesional (lesões em placa infiltrada, tubérculos em face, orelha e membro superior (D). Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

1.1.7 Ciclo Biológico

O ciclo biológico dos parasitas do gênero *Leishmania* se realiza em um hospedeiro invertebrado, que por possuir capacidade vetorial, é o responsável pela transmissão aos hospedeiros vertebrados, nos quais a forma parasitária é intracelular obrigatória (Sacks e Kamhawi, 2001).

O ciclo da *Leishmania* se inicia quando uma fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero parasitado e ingere junto com o sangue células do sistema mononuclear fagocitário contendo formas amastigotas, que permanecem com o sangue ingerido, no intestino do inseto vetor, contido pela membrana peritrófica. Após um período de 12 a 18 horas, se transformam em formas pequenas, ovóides, e de pouco movimento, chamadas promastigotas procíclicas. Os promastigotas procíclicas se multiplicam intensamente, e após cerca de 30 a 60 horas, ocorre a transformação em formas alongadas, finas, com relativa motilidade, denominadas nectomonas. Estas formas aderem-se, via flagelo, às

microvilosidades do epitélio celular do intestino médio do flebotomíneo. Cerca de sete dias após, quando se completa a digestão do sangue ingerido, estas formas migram para a região torácica do intestino do inseto, onde algumas se transformam em promastigotas, chamadas haptomonas, que rapidamente se transformam em formas finas, curtas, altamente ativas, e com flagelo medindo no mínimo o dobro do comprimento do corpo, as promastigotas metacíclicas. Estas são infectantes para o hospedeiro vertebrado e migram para o esôfago, faringe e probóscida (Cardoso e Cabral, 1999; Sacks e Kamhawi, 2001). Ao realizar novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes de *Leishmania* são inoculadas diretamente da probóscida por regurgitação, junto com a saliva do inseto (Cardoso e Cabral, 1999). Após a internalização, as formas promastigotas metacíclicas, vulneráveis a acidez e a ação das enzimas líticas do fagolisossomo, se diferenciam em formas amastigotas (Cardoso e Cabral, 1999; Oliver *et al.*, 2005). Estas se multiplicam por divisão binária até a morte e o rompimento do macrófago infectado. As formas amastigotas liberadas, por processo semelhante ao descrito, são capazes de infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário (Cardoso e Cabral, 1999). O flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo neste indivíduo, ingere junto ao sangue macrófagos infectados, perpetuando o ciclo biológico do parasita (Figura 4).

Figura 4- Ciclo de vida do parasita *Leishmania*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2010.

1.1.8 Situação da LV no Brasil

O Brasil é responsável por quase a totalidade dos casos de LV nas Américas, sendo que no período compreendido entre os anos de 1999 a 2008, a média anual de casos de LV foi de 3.379 registros com uma incidência de 1,9 casos para cada 100.000 habitantes (Figura 5). A letalidade média nos últimos quatro anos foi de 6,3% (Figura 6) (Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Vários fatores são atribuídos a expansão da ocorrência da LV no Brasil, dentre elas as mudanças ambientais, como alterações climáticas e desmatamentos, reduziram a disponibilidade de alimento para o mosquito transmissor no ambiente rural,

fazendo com que o mesmo migrasse para o ambiente urbano (Secretaria do Estado da Saúde, 2010).

Figura 5- Casos e incidência da LV no Brasil no período de 1999 a 2008. Fonte: Ministério da Saúde, 2009.

Figura 6- Letalidade da LV no Brasil no período de 1994 a 2008. Fonte: Ministério da Saúde, 2009.

1.1.9 Tratamento

Em 1912, o médico brasileiro Gaspar Vianna descobriu a ação curativa do tártaro emético (antimonial trivalente - Sb^{3+}); onde obteve sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento (Lainson e Shaw, 1987). Devido aos efeitos colaterais e difícil administração, foi substituído por outros antimonias trivalentes como estibofeno e solustibosan (Pessoa, 1960; Deane, 1961; Ribeiro e Campos, 2010). Em 1921, foi sintetizado na Índia o primeiro antimonial pentavalente (Sb^{5+}), considerado um fármaco mais

eficaz e menos tóxico que os anteriores (Ribeiro e Campos, 2010). Em 1940, os Laboratórios Rhodia e Wellcome produziram em larga escala os antimoniais pentavalentes com os nomes de antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) (Figura 7) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), (Figura 8) respectivamente (Ribeiro e Campos, 2010).

Figura 7- Estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina. Fonte: Rath *et al.*, 2003.

Figura 8- Estrutura química do estibogluconato de sódio. Fonte: Rath *et al.*, 2003.

Em 1955, Gold e colaboradores isolaram a anfotericina B, um antibiótico com efeitos terapêuticos no tratamento da LT (Deane, 1961) (Figura 9). Em seguida, a anfotericina B foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em uma formulação lipossomal (Sucen, 2001).

Figura 9- Estrutura química da anfotericina B. Fonte: Rath *et al.*, 2003.

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou o uso do antitumoral miltefosina (Figura 10) no tratamento da LV em humanos na Índia, sendo um produto de administração oral, porém este medicamento apresenta efeitos teratogênicos e toxicidade moderada (Gontijo e Melo, 2004).

Figura 10- Estrutura química da miltefosina. Fonte: Rath *et al.*, 2003.

No Brasil, o Glucantime®, é distribuído pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes continua pouco compreendido, mas há relatos que esses compostos atuam sobre diversas vias do metabolismo do parasita (Roberts *et al.*, 1995).

A OMS preconiza como tratamento para a LV 20 mg de Sb^5/kg , por via intramuscular ou intravenosa por 28-30 dias, com dose diária máxima de 850 mg de antimônio (WHO, 2010). O antimônio acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue (Felicetti *et al.*, 1974). Após administração

endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de N-metilglucamina é rapidamente absorvido e praticamente 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 horas pelos rins (Limongi, 1973), porém em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente a óbito (Marsden, 1985).

O principal obstáculo na terapia para o tratamento da leishmaniose inclui o uso de fármacos muito tóxicos, com administração por longos períodos, levando assim, muitos pacientes a abandonarem o tratamento. A terapia com antimônios, considerado medicamentos de primeira escolha, é usada há mais de nove décadas e, apesar de serem considerados eficazes, seus efeitos adversos são bastante pronunciados, como: dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares e nas articulações, arritmias, pancreatite, entre outros (Gasser *et al.*, 1994; Tiuman *et al.*, 2011). A anfotericina B é um medicamento muito ativo e eficaz no tratamento das leishmanioses, mas considerado como terapia secundária devido a sua alta toxicidade e seus consideráveis efeitos adversos, como: tremor, febre, náusea, vômito, anorexia, dor de cabeça, mialgia e artralgia (Maddux e Barriere, 1980; Berman, 1988; Gallis *et al.*, 1990; Moreau *et al.*, 1992; Tiuman *et al.*, 2011).

As dificuldades quanto à administração dos medicamentos, seus severos efeitos adversos (Balaña-Fource *et al.*, 1998), bem como a longa duração do tratamento, têm estimulado pesquisadores a buscarem novos candidatos a fármacos (Tracy e Webster, 1996).

1.2 Doença de Chagas

1.2.1 Histórico

A tripanossomíase americana, posteriormente denominada doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor, o pesquisador brasileiro Carlos Chagas, é uma doença negligenciada que afeta 28 milhões de pessoas, sendo endêmica na América Latina (WHO, 1997; Ortiz *et al.*, 2011). Ela é uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores (Tempone *et al.*, 2007).

1.2.2 Distribuição geográfica

A distribuição da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição do vetor estar restrito a esse continente, daí ser também denominada de tripanossomíase americana. Entretanto, são registrados casos em países não endêmicos, por outros mecanismos de transmissão (OMS, 2007).

A área endêmica ou, mais precisamente, com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no país, conhecida no final dos anos 70, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios. Ações sistematizadas de controle químico focalizadas nas populações do inseto vetor foram instituídas no Brasil a partir de 1975, e mantidas em caráter regular desde então. Elas levaram a uma grande redução da transmissão do *Trypanosoma cruzi* ao homem. Associado a essas ações, mudanças ambientais, maior concentração da população em áreas urbanas e a melhor compreensão da dinâmica de transmissão contribuíram para o controle e a reorientação das estratégias no Brasil (Ministério da Saúde, 2009).

1.2.3 Vetores

O vetor da doença de Chagas é um inseto, geralmente do gênero *Triatoma* ou *Rhodnius*, conhecido popularmente como barbeiro (Figura 11). Antigamente esses insetos eram encontrados em ambientes silvestres, mas com a devastação das matas os insetos migraram para pequenos povoados, com condições de habitação desfavoráveis, como colonos, casas de madeira, entre outros. Na área urbana, mamíferos domésticos como o cão e o gato podem abrigar o parasita, atuando como reservatórios, e na área silvestre, estes podem ser tatus, gambás entre outros roedores (Ministério da Saúde, 2009). A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem com as excretas contaminadas dos triatomíneos, sendo a principal espécie o *Triatoma infestans*. Estes, ao picarem os vertebrados, em geral defecam após o repasto, eliminando formas infectantes tripomastigotas que penetram pelo orifício da picada pelo ato de coçar. Das 140 espécies de triatomíneos conhecidas atualmente, 69 foram identificadas no Brasil e são encontradas em vários estados florestais, de todos os biomas. Com a interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans* no país, quatro outras espécies de triatomíneos têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (Ministério da Saúde, 2009; Ortiz et al., 2011).

Figura 11- Morfologia externa do Triatomíneo. Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

1.2.4 Agente Etiológico

O parasita *Trypanosoma cruzi*, pertence à classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Hoare e Wallace, 1966; Urbina, 2001). Durante seu ciclo de vida, apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota). No homem e nos demais vertebrados, o tripomastigota tem por habitat o meio circulante, e o amastigota, os tecidos. Nos invertebrados (insetos vetores), ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes presentes nas fezes do inseto (Ministério da Saúde, 2009) (Figura 12).

Figura 12- Observação microscópica de protozoários do gênero *Trypanosoma*. Formas amastigotas intracelulares (A); formas amastigotas em músculo cardíaco de camundongo infectado (B); formas tripomastigotas sanguíneas (C) e formas epimastigotas (D). Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

1.2.5 Manifestações clínicas

Após a entrada do parasita no organismo, ocorrem duas etapas fundamentais na infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* (Ministério da Saúde,

2009):

a) Fase aguda (inicial) – predomina o parasito circulante na corrente sanguínea, em quantidades expressivas. As manifestações da doença febril podem persistir por até 12 semanas. Nesta fase, os sinais e sintomas podem desaparecer espontaneamente evoluindo para a fase crônica ou progredir para formas agudas graves que podem levar ao óbito.

b) Fase crônica – existem raros parasitas circulantes na corrente sanguínea. Inicialmente, esta fase é assintomática e sem sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo. Pode apresentar-se como uma das seguintes formas:

- Forma indeterminada – paciente assintomático e sem sinais de comprometimento do aparelho circulatório (avaliação clínica, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais) e do aparelho digestivo (avaliação clínica e radiológica normais de esôfago e cólon). Esse quadro poderá perdurar por toda a vida da pessoa infectada ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva ou associada (cardiodigestiva).
- Forma cardíaca – evidências de acometimento cardíaco que, freqüentemente, evolui para quadros de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Essa forma ocorre em cerca de 30% dos casos crônicos e é a maior responsável pela mortalidade na doença de Chagas crônica.
- Forma digestiva – evidências de acometimento do aparelho digestivo que, freqüentemente, evolui para megacólon ou megaesôfago. Ocorre em cerca de 10% dos casos.
- Forma associada (cardiodigestiva) – ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas.

A infecção humana é caracterizada por um período agudo com parasitemia relativamente elevada e que pode durar algumas semanas, seguida de uma fase crônica da doença, onde frequentemente verifica-se sorologia significativamente

positiva, apesar de baixas concentrações de parasitas encontrados (Andrade, 1999). Muitos anos após a infecção, cerca de 20-30% dos indivíduos podem desenvolver uma cardiomiopatia crônica e outros 10% ou menos, megassíndromes gastrointestinais, além do comprometimento de nervos periféricos em uma baixa porcentagem dos pacientes (Coura e Castro, 2002). Na América Latina, estima-se mais de 100 milhões de pessoas diretamente expostas ao risco de infecção (WHO, 1997). No Brasil, a doença parece reemergir, uma vez que um aumento de mais de 400% nos últimos oito anos foi verificado, quando comparado ao período compreendido entre 1969-1992 (Coura *et al.*, 2002).

1.2.6 Ciclo Biológico

A transmissão da doença acontece quando o triatomíneo contaminado com o *Trypanosoma cruzi* pica o hospedeiro vertebrado depositando fezes próximo ao local da picada. Sendo assim, ao coçar, o indivíduo ou animal desloca os parasitas para a circulação (Rey, 2001). As formas habituais de transmissão da doença de Chagas para o homem são: a vetorial, a transfusional, a transplacentária (congênita) e, mais recentemente, a transmissão por via oral, pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou suas dejeções.

Mecanismos de transmissão menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e leite materno (Ministério da Saúde, 2009). O ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* é mostrado na Figura 13.

Figura 13- Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Center for Disease Control and Prevention, 2011.

1.2.7 Situação da doença de Chagas no Brasil

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. A ocorrência da doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo) com maior frequência de casos e surtos registrados na região da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará, Tocantins), onde a transmissão oral tem sido registrada com maior frequência. Nos anos de 2000, 2001 e 2004, ocorreram 57 casos da DCA, por transmissão oral; no período de 2005 a 2007, esses números somaram 301 casos. Em 2008, foram diagnosticados 94 casos de DCA no estado do Pará, dos quais 57 (65%) estavam envolvidos em transmissão oral; 20, no estado do Amapá, todos por provável transmissão oral; e cinco no estado de

Tocantins, quatro por transmissão oral (80%) e um vetorial (Ministério da Saúde, 2009).

Os surtos pela forma oral aparecem de forma súbita, atingindo um número pequeno de pessoas, geralmente coincidem com épocas de calor, de maior atividade dos triatomíneos (maior mobilidade de vetores, maior hematofagismo, maior contaminação do ambiente com fezes infectadas, maior produção de casos agudos por via vetorial clássica). A via oral ganhou maior destaque em janeiro de 2005 a agosto de 2007, devido a notificação de 22 surtos de doença aguda em vários estados. Na maioria dos eventos, pôde-se comprovar a associação da ocorrência de casos com o consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina - 2005 e Bahia - 2006), bacaba (Maranhão, Pará - 2006) e especialmente do açaí (Pará – 2006 e 2007, Amazonas - 2007). Um total de 170 casos e 10 óbitos (letalidade de 6,5%) foram identificados. Entre os alimentos, podem-se incluir sopas, caldos, sucos de cana ou açaí, comida caseira, leite, carne de caça semicruda. O *Trypanosoma cruzi* permanece vivo por algumas horas ou dias dependendo da temperatura, umidade e dessecação. Em baixas temperaturas, sua viabilidade pode ser até de semanas. Sabe-se que o cozimento superficial dos alimentos não elimina o agente, mas que procedimentos como pasteurização, cocção acima de 45°C e liofilização o fazem (Ministério da Saúde, 2009).

1.2.8 Tratamento

O principal obstáculo para o tratamento da doença de Chagas é o uso de medicamentos tóxicos e pouco eficazes. A terapia usada no tratamento da doença baseia-se em dois medicamentos; o nifurtimox, que foi descontinuado do mercado nacional, porém pode ser usado no caso de intolerância ao então único medicamento disponível, o benznidazol (Ministério da Saúde, 2009).

Nifurtimox e benznidazol foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70 (Coura e Castro, 2002). Nenhum destes compostos é ideal por que: não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais; requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica; há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita a ação destas drogas, além da resistência a ambos compostos terem sido relatadas (Carrilero *et al.*, 2011) . Existe também o tratamento da forma sintomática, ou seja, para atenuação dos sintomas, como o uso de cardiotônicos e antiarrítmicos, para o coração, ou através cirurgias corretivas do esôfago e do cólon (Kirchhoff, 1996). Em dezembro de 2011, a Fundação Oswaldo Cruz, a indústria farmacêutica Lafepe juntamente com a Iniciativa para Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), aprovaram o desenvolvimento de uma formulação pediátrica do benznidazol (DNDi, 2012). O benznidazol é apresentado na forma de comprimidos de 100 mg (adultos) e 12,5 mg (crianças) e deve ser usado em duas ou três tomadas diárias, por via oral, durante 60 dias. A dose varia de acordo com a idade e o peso do paciente, sendo em adultos recomendada a dose de 5mg/kg/dia e em crianças 5-10mg/kg/peso/dia. O nifurtimox pode ser encontrado em comprimidos de 120mg e, de forma semelhante ao benznidazol deve ser usado em duas ou três dosagens diárias, por via oral, durante 60 a 90 dias. A dose indicada também está relacionada à idade e peso do paciente que varia de 8 a 10mg/kg/dia em adultos e 15mg/kg/dia em crianças (Ministério da Saúde, 2009).

O nifurtimox (Figura 14A) é um composto nitrofurano que apresenta atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita. Severos efeitos adversos vêm sendo relatados, como anorexia, alterações psíquicas e gastrointestinais, assim como diarreia e vômitos. O benznidazol (Figura 14B) é um derivado nitroimidazólico, que se apresenta mais efetivo que o nifurtimox contra formas tripomastigotas do parasita. As reações adversas com o benznidazol podem

ser classificadas em três grupos: 1) sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, febre e edema generalizado, dor muscular e articular; 2) depressão da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitoses, sendo as mais severas; 3) polineuropatia, parestesia e polineurites de nervos periféricos (Coura *et al.*, 2002).

Teixeira e colaboradores (1990) demonstraram que ambos os fármacos induziram o aparecimento de linfomas em coelhos e camundongos, além de apresentarem atividades mutagênicas e carcinogênicas (Teixeira *et al.*, 1994). Terapias alternativas vêm sendo estudadas para o tratamento da doença de Chagas, e dentre estas, o fármaco posaconazol, tem apresentado significativa atividade em modelo animal quando comparado com ao fármaco padrão, o benznidazol. Outros derivados do triazol (inibidores da biossíntese do ergosterol), como ravuconazol, também estão sendo estudados (Lescure *et al.*, 2010). Em relação à extensa lista de diferentes classes de compostos que apresentam atividade *in vitro* sobre *Trypanosoma cruzi*, somente alopurinol, itraconazol, fluconazol e posaconazol foram submetidos a ensaios clínicos desde a introdução do nifurtimox e do benznidazol. Este fato se deve em muitos casos a inexistência de indicação do efeito curativo, ao efeito potencial tóxico e/ou teratogênico (em geral somente analisado em modelos *in vitro*), enfatizando a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais mais adequados bem como a padronização de protocolos de ensaio *in vitro* (Tempone *et al.*, 2007).

Figura 14- Estrutura química do nifurtimox (A) e benznidazol (B) (PubChem, 2012).

1.3 A importância dos produtos naturais como novos protótipos farmacêuticos

Um dos importantes métodos de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos se baseia na busca de novos protótipos farmacêuticos encontrados principalmente em produtos de origem natural, buscando assim, uma ampliação do arsenal terapêutico para importantes protozooses (Ganesan, 2002). Através do estudo biomonitorado, isto é, o fracionamento químico dos compostos ativos presentes em um extrato bruto, guiado pela atividade biológica de interesse, permite-se um isolamento mais rápido e eficaz do composto ativo. Através da síntese deste novo protótipo, modernas técnicas como química combinatória, QSAR (quantitative structure-activity relationship–relação estrutura-atividade) ou modelagem molecular podem contribuir muito na amplificação de sua atividade farmacológica e, até mesmo, reduzir uma potencial toxicidade (Peck *et al.*, 1992).

Por muitos anos o uso tradicional dos produtos naturais foi focado em plantas medicinais. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais foram derivados predominantemente de plantas, que constituíram a base da maioria dos primeiros medicamentos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (Sneader, 1996; Mann, 2000; Newman *et al.*, 2000; Buss *et al.*, 2003; Butler, 2004;).

A importância dos protótipos naturais como toxinas animais, no desenvolvimento de novos fármacos é corroborada através dos estudos realizados por Newman e colaboradores (2003), onde demonstram o elevado índice de substâncias naturais encontradas como princípio ativo de novos medicamentos.

Atualmente, pesquisadores tem buscado moléculas de origem natural provenientes de insetos, escorpiões, aranhas, serpentes, invertebrados marinhos, peixes, anfíbios e plantas, visando o encontro de moléculas com atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e/ou antiparasitária (Cruz *et al.*, 1992;

Karalliedde, 1995; Gong *et al.*, 1997; Cudic *et al.*, 1999; Torres-Larios *et al.*, 2000; Daly, 2004; Tempone *et al.*, 2008). Trabalhos pioneiros de produtos naturais marinhos, como os trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores Bergmann e Feeney (1951), representaram grande avanço no combate a pandemias, como a AIDS. Seus estudos com a esponja marinha *Tectitethya crypta* (*Cryptotethya crypta*), culminaram com a descoberta da azidotimidina (AZT) (Donia e Hamann, 2003), importante tratamento quimioterápico da AIDS. Outro importante resultado derivou da descoberta do Ara-C (arabinosil citosina, ou citarabina), indicado no tratamento de leucemia aguda não-linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia das meninges (Ireland *et al.*, 1993), sendo comercializado sob a marca de Cytosar-U® (Upjohn). Outro medicamento é o Ara-A (arabinosil adenina, ou vidarabina), comercializado como Vira-A® (Parke-Davis), sendo indicado no tratamento de viroses provocadas por *Herpes simplex* e *Herpes zoster* (Oliveira e Freitas, 2001). Ainda pode-se citar o acyclovir e a dideoxinosina (DDI), como exemplos de agentes antivirais potentes usados clinicamente (Donia e Hamann, 2003; Tziveleka *et al.*, 2003).

Entre os anos de 1983 e 1994, a FDA (Food and Drug Administration – USA) aprovou 520 novos fármacos, dos quais 39% são de origem natural ou seu derivado (Cragg *et al.*, 1997). Newman e Cragg (2007) avaliaram os resultados publicados de produtos naturais como fonte de novos fármacos no período de 1981 a 2006. Os padrões utilizados para a classificação de fármacos de origem natural foram: peptídeos e/ou proteínas isolados de organismos/linhagens celulares ou produzidos por processos biotecnológicos (B); produtos naturais sem modificações químicas (N); produtos naturais com modificações por semi-síntese (ND); fármacos totalmente sintetizados, com base na estrutura do composto natural (S); fármacos obtidos por síntese total com sítio farmacofórico (arranjo de átomos ou grupos

funcionais para a ligação de um composto a um receptor) semelhante ao do composto natural (S*); fármacos que mimetizam produtos naturais (NM) e vacinas (V). Entre o total de 1.184 fármacos liberados comercialmente no período citado, 57% se encaixam nos padrões citados acima, isto é, têm alguma relação com fontes naturais (Figura 15). Pela análise desses dados, percebe-se a importância dos produtos naturais, não só como fonte de novos compostos, mas também como modelo para a síntese de novos fármacos (Newman e Cragg, 2007).

Figura 15- Distribuição de protótipos naturais em fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2006. B: peptídeos e/ou proteínas isolados de organismos/linhagens celulares ou produzidos por processos biotecnológicos; N: produtos naturais sem modificações químicas; ND: produtos naturais com modificações por semi-síntese; S: fármacos totalmente sintetizados, com base na estrutura do composto natural; S*: fármacos obtidos por síntese total com sítio farmacofórico semelhante ao do composto natural; NM: fármacos que mimetizam produtos naturais; V: vacinas. Fonte: Newman e Cragg, 2007.

O maior número de medicamentos aprovados na indústria farmacêutica nos últimos 25 anos foi dedicado a doenças infecciosas (microbianas, parasitárias e virais), com 230 drogas aprovadas (Tabela 1) (Newman e Cragg, 2007).

Tabela 1- Fármacos desenvolvidos nos últimos 25 anos para doenças infecciosas.
Fonte: Newman e Cragg, 2007.

Indicação	Total	B	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM	V
Antibacteriana	109	-	10	64	23	-	-	1	11
Antifúngica	29	1	-	3	22	3	-	-	-
Antiparasitária	14	-	2	5	4	-	2	-	1
Antiviral	78	12	-	2	7	1	20	12	25
Total	230	13	12	74	56	4	22	12	37
Porcentagem	100	5,7	5,2	32,3	24,5	2,2	9,6	4,8	15,7

B: peptídeos e/ou proteínas isolados de organismos/linhagens celulares ou produzidos por processos biotecnológicos; N: produtos naturais sem modificações químicas; ND: produtos naturais com modificações por semi-síntese; S: fármacos totalmente sintetizados, com base na estrutura do composto natural; S*: fármacos obtidos por síntese total com sítio farmacofórico semelhante ao do composto natural; NM: fármacos que mimetizam produtos naturais; V: vacinas.

Dos 14 fármacos antiparasitários desenvolvidas no período de 1981 a 2006, sete são de origem natural ou seu derivado (Tabela 2) (Newman e Cragg, 2007).

Tabela 2- Fármacos antiparasitários de origem natural ou derivado, desenvolvidos nos últimos 25 anos. Fonte: Newman e Cragg, 2007.

Nome genérico	Nome comercial	Ano de introdução
Artemisinina	Artemisin	1987
Ivermectina	Mectizan	1987
Arteether	Artemotil	2000
Artemether	Artemetheri	1987
Artenusato	Arinate	1987
Eflornithina HCl	Ornidyl	1990
Mefloquina HCl	Fansimef	1985

De 1975 a 1999 a indústria farmacêutica introduziu 1.393 novas entidades químicas no mercado onde menos de 1% foi registrado para doenças tropicais (Trouiller *et al.*, 2001).

Segundo Amorozo (2002), no Brasil, as sociedades rurais, os povos indígenas e as comunidades com poucos recursos, muitas vezes possuem somente fontes naturais como forma de tratamento, ou utilizam essas, combinados com fármacos obtidos em farmácias, pois mesmo que haja um grande número de hospitais e centros médicos, o emprego de produtos naturais é essencial no cotidiano de grande parte da população brasileira. A OMS (2007) estima que 80% das pessoas dependem da medicina tradicional, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, segundo Di Stasi (1996), 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis no mercado, enquanto que grande parte da população encontra na natureza a única forma de recurso terapêutico. Só no ano de 2007, o Brasil arrecadou 160 milhões de dólares na venda de produtos naturais (OMS, 2007).

1.4 Venenos dos anfíbios

Venenos são substâncias comuns na natureza sendo uma fonte rica de diversos compostos. Os animais venenosos possuem uma diversidade de toxinas para captura, defesa e proteção contra diversos tipos de predadores (Ménez, 1998; Lewis e Garcia, 2003).

Os anfíbios representam uma rica fonte de moléculas bioativas que tem sido destacado em muitos trabalhos. Sua pele caracteriza-se por dois tipos de glândulas: as glândulas mucosas, que produzem muco, o qual controla o pH, grau de umidade da pele, atua na termorregulação, respiração cutânea e na defesa e as glândulas granulosas, também chamadas de serosas ou venenosas (Toledo e Jared, 1995), onde se encontra uma variedade de princípios ativos que compreendem moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, como esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados guanidínicos, peptídeos e proteínas (Toledo e Jared, 1989) (Tabela 3). Embora a pele do sapo seja o órgão onde se encontra a maior concentração de substâncias venenosas, o sangue e os ovários também as possuem (Toledo e Jared, 1989).

Tempone e colaboradores (2008) demonstraram que dois bufadienolídeos denominados telocinobufagina e helebrigenina, isolados do anuro *Rhinella jimi*, apresentaram atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi*. Leite e colaboradores (2005) isolaram seis peptídeos ativos da secreção de *P. hypochondrialis* e demonstraram atividade contra bactérias gram-negativas, positivas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, bem como Brand e colaboradores (2002) isolaram peptídeos ativos da mesma secreção e demonstraram atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Da pele de urodelos do gênero *Taricha*, isolou-se um composto muito tóxico conhecido por tetrodotoxina. A tetrodotoxina bloqueia a condução do impulso

nervoso e sobre este aspecto é milhares de vezes mais eficiente do que a cocaína (Toledo e Jared, 1989).

Durante séculos vem sendo utilizado um medicamento tradicional denominado Ch'an Su (Senso), uma preparação comercial do veneno seco do sapo chinês *Bufo bufo gargarizans* que vem sendo utilizada contra várias afecções como sinusites, inflamação locais, hemorragias gengivais, dor-de-dente, resfriados entre outros (Toledo e Jared, 1989).

Algumas classes de venenos estão presentes em determinadas espécies, como os bufadienolídeos, que são esteróides encontrados em Bufonidae (Daly *et al.*, 1997). As catecolaminas, como adrenalina e dopamina também são encontradas em Bufonidae. Outras classes de aminas biogênicas foram encontradas em 14 famílias de anuros, duas de urodelos e na gimnofiona *Siphonops annulatus* (Schwartz *et al.*, 2007). Dermaseptinas, dermorfinas e deltorfinas estão restritas à Hylidae; magaininas ocorrem somente em *Xenopus* (Toledo e Jared, 1995; Schwartz *et al.*, 2007); bombesinas e ceruleínas ocorrem em pelo menos cinco famílias distintas (Bevins e Zasloff, 1990).

Tabela 3- Alguns componentes químicos isolados da secreção de anfíbios. Fonte: (Toledo e Jared, 1989).

Componente químico	Gênero do qual foi isolado	Classificação do componente
Tetrodoxina	<i>Taricha</i>	Derivado guanidínico
Pumiliotoxinas		
Histronicotoxinas	<i>Dendrobates</i>	Alcalóides
Gefirotoxinas		
Batracotoxina	<i>Phyllbates</i>	Alcalóides-esteróides
Samandarina	<i>Salamandra</i>	
Bufogeninas	<i>Bufo</i>	Esteróides
Bufotoxinas		
Bufotenina	<i>Bufo</i>	Aminas biogênicas
Epinefrina		
Fisalemia	<i>Physalaemus</i>	
Ceruleína	<i>Leptodactylus</i>	
Bombesina	<i>Bombina</i>	Peptídeos
Alitesina	<i>Alytes</i>	
Bradicinina	<i>Rana</i>	

Muitas são as espécies de anfíbios e poucos compostos são conhecidos farmacologicamente. Nada se encontra na literatura sobre o isolamento de metabólitos secundários das secreções das espécies abordadas nesse trabalho. A maioria das espécies foram escolhidas por produzirem abundantes secreções cutâneas, que em estudos preliminares apresentaram considerável atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *L. (L.) infantum chagasi* (Tempone et al., 2007).

Visto a problemática da terapia tanto para leishmaniose quanto para doença de Chagas e a fonte de moléculas bioativas inesgotáveis, o presente projeto visou o estudo biomonitorado dos venenos com o objetivo de isolar e caracterizar novos protótipos farmacêuticos ativos nos parasitas em estudo, disponibilizando novas moléculas que poderiam ser utilizadas como protótipos para o desenho de novos fármacos antiparasitários.

2 OBJETIVOS

Gerais: Este projeto visa o isolamento e caracterização química de metabólitos secundários e/ou peptídeos provenientes de secreções cutâneas de anfíbios brasileiros, e avaliação de atividade antiparasitária em *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *T. cruzi*.

Específicos:

- a) Fracionamento biomonitorado das secreções cutâneas de *Siphonops annulatus*, *Corythomantis greeningi*, *Aparasphenodon bruno*i e *Phyllomedusa hypochondrialis* para isolamento de peptídeos e/ou metabólitos secundários ativos em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*;
- b) Isolamento e purificação dos compostos ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e caracterização química e bioquímica do composto mais ativo, utilizando-se técnicas de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- c) Avaliação *in vitro* da Concentração Efetiva 50% em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* de pelo menos um composto ativo isolado;
- d) Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do composto mais ativo isolado, utilizando-se macrófagos peritoniais provenientes de fêmeas de camundongos BALB/c, determinando-se os respectivos Índices de Seletividade;
- e) Estudos das alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* ou tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, após tratamento com um composto ativo isolado.

- f) Estudo da permeabilidade da membrana plasmática de *L. (L.) infantum chagasi* ou *T. cruzi* na presença de um composto ativo isolado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: DMSO, glicerol, dodecil sulfato de sódio, metanol e acetonitrila, foram obtidos da Merck. MTT- (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio), meio RPMI-PR⁻ 1640, foram adquiridos da Sigma. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma. Todos os solvente utilizados foram grau HPLC da J.T. Baker. Cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak foram adquiridos da Waters (USA). O medicamento Glucantime foi obtido da Aventis®.

Equipamentos: Para realização deste projeto, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UFLC-Shimadzu Corporation-Japão), um aparelho de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C, Avance, 400 MHz da Bruker) com a colaboração do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1011), com a colaboração da Prof. Dra. Noemi Taniwaki do Instituto Adolfo Lutz. E um espectrômetro de massas (MSQ-Surveyor da Thermo-Finningan) com a colaboração do Prof. Dr. Daniel Pimenta no Instituto Butantan.

3.1 Coleta da secreção dos anfíbios

As secreções dos anfíbios *Siphonops annulatus* (Figura 16A), *Corythomantis greeningi* (Figura 16B), *Aparasphenodon brunoi* (Figura 16C) e *Phyllomedusa hypochondrialis* (Figura 16D) foram retiradas por compressão mecânica (após rápida lavagem do animal em água destilada) em béquer contendo água mili-Q no Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan sobre orientação do Prof. Dr. Carlos Jared uma vez ao mês durante o ano de 2010. Após a coleta,

essas amostras foram liofilizadas e estocadas a -20°C até a utilização para evitar possível degradação.

Figuras 16- *S. annulatus* (A), *C. greeningi* (B), *A. brunoi* (C) e *P. hypochondrialis* (D). Fonte: Jared C, Antoniazzi MM e Scarpelli RF.

3.2 Obtenção dos extratos orgânicos (metabólitos secundários)

3.2.1 Obtenção de metabólitos secundários das secreções de anfíbios através da partição líquido-líquido

Para a obtenção de metabólitos secundários bioativos das secreções cutâneas dos anfíbios, as mesmas foram pesadas, parcialmente dissolvidas em água mili-Q e particionadas sequencialmente em solventes de polaridade crescente: n-hexano, acetato de etila e butanol (1:1, V/V). Essa partição originou quatro fases, sendo elas: fração em hexano (FrHex), fração em acetato de etila (FrAcEt), fração em butanol (FrBut) e fração aquosa (FrAq) como mostra a figura 17. Estas frações foram concentradas em rotaevaporador, levadas a secar em Speed Vacuum e testados contra *L. (L.) infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi* na concentração de 300 µg/mL.

Figura 17- Esquema de partição líquido-líquido de *S. annulatus*, *C. greeningi* e *A. brunoi*.

3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de *S. annulatus* (Protocolo 1)

Após o particionamento, foi feita a análise por CLAE com as frações SaFrHex e SaFrAcEt, as quais foram processadas individualmente em coluna analítica C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm) no (UFLC-Shimadzu Corporation-Japão). Estas frações foram diluídas em metanol (MeOH) e aplicadas na coluna (10µL). A eluição das frações foi acompanhada em uma faixa de 200-800 nm, utilizando-se um detector de arranjo de diodos. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min em gradiente de MeOH (solvente B) em água (solvente A) de 10-100% em 26 minutos.

Todas as frações obtidas foram testadas na concentração de 150 µg/mL para *L. (L.) infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi*.

A SaFrBut foi processada em coluna semi-preparativa C18 (Vydak, dimensões 250x100mmx10µm). Estas frações foram diluídas em (MeOH) e aplicadas na coluna (50µL). A eluição das frações foi acompanhada em uma faixa de 200-800 nm (arranjo de diodo). O fluxo utilizado foi de 2 mL/min em gradiente de MeOH em água.

3.2.2.1 Elucidação estrutural

A tentativa de elucidação estrutural da possível substância ativa isolada da secreção de *S. annulatus* foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C).

3.2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) de *S. annulatus*

Análises por CCD foram efetuadas na fração através de placas de sílica gel com indicadores de fluoresceína (Merck). Como fase móvel, utilizou-se os solventes hexano e acetato de etila (1:1). A revelação e visualização das bandas foi realizada

em câmara com luz ultravioleta (254 nm) e com a utilização de sulfato cérico, seguido de aquecimento a 100°C.

3.2.3 Fracionamento do veneno de *S. annulatus* (Protocolo 2)

3.2.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS) em coluna Sep-Pak, C₁₈

O veneno foi pesado (500 mg), dissolvido diretamente em solvente orgânico (acetato de etila 1,2 L), seguido de sonicação em banho (sem aquecimento) por 30 minutos. Posteriormente, foi filtrado em papel filtro (Whatman) dando origem à fração acetato de etila. O precipitado foi ressuspendido em MeOH e filtrado novamente, originando uma fração em metanol, seguida de sonicação em banho (sem aquecimento) por 30 minutos. Sendo assim, esta fração foi concentrada em evaporador rotativo (40°C) e submetida à separação em cartucho de extração em fase sólida Sep-Pak C₁₈, utilizando um gradiente crescente de MeOH:água (0%, 30%, 70% e 100% (v/v), coletando-se frações de 5 mL. Posteriormente as frações foram submetidas a CLAE-DAD em condições analíticas.

3.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de *S. annulatus*

Após a EFS (SPE), foi feita a CLAE com a fração SaFrMeOH-Mix (30%, 70% e 100%) as quais foram agrupadas e processadas em diferentes colunas (C8, C18, Phenil) visando a melhor separação. Sendo assim, a coluna analítica C8 (Hichrom®, dimensões 250 x 4,6mm, partícula 5 µm) proporcionou uma melhor separação no (UFLC Shimadzu Corporation-Japão). Esta fração foi diluída em (MeOH) e aplicada na coluna (10µL). A eluição das frações foi acompanhada em uma faixa de 200-800 nm, utilizando-se o arranjo de diodo (DAD). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min em gradiente de MeOH (solvente B) em água (solvente A) de 10-100% em 20 minutos.

3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência de *C. greeningi*

Posteriormente a partição líquido-líquido, foi feita a CLAE com as frações CgFrHex e CgFrAcEt, as quais foram processadas individualmente em coluna analítica C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm) em UFLC (Shimadzu Corporation-Japão). Estas frações foram diluídas em MeOH e aplicadas na coluna (10µL). A eluição dos picos foi acompanhada em uma faixa de 200-800 nm (arranjo de diodo). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min em gradiente de metanol:água, utilizando como solvente A a água e MeOH como solvente B (10-100% em 26 minutos). Todas as frações obtidas foram testadas na concentração de 150 µg/mL para *L. (L.) infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi*.

3.3 Isolamento de peptídeos de *P. hypochondrialis*

Para a obtenção de peptídeos bioativos da secreção cutânea de *P. hypochondrialis*, a mesma foi pesada, dissolvida em água mili-Q (0,1% TFA) e submetida à filtração sob centrifugação (10.000 x g) em cartucho de filtração Amicon (limite de exclusão 10 kDa).

Após o enriquecimento da fração peptídica, foi feita a análise por CLAE, no qual a amostra foi diluída em água mili-Q e ACN (1:1, v/v) + 0,1% TFA e analisadas em coluna analítica C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm) com um volume de injeção de 10µL em (UFLC - Shimadzu Corporation-Japão). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min em gradiente de ACN + 0,1%TFA (solvente B) em água + 0,1%TFA (solvente A) de 10-90% em 62 minutos. A eluição das frações foi acompanhada em dois comprimentos de onda, 214 e 254 nm, porém utilizando-se detector de arranjo de diodo e verificando-se a eluição dos compostos de 200 a 800 nm. O estudo biomonitorado foi realizado com todas as frações eluídas em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3.3.1 Espectrometria de massas

As amostras, previamente secas, foram dissolvidas em 0,1% de ácido fórmico e depositadas no amostrador do auto-injetor. Em seguida, 20 µL de amostra foram injetados em um sistema de espectrometria de massas (MS) tipo Quadrupolo, MSQ Surveyor (Thermo Finnigan) sob fluxo constante de 50 µL/min, operando em modo positivo e realizando varreduras no intervalo de 50 a 2000 m/z. O controle do instrumento, a aquisição e o processamento de dados foi realizado pelo pacote de programas Xcalibur (Thermo Finnigan).

3.3.2 Sequenciamento dos peptídeos

Os peptídeos foram sequenciados pelo método de degradação química de Edman, onde o resíduo amino-terminal é rotulado e clivado a partir do peptídeo sem interromper as ligações peptídicas entre outros resíduos de aminoácidos, utilizando um sequenciador modelo PPSQ-21A (Shimadzu, Kyoto, Japan) de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante.

3.4 Cultura celular e animais de experimentação

3.4.1 Parasitas

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina, sem adição de antibióticos em estufa a 24°C. Para obtenção de amastigotas, foi utilizado hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) que foram infectados mensalmente para manutenção da cepa. Amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram purificadas de baço de hamsteres dourados por meio de centrifugação diferencial e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958) 60 a 70 dias após a infecção.

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino, à temperatura de 37°C em estufa com 5% CO₂ (Kesper *et al.*, 2000).

3.4.2 Animais

Todos os animais foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Adolfo Lutz e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.4.3 Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos compostos

Os diferentes compostos (frações e drogas padrões) foram dissolvidos em MeOH, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar as respectivas CE₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou 0,5% para não causar danos aos parasitas.

A CE₅₀ dos diferentes compostos foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* que foram aplicadas a 1x10⁶/poço por 24 horas (em estufa de BOD à 24°C) em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos, utilizando-se meio M-199 suplementado com 10% soro fetal bovino, sem adição de antibióticos. Após um período de 24 horas, a viabilidade dos promastigotas foi verificada através da atividade oxidativa mitocondrial por meio de ensaio colorimétrico utilizando-se MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-brometo de 2,5-di-fenoltetrazolio) (Tada *et al.*, 1986) a 550 nm. O fármaco anfotericina B foi usado como controle positivo do ensaio (100% morte).

As formas tripomastigotas, extraídas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2, foram aplicadas na concentração de 1×10^6 /poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e a viabilidade dos tripomastigotas foi determinada pelo método do MTT (Lane *et al.*, 1996) conforme descrito anteriormente para *Leishmania*. O fármaco benznidazol foi usado como controle positivo do ensaio (100% morte).

3.4.3.1 Viabilidade dos parasitas em estudos biomonitorados

A avaliação da viabilidade dos parasitas foi realizada de duas formas:

- a) Observação em microscópio óptico (morfologia e motilidade);
- b) Atividade oxidativa mitocondrial, por meio de incubação com 20 µL de MTT, por quatro horas, seguida por incubação com 80 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Após 24 horas, o sobrenadante foi lido à 550nm em leitor de placas (Multiskan reader 30®).

3.4.4 Determinação da CE₅₀ em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) infantum chagasi*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas pela lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e foram mantidos à temperatura de 37°C em estufa de CO₂ (5%). Os macrófagos foram adicionados a 4×10^5 em placas Nunc de 16 poços, permanecendo em estufa à 37°C por 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* extraídas do baço foram separadas por centrifugação diferencial (Stauber, 1958) e adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago), e incubadas com os compostos a 37°C por um período

de 120 horas. Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE_{50} foi determinada pela contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados e como controle (0% infectado) macrófagos tratados com Glucantime[®].

3.4.5 Determinação da citotoxicidade e da CC_{50} em macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c

Com o objetivo de determinar a toxicidade do composto com comprovada atividade antiparasitária, foi determinado o Índice de Seletividade (I.S.) do mesmo, através da seguinte expressão:

$$\text{I.S.} = \frac{\text{Toxicidade (} CC_{50} \text{ em macrófagos)}}{\text{CE}_{50} \text{ contra os parasitos}}$$

CE_{50} contra os parasitos

Foram utilizados macrófagos peritoniais provenientes de BALB/c fêmeas, cultivados conforme descrito anteriormente e aplicados na concentração de 4×10^5 /poço por 48 horas em estufa de 37°C com 5% de CO_2 contendo meio M-199 em placas de 96 poços. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT após 48 horas de incubação com o composto.

3.4.6 Análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Para verificar as possíveis alterações ultraestruturais, promastigotas (2×10^7) de *L. (L.) infantum chagasi* foram incubadas com as frações por diferentes períodos (1, 2, 4, 16 horas) à 24°C em placas de 24 poços. Após a incubação, os promastigotas foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos, retirado sobrenadante, o “pelete” foi fixado em glutaraldeído a 2,5% em solução tampão de

cacodilato de sódio 0,1 M / sacarose 0.2 M em pH 7,2 e tetróxido de ósmio a 1%. As amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina Epon. As secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila. Cortes finos foram corados em acetato de uranila e citrato de chumbo (Duarte *et al.*, 1992). O material foi então examinado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011.

3.4.7 Avaliação de um mecanismo de ação “Sytox Green” em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Para avaliar a permeabilidade da membrana celular, promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (2×10^6 poço) foram lavadas com PBS e incubadas com 30 μ L de Sytox Green (1 μ M) (Molecular Probes®) por 15 minutos no escuro. Posteriormente a fração foi adicionada. O aumento na fluorescência devido à ligação do marcador fluorescente ao DNA do parasita foi medido utilizando-se um espectrofluorímetro de placas com os filtros de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. A leitura foi normalizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle negativo). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,5% (controle positivo) (Kulkarni *et al.*, 2009). A fluorescência foi medida a cada 30 minutos até um total de 2 horas.

3.4.8 Análises estatísticas

A determinação da CE_{50} dos fármacos e compostos analisados foi determinada por curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (r). As amostras foram comparadas com os fármacos padrões e estatisticamente avaliadas através dos valores de p (t- test - análise não-paramétrica de Mann-Whitney) com base em dois ensaios distintos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo da secreção de *Siphonops annulatus*

4.1.1 Estudos biomonitorados e partição líquido-líquido

A partir da partição líquido-líquido, foram originadas quatro frações orgânicas, sendo estas: SaFrHex, SaFrAcEt, SaFrBut e SaFrAq. Destas, a fração em hexano (SaFrHex) e a fração em acetato de etila (SaFrAcEt) apresentaram atividade contra os promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração de 300 µg/mL, destruindo 100% dos parasitas em 24 horas, conforme observado por microscopia óptica. A fração em butanol (SaFrBut) também apresentou atividade contra os promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, porém matando menos de 50% dos parasitas à 300 µg/mL. A fração aquosa, resultante da partição líquido-líquido (SaFrAq) não apresentou atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração testada.

Partindo-se de 800 mg de veneno bruto seco, obtiveram-se as seguintes massas após o processo de partição líquido-líquido, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Massa das frações e atividade anti-*Leishmania* das frações de *S. annulatus*.

Fração	Massa (mg)	% em relação à	
		Atividade anti- <i>Leishmania</i> a 300 µg/mL	massa do veneno bruto
Hexano	5,4	100% morte	0,675
Acetato de Etila	6,9	100% morte	0,8625
*Butanol	88,5	< 50% morte	11,0625
*Aquosa	9,1	0% morte	1,137

Valores aproximados obtidos por microscopia óptica (motilidade e morfologia).

* Alíquota da fração devido à dificuldade de evaporação.

4.1.2 Determinação da Concentração Efetiva 50% das frações em hexano e em acetato de etila em *L. (L.) infantum chagasi*

A avaliação inicial da atividade anti-*Leishmania* do veneno de *S. annulatus* compreendeu a determinação da CE_{50} das frações obtidas na partição. Apenas com as frações em hexano (SaFrHex) e em acetato de etila (SaFrAcEt) foi possível calcular a curva dose-resposta. A figura 18 mostra que a fração em hexano resultou em um valor de CE_{50} de 214,5 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% = 129,8 a 354,5 $\mu\text{g/mL}$). A fração em acetato de etila apresentou menor CE_{50} , resultando em um valor de 70,82 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% = 37,32 a 134,4 $\mu\text{g/mL}$). A fração em butanol (SaFrBut) resultou em 24% de morte dos parasitas na concentração máxima de 300 $\mu\text{g/mL}$, não sendo possível calcular o valor da CE_{50} (dados não mostrados). A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão, apresentando uma CE_{50} de 0,0453 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 0.0367 a 0.0560 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 18- Avaliação da CE_{50} em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* das frações hexano (SaFrHex) e acetato de etila (SaFrAcEt) do veneno de *S. annulatus*. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão.

4.1.3 Estudos biomonitorados e fracionamento por CLAE

Posteriormente ao particionamento do extrato de *S. annulatus*, foi realizado fracionamento por CLAE das frações ativas. O estudo em coluna analítica da SaFrHex revelou a presença de seis picos (SaFrHex 1-6), sendo o pico 5 o majoritário (Figura 19). O estudo biomonitorado em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* revelou atividade antiparasitária (100% morte) das frações SaFrHex4, SaFrHex5 e SaFrHex6, e atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* das frações SaFrHex2, SaFrHex3, SaFrHex4, SaFrHex5 e SaFrHex6 na concentração de 150 µg/mL. A análise das frações do veneno de *S. annulatus* em detector de arranjo de diodo (DAD) confirmou a presença dos seis picos majoritários, sendo que o pico 5 apresenta absorção na faixa de 200 a 300 nm (Figura 20).

Figura 19- Perfil cromatográfico da SaFrHex obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm), o fluxo utilizado foi de 1mL/minuto, utilizando como solvente A água e como solvente B MeOH. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 254 nm.

Figura 20- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrHex obtido por CLAE em DAD.

Posteriormente ao particionamento da fração em hexano (SaFrHex) foi realizado o fracionamento da fração em acetato de etila (SaFrAcEt), revelando a presença de sete picos majoritários (SaFrAcEt 1-7) (Figura 21), sendo as frações SaFrAcEt4, SaFrAcEt5, SaFrAcEt6 e SaFrAcEt7 ativas (100% morte) para *L. (L.) infantum chagasi* e as frações SaFrAcEt2, SaFrAcEt3, SaFrAcEt4, SaFrAcEt5, SaFrAcEt6 e SaFrAcEt7 ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 150 µg/mL. A análise das frações (SaFrAcEt 1-7) em detector de arranjo de diodo (DAD), confirmou a presença dos sete picos, sendo que o pico 5 apresentou absorção na faixa de 200 a 300 nm (Figura 22).

Figura 21- Perfil cromatográfico da SaFrAcEt obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250 x 4,6mm). O fluxo utilizado foi de 1mL/min, utilizando como solvente A água e como solvente B MeOH. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 254 nm.

Figura 22: Perfil cromatográfico em 3D da fração SaFrAcEt obtido por CLAE.

Com o objetivo de se obter maior massa das frações ativas, as frações com o mesmo tempo de retenção foram agrupadas (SaFrHex1-6/SaFrAcEt1-7) (Figura 23) e posteriormente levadas à secar em evaporador rotativo. Apesar de outras tentativas de separação terem sido realizadas em coluna semi-preparativa (devido à complexidade da amostra), não foram obtidos resultados satisfatórios. Sendo assim, optou-se pelo fracionamento do material (SaFrHex1-6/SaFrAcEt1-7 =

SaFrHexAcEt) em coluna analítica (250 x 4.6 mm), que forneceu após 180 injeções em CLAE, apenas 1,3 mg da fração SaFrHexAcEt5. Devido a baixa quantidade (massa <0.5 mg) das outras frações reunidas (*pool*), não foi possível dar continuidade aos estudos.

Figura 23- Representação esquemática do fracionamento por CLAE da SaFrHexAcEt. Em verde são indicadas as frações ativas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em amarelo as frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, em vermelho são indicadas as frações ativas contra ambos parasitas.

Em função da maior disponibilidade de massa da fração em butanol (SaFrBut) (Tabela 4), foi realizado o fracionamento em CLAE em coluna semi-preparativa C18. Sendo assim, obtiveram-se oito frações (SaFrBut 1-8) (Figuras 24 e 25), das quais apenas a fração SaFrBut3 foi ativa contra promastigotas *L. (L.) infantum chagasi*, matando 100% dos parasitas na concentração testada. As frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram as seguintes: SaFrBut2 e SaFrBut4, matando aproximadamente 50% e 100% dos parasitas, respectivamente.

Figura 24- Perfil cromatográfico da SaFrBut obtido por CLAE em coluna semi preparativa C18 (Vydak, dimensões 250 x 100mm x 10µm). O fluxo utilizado foi de 2 mL/min em gradiente de metanol em água. O cromatograma foi obtido em 214 e 254 nm.

Figura 25- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrBut obtido por CLAE em DAD.

Com o objetivo de se isolar o composto ativo, foi realizado o re-fracionamento da SaFrBut4 (Figura 26), utilizando-se coluna analítica C18. Foram observadas mais nove frações (SaFrBut4 1-9) (Figuras 27 e 28), que devido a baixa quantidade isolada das novas frações (< 0.8 mg), não foram testadas novamente para *Trypanosoma cruzi*.

Figura 26- Representação esquemática das subfrações obtidas por CLAE após fracionamento das frações SaFrBut e SaFrBut4. Em verde são indicadas as frações ativas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em amarelo as frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, em vermelho (eventualmente) são indicadas as frações ativas contra ambos parasitas, e em cinza, não testados.

Figura 27- Perfil cromatográfico da SaFrBut4 obtido por CLAE. O fluxo utilizado foi de 2 mL/min em gradiente de metanol em água. O cromatograma foi obtido em 214 e 254 nm.

Figura 28- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrBut4 obtido por CLAE em DAD.

4.1.4 Isolamento de um possível composto ativo da secreção de *S. annulatus*

Após a comparação dos respectivos tempos de retenção dos picos majoritários, presentes tanto na SaFrHex como na SaFrAcEt, realizou-se a união dos mesmos, obtendo-se um elevado grau de pureza (aproximadamente 98%), conforme determinado por CLAE (Figuras 29 e 30). Após reunida, esta fração foi submetida ao ensaio contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, e observou-se atividade anti-*Leishmania* na concentração de 150 µg/mL. Desta forma, submeteu-se a fração à elucidação estrutural, utilizando a ressonância magnética nuclear (H-RMN e C-RMN - anexos 1 e 2, respectivamente) porém os resultados foram inconclusivos.

Figura 29- Perfil cromatográfico da SaFrHexAcEt5 obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250 x 4,6mm), o fluxo utilizado foi de 1mL/min, utilizando como solvente A água e como solvente B MeOH. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 254 nm.

Figura 30- Perfil cromatográfico em 3D da SaFrHexAcEt5 obtido por CLAE em DAD.

4.1.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da SaFrHexAcEt5

Com base nos resultados inconclusivos anteriores para a SaFrHexAcEt5, resolveu-se investigar possíveis contaminantes por meio de CCD analítica. Foram visualizadas duas bandas, confirmando a presença de um contaminante na fração. Devido à pequena quantidade de massa e consequentemente as dificuldades de separação do contaminante por meio de CLAE-DAD disponíveis em nosso

laboratório, optou-se por realizar os estudos de atividade antiparasitária sem a elucidação estrutural do composto ativo.

4.1.6 Determinação da CE_{50} em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* da fração SaFrHexAcEt5

Partindo de uma diluição seriada, foi possível determinar a CE_{50} , após incubação e ensaio de viabilidade celular. Sendo assim, a fração SaFrHexAcEt5 apresentou um valor promissor de CE_{50} em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* de 0,065 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% 0,05191 a 0,08164 $\mu\text{g/mL}$), como mostra a figura 31. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão, apresentando uma CE_{50} de 0,1278 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 0.0733 a 0,2227 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 31- Avaliação da CE_{50} da fração SaFrHexAcEt5 sobre formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão.

Posteriormente, a atividade anti-*Leishmania* da fração SaFrHexAcEt5 foi realizado ensaio contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*. No entanto, a fração não apresentou a atividade esperada devido à elevada citotoxicidade ao macrófago, não sendo possível a determinação da CE_{50} .

4.1.7 Determinação da CC_{50} da fração SaFrHexAcEt5 em macrófagos peritoneais

Com o objetivo de se avaliar a CC_{50} da fração SaFrHexAcEt5, utilizou-se macrófagos peritoneais, avaliando-se a viabilidade celular pelo método do MTT. Após 48 horas de incubação, obteve-se um valor de CC_{50} de 0,2787 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% 0,2311 a 0,3360 $\mu\text{g/mL}$) como mostra a figura 32.

Figura 32- Curva dose-resposta da citotoxicidade da fração SaFrHexAcEt5 sobre macrófagos peritoneais. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm.

4.1.8 Determinação da CE_{50} da fração SaFrHexAcEt5 em *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram incubadas por 24 horas com a fração SaFrHexAcEt5 e a viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT. Foi verificado um valor de CE_{50} de 2,755 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% 2,235 a 3,396 $\mu\text{g/mL}$) como mostra a figura 33. O fármaco benznidazol foi utilizado como fármaco padrão e apresentou uma CE_{50} de 198,70 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 139,90 a 282,40 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 33- Avaliação da CE_{50} sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. O benznidazol foi utilizado como fármaco padrão.

4.1.9 Análise de microscopia eletrônica de transmissão da fração SaFrHexAcEt5 em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

O estudo das alterações ultraestruturais com promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi realizado após incubação da fração SaFrHexAcEt5 e observado por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 34), onde verificou-se um intenso dano celular tempo-dependente. Na figura 34B (1h incubação), observa-se um inchaço pronunciado da mitocôndria, com preservação do cinetoplasto, incluindo a formação de vacúolos. Não foram observados danos na membrana plasmática, nem mesmo alteração da morfologia do parasita. Após 2h de incubação (Figura 34C), observa-se a presença e intensificação de vacúolos, alterando a morfologia do parasita. Na figura 34D (4h de incubação), observa-se um contínuo dano mitocondrial, e vacúolos contendo estruturas semelhantes a restos de membranas (Figura 34E). Não foram observadas alterações na membrana plasmática do parasita. Finalmente, após 16h de incubação, verifica-se a perda de praticamente todas as organelas citoplasmáticas bem como a morfologia totalmente

alterada para uma forma arredondada (*amastigota-like*), confirmando a morte do parasita. Observa-se um intenso extravazamento de material nuclear, com perda de nucléolo e descondensação da cromatina. Mesmo assim, verifica-se a conservação da arquitetura dos microtúbulos, com preservação da membrana plasmática.

Figura 34- Avaliação dos danos ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas *L. (L.) infantum chagasi* incubados com a fração SaFrHexAcEt5. A: controle (não tratado), B: incubação com 1h; C: incubação com 2h; D, E: incubação com 4h e F: incubação com 16 horas.

4.1.10 Avaliação da permeabilidade da membrana celular da fração SaFrHexAcEt5 em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

O ensaio fluorimétrico para avaliação de possíveis alterações da permeabilidade da membrana celular de *L. (L.) infantum chagasi* foi verificado na presença da fração SaFrHexAcEt5. Utilizando-se o marcador Sytox Green, verificou-se que a fração SaFrHexAcEt5 não induziu a formação de poros na membrana quando comparado ao grupo controle (Figura 35). Foi utilizado como controle positivo do ensaio o surfactante Triton-X, resultando em aumento da fluorescência.

Figura 35: Avaliação da permeabilidade celular de *L. (L.) infantum chagasi* incubado com a fração SaFrHexAcEt5. A leitura do ensaio fluorimétrico com SytoxGreen foi realizada com filtros de excitação 485 nm e emissão de 520 nm a cada 30 minutos em espectrofluorímetro. Triton X-100 foi utilizado como controle positivo do ensaio.

4.2 Estudo da secreção de *Corythomantis. greeningi*

4.2.1 Obtenção de extratos e fracionamento por CLAE

A partir da partição líquido-líquido deste veneno, foram originadas quatro novas frações, sendo estas: CgFrHex, CgFrAcEt, CgFrBut e CgFrAq. Destas, a fração em hexano (CgFrHex) e em acetato de etila (CgFrAcEt) apresentaram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração de 300 µg/mL, destruindo 100% dos parasitas após 24 horas, conforme observado por microscopia óptica. As frações em butanol (CgFrBut) e aquosa (CgFrAq) não apresentaram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração testada.

Sendo assim, as frações CgFrHex e CgFrAcEt foram submetidas a CLAE, e processadas individualmente em coluna analítica C18. A CgFrHex apresentou oito picos (frações CgFrHex 1-8) (Figuras 35 e 36). Destas, apenas a fração CgFrHex5 apresentou atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, eliminando 100% dos parasitas após 24 horas. As frações CgFrHex4 e CgFrHex5 apresentaram atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, também matando 100% dos parasitas em 24 horas, conforme observado por microscopia óptica.

Posteriormente a fração em acetato de etila (CgFrAcEt) foi submetida a CLAE, apresentando cinco frações (CgFrAcEt 1-5) (Figuras 37 e 38). Quando estas foram testadas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, não foi verificada atividade antiparasitária na concentração máxima testada (150 µg/mL) conforme mostram as figuras 39 e 40.

Figura 36- Perfil cromatográfico da CgFrHex obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm). O fluxo utilizado foi de 1mL/min, utilizando como solvente A água e como solvente B MeOH. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 254 nm.

Figura 37- Perfil cromatográfico em 3D da CgFrHex obtido por CLAE-DAD.

Figura 38- Perfil cromatográfico da CgFrAcEt obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250 x 4,6mm). O fluxo utilizado foi de 1mL/min, utilizando como solvente A água e como solvente B MeOH. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 254 nm.

Figura 39- Perfil cromatográfico em 3D da CgFrAcEt obtido por CLAE-DAD.

Figura 40- Representação esquemática das frações obtidas por CLAE após fracionamento da fração CgFrHex. Em verde são indicadas as frações ativas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em amarelo as frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, em vermelho são indicados as frações ativas contra ambos parasitas.

Figura 41- Representação esquemática das frações obtidas por CLAE após fracionamento da fração CgFrAcEt. Em verde são indicadas as frações ativas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em amarelo as frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, em vermelho são indicados as frações ativas contra ambos parasitas.

4.3 Estudo da secreção de *Aparasphenodon brunoi*

4.3.1 Obtenção de extratos e avaliação da atividade anti-*Leishmania*

A partir da partição líquido-líquido, originou-se quatro frações, sendo estas: AbFrHex, AbFrAcEt, AbFrBut e AbFrAq. Destas, a AbFrHex e AbFrAcEt apresentaram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração de 300 µg/mL, destruindo 100% dos parasitas após 24 horas, conforme observado por microscopia óptica. As frações em butanol (AbFrBut) e aquosa (AbFrAq) não apresentaram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* na concentração testada. Novamente, baixas quantidades de metabólitos foram obtidas das frações AbFrHex (0,8 mg) e AbFrAcEt (1,1 mg).

4.4 Estudo da secreção de *Phyllomedusa hypochondrialis*

4.4.1 Isolamento dos peptídeos

Para a obtenção de peptídeos bioativos da secreção cutânea de *P. hypochondrialis*, utilizou-se inicialmente a filtração em membrana Amicon, obtendo-se uma fração com compostos > 10 kDa e outra < 10 kDa. Neste trabalho, utilizou-se apenas os compostos de baixa massa molecular (<10 kDa), sendo esta denominada fração peptídica (FrPept). Utilizando-se o estudo biomonitorado, observou-se que a FrPept apresentou atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, matando 100% dos parasitas, conforme observado por microscopia óptica.

Posteriormente, a fração FrPept foi analisada por CLAE, em coluna analítica de fase reversa, revelando a presença de 32 picos majoritários. O estudo biomonitorado em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* revelou atividade antiparasitária (100% morte) em 10 picos, sendo 3 ativos para *L. (L.) infantum chagasi* (FrPept 13, 26 e 27) e 7 ativos para *Trypanosoma cruzi* (FrPept 21, 22, 25, 26, 28, 30, 31 e 32), conforme observado por microscopia óptica (Figura 41).

Figura 42- Perfil cromatográfico da fração peptídica obtido por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250x4,6mm). O fluxo utilizado foi de 1mL/min, utilizando como solvente A água e como solvente B ACN ambos com 0,1% de TFA. O cromatograma foi obtido nos comprimentos de 214 e 280 nm. Em verde são indicadas as frações ativas contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em amarelo as frações ativas contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, em vermelho são indicados as frações ativas contra ambos parasitas.

4.4.3 Espectrometria de massas

Com o objetivo avaliar a natureza e complexidade das frações ativas, foi realizada a análise por espectrometria de massas, a qual indicou a presença de peptídeos bem como estimou a pureza relativa dos mesmos. Sendo assim, os estudos prosseguiram apenas com os picos com pureza relativa maior que 95%. Os espectros de massas encontram-se anexo (Anexos 3 a 7).

4.4.4 Sequenciamento dos peptídeos

O sequenciamento N-terminal dos peptídeos foi realizado por degradação química de Edman, e as sequencias determinadas estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5- Peptídeos, suas respectivas sequências de aminoácidos obtido pelo método de Edman e atividade de interesse (*L. (L.) infantum chagasi* e/ou *Trypanosoma cruzi*).

Peptídeo	Sequência de aminoácidos Edman	Atividade Biológica
Bradicinina (UniProtP84894)	VPPGFTP(FR)	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>
Dermaseptina 4* (UniProtP84599)	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALNAASE <u>AL</u> -NH ₂	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Dermaseptina 1* (UniProtP84596)	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGA <u>L</u> -NH ₂	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Filoseptina 7 (UniProtP84572)	FLSLIPHAINAVSAIAKHF-NH ₂	<i>L. (L.) infantum chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>
Filoseptina 8 (UniProtP85883)	FLSLIPTAINAVSALAKHF-NH ₂	<i>Trypanosoma cruzi</i>

*os resíduos sublinhados foram deduzidos baseados na massa molecular e alinhamento de sequência.

4.4.4 Determinação da CE₅₀ dos peptídeos em *L. (L.) infantum chagasi*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram incubadas com os peptídeos por 48 horas em diferentes concentrações e a viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT. Sendo assim, a bradicinina apresentou um valor de CE₅₀ em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* de 11,55 µg/mL (IC 95% 7,37 a 18,11 µg/mL) e a filoseptina 7, apresentou um valor CE₅₀ de 20,61 µg/mL (IC 95% 16,12 a 26,34 µg/mL), como mostra a figura 42. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão, apresentando uma CE₅₀ de 0,1614 µg/mL (IC95% 0,1321 a 0,1970 µg/mL).

Figura 43- Avaliação da CE_{50} sobre formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão.

4.4.5 Determinação da CE_{50} dos peptídeos em *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram incubadas com os peptídeos por 24 horas em diferentes concentrações e a viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT. Observou-se que os peptídeos analisados mataram 100% dos parasitas nas concentrações mais elevadas. A dermaseptina 4 apresentou um valor de CE_{50} de 0,8306 µg/mL (IC 95% 0,6937 a 0,9945 µg/mL) e a dermaseptina 1, um valor de CE_{50} de 1,640 µg/mL (IC 95% 1,324 a 2,033 µg/mL). Ambas filoseptinas (7 e 8) apresentaram atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, com valores de CE_{50} de 0,7083 µg/mL (IC 95% 0,5770 a 0,8695 µg/mL) e CE_{50} de 0,937 µg/mL (IC 95% 0,770 a 1,140 µg/mL), respectivamente (Figura 43). O fármaco benznidazol foi utilizado como fármaco padrão e apresentou uma CE_{50} de 114,7 µg/mL (IC95% 105,7 a 124,5 µg/mL).

Figura 44- Avaliação da CE_{50} sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. O benznidazol foi utilizado como fármaco padrão.

4.4.6 Determinação da CC_{50} dos peptídeos em macrófagos peritoneais

Com o objetivo de se avaliar a CC_{50} dos peptídeos, utilizou-se macrófagos peritoneais, avaliando-se a viabilidade celular pelo método do MTT. Após 48 horas de incubação, somente a filoseptina 7 demonstrou toxicidade, com uma CC_{50} de 70,55 $\mu\text{g/mL}$ (IC95% 60,81 a 81,86 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 44). Tanto a dermaseptina 1, a dermaseptina 4, como a filoseptina 8 não demonstraram atividade citotóxica na concentração testada (Figura 45). Devido a pouca quantidade isolada do peptídeo bradiginina, não houve quantidade de material suficiente para realizar os ensaios de CC_{50} .

Figura 45: Curva dose-resposta da citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais da filoseptina 7. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT a 550 nm. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão em células de mamíferos (NCTC).

Figura 46: Representação gráfica da toxicidade da dermaseptina 1, da dermaseptina 4 e da filoseptina 8 comparadas com o controle.

5 DISCUSSÃO

Venenos de anfíbios vêm sendo utilizados como uma importante ferramenta para a área de estudos de novos fármacos (Leite *et al.*, 2005), conhecida como *Drug Discovery*. Estudos anteriores realizados por Tempone e colaboradores (2008), demonstraram que dois bufadienolídeos, denominados telocinobufagina e helebrigenina, isolados do veneno do sapo *Rhinella jimi*, apresentaram atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi*. No presente projeto, verificou-se o potencial anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* de quatro venenos ou secreções cutâneas de anfíbios brasileiros. Por meio de fracionamento cromatográfico dos diferentes venenos, buscou-se o isolamento e a caracterização dos compostos ativos, com ênfase em metabólitos secundários e peptídeos. Desta forma, identificou-se pela primeira vez na literatura, a atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos presentes dos venenos de *Siphonops annulatus*, *Corythomantis greeningi*, *Aparasphenodon bruno*i e *Phyllomedusa hypochondrialis*. A ausência de estudos na literatura sobre atividade biológica ou composição química dessas espécies, a abundância de veneno em relação a outros anfíbios e a disponibilidade dos animais no Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, foram critérios que determinaram a escolha das espécies para o fracionamento cromatográfico, visando o isolamento de compostos ativos.

Para os metabólitos secundários, foram adotadas estratégias de pré-fracionamento para a separação dos venenos, como a partição líquido-líquido, que permite a separação inicial dos componentes orgânicos e diminui a possibilidade de que os compostos ativos sejam mascarados por outros metabólitos majoritários (Tempone *et al.*, 2011). As concentrações testadas também foram pré-estabelecidas, visando a detecção de compostos com atividade antiparasitária mais promissora. Por meio do estudo biomonitorado, foram identificados compostos

ativos no veneno de *S. annulatus*, concentrando-se principalmente nas frações mais apolares (hexano e acetato de etila), e sugerindo uma natureza hidrofóbica do composto ativo. A determinação da CE_{50} em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, demonstrou que ambas frações em hexano e em acetato de etila de *S. annulatus*, obtidas por meio de partição líquido-líquido, apresentaram valores abaixo de 300 µg/mL, sendo a fração em acetato de etila, a mais ativa contra *L. (L.) infantum chagasi*. Apesar de iniciarmos os estudos com grande massa de veneno bruto, obtivemos por ambos os protocolos de fracionamento (Protocolo 1 e 2), pequenas quantidades destas frações (0,6-11%) em relação a massa inicial, fator este limitante para os procedimentos de elucidação estrutural dos compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas.

Com o objetivo de se isolar o composto ativo, novos fracionamentos foram realizados com as frações orgânicas do veneno de *S. annulatus*, resultando em uma sub-fração majoritária, ativa em ambos parasitas, porém com uma massa de apenas 0,16% em relação ao veneno bruto. Este fato poderia ser explicado, tendo em vista que os animais utilizam essas secreções somente para defesa contra predadores e microorganismos (Toledo e Jared, 1995), não sendo necessária a biossíntese de grandes concentrações para o animal. Apesar do elevado grau de pureza da fração SaFrHexAcEt5, constatado por CLAE e utilizando-se a varredura em diferentes comprimentos de onda por DAD, os estudos em ressonância magnética nuclear (RMN- 1H) foram inconclusivos quanto a elucidação de uma substância. Além do mais, devido à baixa concentração deste composto, não foi possível a obtenção de informações adicionais com o espectro de RMN ^{13}C . Com base em estudos posteriores em CCD, confirmou-se a presença de duas substâncias nesta fração, sugerindo-se assim, que a ausência de absorção de luz ultravioleta e visível de uma das substâncias, prejudicou a análise em CLAE nas condições utilizadas (DAD). Devido a pequena massa obtida após os

fracionamentos do veneno de *S. annulatus*, assim como a emulsão que se formava após a partição líquido-líquido, adotou-se um novo protocolo de separação, porém, não foram observadas maiores quantidades de metabólitos nas frações resultantes. Com base nos ensaios para a determinação da CE_{50} da fração SaFrHexAcEt5 em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, observou-se que esta fração foi cerca de duas vezes mais ativa que a anfotericina B, utilizada como fármaco padrão. Verificou-se ainda que a fração SaFrHexAcEt5 exerce um efeito leishmanicida, dado a ausência de atividade oxidativa mitocondrial do parasita após 24 horas de incubação. Apesar do valor de CE_{50} promissor, a fração SaFrHexAcEt5 não apresentou seletividade para os amastigotas intracelulares, sendo estes a forma clinicamente relevante do parasita (Tempone *et al.*, 2005). Este fato poderia ser explicado por: i) ausência de receptores específicos no macrófago, inviabilizando a entrada do composto (fração) na célula hospedeira; ii) inativação química do composto (fração) quando exposto à 37° por 120 h, conforme o tempo necessário para o ensaio; iii) diferenças metabólicas do amastigota, sendo este mais resistente que a forma extracelular (promastigotas). Ainda assim, a fração SaFrHexAcEt5 foi utilizada como uma ferramenta para avaliar os danos celulares causados no parasita, uma vez que esta poderia fornecer informações adicionais sobre possíveis rotas de morte da *Leishmania*. Sendo assim, por meio de estudos em microscopia eletrônica de transmissão, pudemos observar que a fração SaFrHexAcEt5 induz a severos danos na mitocôndria do parasita, além de induzir a formação de grandes vacúolos no citoplasma. Além disso, mesmo após a perda das organelas citoplasmáticas, observou-se a preservação da membrana plasmática. Este fato pode ser corroborado por meio do estudo fluorimétrico, onde pode-se confirmar a ausência de poros na membrana do parasita na concentração testada. Até o presente momento, sugere-se que o mecanismo de ação da fração SaFrHexAcEt5 seja outro do que a simples indução de poros e alteração da permeabilidade.

Diferentemente, Tempone e colaboradores (2008) demonstraram que o esteróide telecionofuganina, isolado do anfíbio *Rhinella jimi*, induz a formação de pequenos poros na membrana plasmática de *L. (L.) infantum chagasi*. A ligação de fármacos ao ergosterol da membrana de *Leishmania*, com consequente alteração da permeabilidade celular e indução de poros, vem sendo demonstrada para a anfotericina B, um dos principais fármacos de escolha clínica no tratamento da leishmaniose visceral (Chattopadhyay e Jafurulla, 2011). Apesar da elevada citotoxicidade, o isolamento do composto ativo da fração SaFrHexAcEt5, poderia contribuir com a seleção de um protótipo menos tóxico, caso este não viesse a perder a atividade antiparasitária de interesse. Assim, futuros estudos de relação estrutura-atividade, bem como de química combinatória, poderiam trabalhar na seleção de análogos sintéticos mais ativos e possivelmente menos tóxicos à célula hospedeira. Estudos realizados da fração SaFrHexAcEt5 contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que o parasita foi menos susceptível do que a *Leishmania*, porém, cerca de 72 vezes mais efetivo que o benznidazol, utilizado como fármaco padrão. Além do mais, estes estudos demonstraram uma significativa redução da motilidade dos parasitas, além de uma morfologia bastante alterada nos primeiros dez minutos de incubação, sugerindo uma morte rápida do parasita. Com base no teste colorimétrico do MTT, onde se avalia a capacidade oxidativa mitocondrial (Tada *et al.*, 1986), podemos sugerir uma atividade tripanomicida da fração SaFrHexAcEt5 após 24 horas.

Na busca por novos compostos antiparasitários, outros venenos de anfíbios foram avaliados neste estudo. O fracionamento biomonitorado da fração em hexano do veneno de *C. greeningi* (CgFrHex), concentrou um maior número de frações ativas para ambos parasitas. Porém, o mesmo não pôde ser observado com a fração em acetato de etila (CgFrAcEt), a qual após fracionamento, resultou em 100% de perda da atividade antiparasitária. Este fato é muito comum na área de

produtos naturais, podendo ser resultado de sinergismo entre as frações, que quando separadas, perdem sua atividade biológica (Sartorelli *et al.*, 2010). Mais uma vez, se verificou também neste veneno, uma baixa quantidade de metabólitos isolados após cromatografia, confirmando a necessidade de sucessivas aplicações no CLAE, a fim de se obter massa satisfatória para as análises de elucidação estrutural por RMN.

Os estudos com o veneno de *A. brunoi*, demonstraram que após a partição líquido-líquido, obtiveram-se frações ativas para *L. (L.) infantum chagasi*, porém não foi promissor investir, tendo em vista as baixas quantidades de metabólitos após fracionamentos.

Apesar dos esforços iniciais neste projeto terem sido direcionados aos metabólitos secundários (moléculas geralmente < 1000 Da), peptídeos de anfíbios vêm demonstrando importantes atividades antiparasitárias. Nossos estudos foram direcionados para o veneno do anfíbio *P. hypochondrialis*, tendo em vista que no período de 1966 a 2009, mais de duzentas sequências de peptídeos bioativos do gênero *Phyllomedusa* foram depositadas em banco de dados (Azevedo *et al.*, 2011). Sendo assim, este veneno vem sendo considerado uma riquíssima fonte de moléculas bioativas e inspiração para a área de fármacos.

Assim, foram adotadas estratégias de pré-fracionamento do veneno de *P. hypochondrialis*, a fim de se separar compostos de baixa massa molecular como os peptídeos dos compostos de alta massa molecular como as proteínas. Em nosso estudo, utilizando a CLAE combinados com estudos biomonitorados *in vitro*, foram isolados cinco peptídeos com atividade anti-*L. (L.) infantum chagasi* e/ou anti-*Trypanosoma cruzi*. Leite e colaboradores (2005) isolaram seis peptídeos (filoseptinas 1 a 6) da secreção de *P. hypochondrialis* e demonstraram atividade contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Neste contexto Kückelhaus e colaboradores (2009) isolaram um peptídeo, a

filoseptina 1 da secreção de *Phyllomedusa azurea* com atividade anti-*Plasmodium falciparum* e anti-*L. amazonensis*. Em nosso estudo, foram isoladas duas filoseptinas de *P. hypochondrialis* (filoseptinas 7 e 8), ambas com atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*; porém, somente a filoseptina 7 demonstrou atividade contra *L. (L.) infantum chagasi*.

Nosso estudo demonstra nitidamente que a *Leishmania* foi menos susceptível à filoseptina 7 quando comparado ao *Trypanosoma cruzi*. Os valores de CE_{50} da filoseptina 7 em *Leishmania* demonstram que o peptídeo é cerca de 125 vezes menos ativo que o fármaco anfotericina B, apresentando um Índice de Seletividade de apenas 3,5. Apesar disto, estudos futuros poderiam ser realizados com as formas amastigotas intracelulares, visto que diferenças morfológicas e metabólicas são encontradas entre as formas evolutivas do parasita, podendo levar à diferentes respostas a fármacos.

A ausência de atividade anti-*Leishmania* da filoseptina 8 poderia ser explicada em decorrência da substituição do aminoácido histidina na posição 7 da cadeia peptídica (filoseptina 7), pela treonina na posição 7 da filoseptina 8, assim como, da substituição da isoleucina na posição 15 da filoseptina 7, pela leucina na mesma posição da filoseptina 8. Observa-se ainda que este fato não alterou a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. A substituição de aminoácidos da cadeia peptídica está diretamente relacionada a atividade antiparasitária. Estudos realizados por Leite e colaboradores (2005), demonstraram que dentre as filoseptinas 1-6 isoladas de *P. hypochondrialis*, apenas as filoseptinas 4 e 5 exerceram a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Nossos estudos corroboram os descritos por Leite e colaboradores (2005) em relação as atividades anti-*Trypanosoma cruzi* de filoseptinas e demonstram ainda que as filoseptinas 7 e 8, são aproximadamente 14 vezes (com base nos valores de CE_{50}) mais ativas quando comparadas às 4 e 5. Um fato importante a ser observado é que as filoseptinas 7 e

8 apresentam uma atividade anti-*Trypanosoma cruzi* cerca de 140 vezes maior, quando comparada ao fármaco benznidazol. Quando comparamos a atividade citotóxica com a atividade antiparasitária, dado pelo Índice de Seletividade, observa-se um valor de 100 para a filoseptina 7, e um valor maior que 10 para a filoseptina 8. Estes dados confirmam a promissora atividade destes peptídeos contra o parasita *Trypanosoma cruzi* e sugerem que os mesmos possam ser futuramente estudados como protótipos de novos fármacos para a doença de Chagas.

As filoseptinas constituem um grupo de peptídeos antimicrobianos (AMP) encontrados nas secreções cutâneas especificamente da família Hylidae (Leite *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2011). São peptídeos pequenos, com aproximadamente 19 a 21 resíduos de aminoácidos e possuem um amplo espectro de ação contra parasitas (Leite *et al.*, 2005; Kückelhaus *et al.*, 2009) e bactérias (Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Kückelhaus *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Já as dermaseptinas foram isoladas pela primeira vez do anfíbio *P. sauvagei* em 1991, seu nome foi derivado ao local onde foram encontradas: *derma* (derme), *septinas* (devido a atividade biológicas contra fungos e bactérias) (Mor *et al.*, 1991), são peptídeos com aproximadamente 24 a 34 aminoácidos (Brand *et al.*, 2006). As dermaseptinas possuem um amplo espectro de ação, tais como antibacteriana (Brand *et al.*, 2006) antiparasitária (Krugliak, 2000; Brand *et al.*, 2002), antiviral (Lorin *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, foram também isoladas duas dermaseptinas; a dermaseptina 1 e a dermasetina 4, ambas demonstrando atividade somente contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Nossos estudos corroboram os descritos por Brand e colaboradores (2002), no qual isolaram o mesmo peptídeo (dermaseptina 1), porém, proveniente do anfíbio *Phyllomedusa oreades*, e demonstraram sua atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Ambas dermaseptinas

isoladas em nosso estudo, não demonstraram atividade contra *L. (L.) infantum chagasi*. Este fato sugere que por mais que os parasitas *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* pertençam a uma mesma família, estes possuem diferenças notáveis, que ficam mais claras com a ação das dermaseptinas. Os valores de CE_{50} encontrados tanto para a dermaseptina 1 quanto para a dermaseptina 4, demonstram que estes peptídeos sejam cerca de 140 e 71 vezes mais efetivos que o benznidazol, respectivamente. Novamente, encontramos um elevado Índice de Seletividade, com valores maiores que 12,5. Estes dados confirmam o potencial das dermaseptinas como protótipos de fármacos para a doença de Chagas.

Dermaseptinas vêm demonstrando atividade contra *Leishmania*. Brand e colaboradores (2006), isolaram 5 peptídeos (dermaseptinas 2 a 4, dermaseptinas 6 e 7) de *P. hypochondrialis*, onde demonstraram atividade contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Quando comparamos estes dados ao nosso estudo, verificamos que a dermaseptina 4, isolada por nosso grupo, não apresentou atividade contra *L. (L.) infantum chagasi*. Apesar das semelhanças morfológicas e bioquímicas entre as diferentes espécies de *Leishmania*, a resposta à fármacos pode ser totalmente diferente. Este fato pode ser corroborado quando observamos a excelente atividade da miltefosina contra *Leishmania (L.) donovani* na Índia (Sundar *et al.*, 2002; Sundar e Chakravarty, 2010), e uma baixa atividade deste fármaco para *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* isoladas das Américas (Yardley *et al.*, 2005).

Um dos promissores e inéditos dados relacionam-se a atividade anti-*Leishmania* da [Val¹,Thr⁶] bradicina, um nanopeptídeo com 9 resíduos de aminoácidos. A bradicina foi descrita pela primeira vez em 1960 no veneno de *Bothrops jararaca* (Conceição *et al.*, 2007) e teve como base a origem do captopril (importante fármaco utilizado no tratamento da hipertensão). Este peptídeo foi isolado previamente do mesmo anfíbio *P. hypochondrialis* (Conceição *et al.*, 2007),

confirmando a sequência obtida em nosso estudo por degradação química de Edman. Assim, a [Val¹,Thr⁶]bradicina demonstrou pela primeira vez atividade para *L. (L.) infantum chagasi*, porém, em função da diminuta quantidade isolada do veneno, estudos futuros deverão ser realizados utilizando formas intracelulares (amastigotas) do parasita, assim como, estudos de citotoxicidade, para confirmação do potencial antiparasitário do peptídeo.

Produtos naturais, especialmente venenos animais e plantas, vêm sendo utilizados como inspiração para o desenho de fármacos (Newman e Cragg, 2007). Peptídeos como protótipos, apesar de menos frequentes quando comparados aos metabólitos secundários, vêm sendo utilizados como protótipos de fármacos por indústrias farmacêuticas. Um dos mais recentes desenvolvimentos da indústria, relaciona-se a ziconotida, um peptídeo sintético inicialmente isolado de caramujo marinho *Conus sp.*, contendo 25 aminoácidos. Este medicamento, conhecido como Prialt, foi aprovado pelo Food and Drug Administration (EUA) em 2004, sendo uma alternativa terapêutica aos opióides em casos de dor severa, principalmente nas dores oncológicas (Cherniack, 2011). Outro importante exemplo é o captopril, um importante antihipertensivo isolado da serpente *Bothrops jararaca*, sendo desenvolvido a partir de um peptídeo (Ferreira *et al.*, 1992).

Assim, utilizando-se técnicas como química combinatória, QSAR (quantitative structure-activity relationship – relação estrutura-atividade) ou modelagem molecular, protótipos naturais podem ser sintetizados, modificados e utilizados como medicamentos para diferentes fins. Venenos de anfíbios representam uma rica fonte de peptídeos e metabólitos secundários, com uma grande diversidade de compostos bioativos. Contando com uma das maiores biodiversidades do mundo, o Brasil poderia dispor de uma das maiores bibliotecas de protótipos farmacêuticos naturais do mundo, contribuindo na busca de terapias alternativas para doenças negligenciadas.

6 CONCLUSÃO

- a) A secreção das quatro espécies de anfíbios (*S. annulatus*, *C. greeningi*, *P. hypochondrialis* e *A. brunoi*) foram fracionadas e apresentaram compostos em suas secreções ativos contra os parasitas *L. (L.) infantum chagasi* e *Trypanosoma cruzi*;
- b) As frações orgânicas de *S. annulatus* e *C. greeningi* apresentaram atividade *in vitro* contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e tripomastigotas *Trypanosoma cruzi*, e as frações de *A. brunoi* apresentaram atividade contra *L. (L.) infantum chagasi*;
- c) As frações apolares (hexano e acetato de etila) de *S. annulatus*, *C. greeningi* e *A. brunoi* se mostraram mais ativas do que as frações mais polares (butanol);
- d) A fração SaFrHexAcEt5 apresentou uma promissora atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, porém nenhuma seletividade foi verificada na forma amastigota intracelular;
- e) A fração SaFrHexAcEt5 mostrou elevada citotoxicidade contra macrófagos peritoniais;
- f) A fração SaFrHexAcEt5 foi 72 vezes mais ativa contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* quando comparada ao benznidazol;
- g) O rendimento da fração SaFrHexAcEt5 foi de apenas 0,16% em relação ao veneno total, dificultando sua elucidação estrutural devido ainda a contaminação do material;
- h) A fração SaFrHexAcEt5 resulta em danos mitocondriais e na formação de grandes vacúolos em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*;
- i) A fração SaFrHexAcEt5 não altera a permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*;

- j) Foram isoladas e caracterizados cinco peptídeos do veneno de *P. hypochondrialis*, a saber: bradicinina, dermaseptinas 1 e 4, e as filoseptinas 7 e 8;
- k) Os peptídeos bradicina e filoseptina 7, demonstraram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*;
- l) Os peptídeos dermaseptina 1, dermaseptina 4, filoseptina 7 e filoseptina 8 isolados de *P. hypochondrialis* demonstraram atividade contra tripomastigotas *T. cruzi*;
- m) Somente o peptídeo filoseptina 7 demonstrou toxicidade para células de mamíferos.

REFERÊNCIAS

- Alencar JE, Neves J. Leishmaniose visceral (calazar) In: Veronesi R, editor. Doenças infecciosas e parasitárias. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 724-38.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004;57:1-88.
- Amorozo MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. Acta Bot Brasil. 2002;16:189-203.
- Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:71-80.
- Azevedo Calderon L, Silva Ade A, Ciancaglini P, Stábeli RG. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. Amino Acids. 2011;40:29-49.
- Balaña-Fource R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. Gen Pharmacol. 1998;30:435-43.
- Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. J Org Chem. 1951;16:981-7.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. Rev Infect Dis. 1988;10:560-86.
- Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. Ann Rev of Biochem. 1990;59:395-414.
- Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates MV, Azevedo RB, et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells J Biol Chem. 2002;277:49332-40.
- Brand GD, Leite JRSA, De Sá Mandel SM, Mesquita DA, Silva LP, Prates MV, et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). Biochem and Biophys Res Commun. 2006;347:739-46.

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004;67:2141-53.

Buss AD, Cox B, Waigh RD. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. In: *Drug discovery*. Hoboken: Wiley. 2003; p. 847-900.

Cardoso L, Cabral M. *Leishmania* e leishmaniose canina. *Rev Port Cien Vet.* 1999;13:121-41.

Carrilero B, Murcia L, Martínez-Lage L, Segovia M. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev Esp Quimioter.* 2011;24:123-6.

Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis [citado 2011. Jun 22]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Leishmaniasis.htm>

Centers for Disease Control and Prevention. Trypanosomiasis American [citado 2011. Ago 05]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosomiasisamerican.htm>

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416:7-12.

Cherniack EP. Bugs as Drugs, Part Two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Altern Med Rev.* 2011;16:50-8.

Conceição K, Konno K, Richardson M, Antoniazzi MM, Jared C, Daffre S, *et al.* Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides.* 2006;27:3092-9.

Conceição K, Konno K, Lopes de Melo R, Antoniazzi MM, Jared C, Sciani JM, *et al.* Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides.* 2007;28:515-23.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:3-24.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18:171-6.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 1997;60:52-60.

Cruz LJ, Ramilo CA, Corpuz GP, Olivera BM. *Conus* peptides: phylogenetic range of biological activity. *Biol Bull.* 1992;183:159-64.

Cudic M, Bulet P, Hoffmann R, Craik DJ, Otvos L Jr. Chemical synthesis, antibacterial activity and conformation of dipteridin, an 82-mer peptide originally isolated from insects. *Eur J Biochem.* 1999;266:549-58.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:296-311.

Daly JW, Padgett WL, Saunders RL, Cover JF Jr. Absence of tetrodotoxins in a captive-raised riparian frog, *Atelopus Varius*. *Toxicon.* 1997;35:705-9.

Daly JW. Marine toxins and nonmarine toxins: convergence or symbiotic organisms? *J Nat Prod.* 2004;67:1211-5.

Deane LM. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do estado do Pará. *Inst Med Trop.* 1961;1:15-28.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol.* 1996; 14:417-23.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27:305-18.

Di Stasi LC. Arte, ciência e magia, In: Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp; 1996. p. 15-21.

DNDi – Iniciativa de medicamentos para doenças negligenciadas. [Citado 2012. Jan 18]. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/282-02-12-2011-chagas-na-infancia-tem-remedio.html>.

Donia M, Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:338-48.

Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol.* 1992;16:475–82.

Felicetti SA, Thomas RG, McClellan RO. Metabolism of two valence states of inhaled antimony in hamsters. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1974;35:292-300.

Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, Andreoni AS, *et al.* Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom. *Agents Actions Suppl.* 1992;36:209-14.

Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. [Citado 2011. Fev]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.* 1990;12:308-29.

Ganesan A. Recent developments in combinatorial organic synthesis. *Drug Discov Today.* 2002;7:47-55.

Gasser RA Jr, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1994;18:83-90.

Gong J, Kini RM, Gwee MC, Gopalakrishnakone P, Chung MC. Makatoxin I, a novel toxin isolated from the venom of the scorpion *Buthus martensi* karsch, exhibits nitrgic actions. *J Biol Chem.* 1997;272:8320-4.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:338-49.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:494-501.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* 1966;212:1385-6.

Ireland BK, Acquavella JF, Kier LD. Acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:920-1.

Karalliedde L. Animal toxins. Br J Anaesth. 1995;74:319-27.

Kesper N Jr, De Almeida KA, Stolf AM, Umezawa ES. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. J Parasitol. 2000;86:862-7.

Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). Gastroenterol Clin North Am. 1996;25:517-33.

Krugliak M, Feder R, Zolotarev VY, Gaidukov L, Dagan A, Ginsburg H, Mor A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2442-51.

Kückelhaus SA, Leite JRSA, Muniz-Junqueira MI, Sampaio RN, Bloch C Jr, Tosta EC. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). Exp Parasit. 2009;123:11-16.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. J Biol Chem. 2009;284:15496-504.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p. 291-364.

Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Suarez CC, Bogitsh BJ, Jones MM, Singh PK, *et al.* *In vitro* trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-n-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Trop Med Hyg. 1996;55:263-6.

Leite JRSA, Silva LP, Rodrigues MI, Prates MV, Brand GD, Lacava BM, *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. Peptides. 2005;26:565-73.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis. 2010;10:556-70.

Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nat Rev Drug. 2003;2:790-802.

Limongi JP. Farmacodinâmica. São Paulo: Artes Médicas; 1973.

Lorin C, Saidi H, Belaid A, Zairi A, Baleux F, Hocini H, *et al.* The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity *in vitro*. *Virology*. 2005;334:264-75.

Machado AL. Calazar - Leishmaniose visceral. In: Tonelli E, editor. Doenças infecciosas na infância. Rio de Janeiro: Medsi; 1987. p.747-55.

Maddux MS, Barriere S. A review of complications of amphotericin-B therapy: recommendations for prevention and management. *Drug Intell Clin Pharm*. 1980;14:177-81.

Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1985;18:187-8.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stodard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*. 2001;122:393-403.

Mann J. Murder, editor. Magic and medicine. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.

Ménez A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon*. 1998;36:1557-72.

Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop*. 2011;119:69-75.

Ministério da Saúde. Brasil. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): normas técnicas. Brasília; 1999.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2006.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo; 2006.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. 2009.

Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*. 1991;30:8824-30.

Moreau P, Milpied N, Fayette N, Ramée JF, Harousseau JL. Reduced renal toxicity and improved clinical tolerance of amphotericin B mixed with intralipid compared with conventional amphotericin B in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30:535-41.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep*. 2000;17:215-34.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003;66:1022-37.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70:461-77.

Oliver M, Gregory DJ, Foget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:293-305.

Oliveira JS, Freitas JC. Produtos naturais marinhos: características dos envenenamentos alimentares e substâncias de interesse farmacológico. *Hig Aliment*. 2001;15:22-33.

Organização Mundial da Saúde. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas [citado 2011. Ago]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np16/es/>

Ortiz MI, Suárez-Rivillas A, Molina J. Behavioural responses to human skin extracts and antennal phenotypes of sylvatic first filial generation and long rearing laboratory colony *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:461-6.

Peck CC, Barr WH, Benet LZ, Collins J, Desjardins RE, Furst DE *et al*. Opportunities for integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. *Pharm Res*. 1992;9:826-33.

Pereira G, Machado G, Pereira R, Gadelha J, Barbosa ML. Leishmaniose visceral em Pernambuco (dados epidemiológicos). Bol Trimest Clín Doenças Infecc Parasit. 1985;5:53-70.

Pessoa SB. Ensaio médico-sociais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1960.

PubChem, Nifurtimox [Citado 2012a. Jan 30]. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6842999&loc=ec_rcs

PubChem, Benznidazole. [Citado 2012b. Jan 30]. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=31593&loc=ec_rcs

Rath S, Trivelin LA, Imbrunio TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. Quím Nova. 2003;26:550-5.

Remme JH, De Raadt P, Godal T. The burden of tropical diseases. Med J Aust. 1993;158:465-9.

Rey, L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Ribeiro TA, Campos S. Leishmaniose visceral (calazar). [Citado 2011]. Disponível em: <http://www.drashirleydecampos.com.br>

Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. *In vitro* antileishmanial properties of triand pentavalent antimonial preparations. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1234-9.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453-83.

Sartorelli P, Carvalho CS, Reimão JQ, Lorenzi H, Tempone AG. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. Planta Med. 2010;76:1454-6.

Secretaria da Saúde. Comitê de leishmaniose visceral americana. Bepa. 2010. [Citado 2011]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa77_lva.htm

Sneader W. Drug prototypes and their exploitation. Chichester: John Wiley; 1996.

Schwartz CA, Castro MS, Pires OR Jr, Maciel NM, Schwartz ENF, Sebben A. Princípios ativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: Nascimento LB, Oliveira ME, editores. Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2007. p. 146-168.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. J Protozool. 1958;5:269–273.

SUCEN. São Paulo - Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo: Sucen; 2001.

SUCEN. São Paulo. Vetores e Doenças - Leishmaniose visceral americana. [citado 2011]. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/tegume.html>

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med. 2002;347:1739-46.

Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. Int J Environ Res Public Health. 2010;12:4267-77.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods. 1986;93:157-65.

Teixeira AR, Córdoba JC, Souto Maior I, Solórzano E. Chagas disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. Am J Trop Med Hyg. 1990;43:146-58.

Teixeira AR, Calixto MA, Teixeira ML. Chagas disease: carcinogenic activity of antitrypanosomal nitroarenes in mice. Mutat Res. 1994;305:189-96.

Tempone AG, Borborema SE, De Andrade HF Jr, De Amorim Gualda NC, Yogi A, Carvalho CS, *et al.* Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. Phytomedicine. 2005;12:382-90.

Tempone AG, Melhem MDC, Prado FO, Motoie G, Hiramoto RM, Antoniazzi MM, *et al.* Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. Lett Drug Des Discov. 2007;4:67-73.

Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, De Andrade HF Jr, *et al.* Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon*. 2008;52:13-21.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*. 2011;77:572-85.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011;15:525-32.

Toledo RC, Jared C. Considerações sobre o veneno de anfíbios. *Ciênc Cult*. 1989; 41:250-8.

Toledo RC, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol*. 1995;111:1-29.

Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin. A new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem*. 2000;267:5023-31.

Tracy JB, Webster-Junior LT. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: trypanosomiasis, leishmaniasis, amebiasis, giardiasis, trichomoniasis and other protozoal infection. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. Goodman & Gilman's, the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 965-85.

Trouiller P, Torreele E, Olliaro P, White N, Foster S, Wirth D. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? *Trop Med Int Health*. 2001;6:945-51.

Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*. 2002;359:2188-94.

Tziveleka LA, Vagias C, Roussis V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Curr Top Med Chem*. 2003;3:1512-35.

Urbina JA. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis*. 2001;14:733-741.

World Health Organization. Chagas disease. Thirteenth. Programme Report UNDP/TDR. Geneva, 1997.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Thirteenth. Geneva: 2010.

Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A, Chappuis F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:272-5.

Zhang R, Zhou M, Wang L, McGrath S, Chen T, Chen X, *et al.* Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: A novel broad-spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity. *Mol Immunol.* 2010;47:2030-7.

ANEXOS

Anexo A- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio ^1H

24 Aug 2010

Acquisition Time (sec)	1.9923	Date	24 Aug 2010 10:33:34
File Name	C:\Users\Marco\Desktop\ago24lcdH2_001001r	Frequency (MHz)	400.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	32
Points Count	32768	Original Points Count	16384
Sweep Width (Hz)	8223.68	Pulse Sequence	zg30
		Solvent	MeOD
		Temperature (degree C)	25.160

Acquisition Time (sec)	1.9923	Date	24 Aug 2010 10:33:34		File Name	C:\Users\Marco\Desktop\ago24lcdH2_001001r			
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients	32	Original Points Count	16384	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	25.160

Anexo B- Ressonância magnética nuclear de carbono ^{13}C

Marco Antonio LCD

Current Data Parameters
NAME ago28lcdH1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20100828
Time 15.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 52661
DS 4
SWH 24038.461 Hz
FIDRES 0.733596 Hz
AQ 0.6816244 sec
RG 128
DW 20.800 usec
DE 6.50 usec
TE 298.3 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.00 usec
PL1 -4.80 dB
PL1W 89.51216125 W
SFO1 100.6228293 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 1.30 dB
PL12 21.35 dB
PL13 21.35 dB
PL2W 7.44834852 W
PL12W 0.07363088 W
PL13W 0.07363088 W
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6127671 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Anexo C- Espectros de massa representativos das análises, obtidos por ESI em um MSQ-Surveyor (Thermo Finnigan) (Pico 13).

Anexo D- Espectros de massa representativos das análises, obtidos por ESI em um MSQ-Surveyor (Thermo Finnigan) (Pico 22).

Anexo E- Espectros de massa representativos das análises, obtidos por ESI em um MSQ-Surveyor (Thermo Finnigan) (Pico 25).

Anexo F- Espectros de massa representativos das análises, obtidos por ESI em um MSQ-Surveyor (Thermo Finnigan) (Pico 26).

P26 #171-364 RT: 1.49-3.17 AV: 194 NL: 4.14E6
T: {0;0} + p ESI corona sid=40.00 det=1153.00 Full ms [100.00-1950.00]

Anexo G- Espectros de massa representativos das análises, obtidos por ESI em um MSQ-Surveyor (Thermo Finnigan) (Pico 31).

P31 #176-309 RT: 1.53-2.69 AV: 134 NL: 3.80E6
T: {0;0} + p ESI corona sid=40.00 det=1153.00 Full ms [100.00-1950.00]