



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



Antônio Luiz de Souza

**PRODUTOS NATURAIS E SUA EFICÁCIA CONTRA O *Trypanosoma cruzi*:
uma abordagem teórica (2014-2018)**

Ouro Preto – MG
2019

Antônio Luiz de Souza

**PRODUTOS NATURAIS E SUA EFICÁCIA CONTRA O *Trypanosoma cruzi*:
uma abordagem teórica (2014-2018)**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador(a): Dênia Antunes Saúde-Guimarães

Co-orientador(a): Renata Tupinambá Branquinho

Ouro Preto – MG

2019

S895p

Souza, Antônio Luiz de.

Produtos naturais e sua eficácia contra o *Trypanosoma cruzi* [manuscrito]: uma abordagem teórica (2014-2018) / Antônio Luiz de Souza. - 2019.

52f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Tupinambá Branquinho.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Chagas, Doença de - Tratamento. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Produtos naturais. I. Guimarães, Dênia Antunes Saúde. II. Branquinho, Renata Tupinambá. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



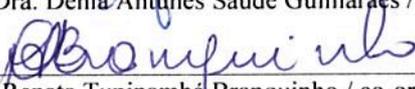
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

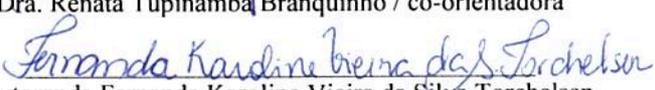
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

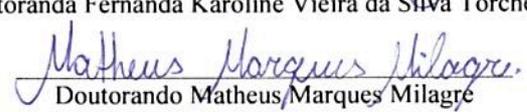
Escola de Farmácia

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 461ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 16 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, terça-feira, realizou-se, a partir das 13 horas e 30 minutos, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Antônio Luiz de Souza**, matrícula **12.2.2168**, intitulada **“Produtos naturais e sua eficácia contra o *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem teórica (2014-2018)”**. A Banca Examinadora foi constituída pelo doutorando Matheus Marques Milagre (UFOP), pela doutoranda Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen (UFOP), pela co-orientadora Dra. Renata Tupinambá Branquinho (UFOP) e pela orientadora Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães (UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua APROVAÇÃO, com a NOTA 9,5. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 16 de julho de 2019.


Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães / orientadora


Dra. Renata Tupinambá Branquinho / co-orientadora


Doutoranda Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen


Doutorando Matheus Marques Milagre


Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedico este trabalho a Deus e às pessoas que Ele colocou em meu caminho para que esta conquista se tornasse realidade!

RESUMO

Descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Chagas, a doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que geralmente progride para a cronicidade, causando grande morbidade e mortalidade nos indivíduos infectados. Incluída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista das 17 doenças tropicais negligenciadas, afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo todo, sendo endêmica na América latina, continente onde é considerada um problema de saúde pública grave. Para o seu tratamento, apenas dois fármacos são aprovados, o Benznidazol e o Nifurtimox. Ambos são compostos nitro heterocíclicos que eliminam o agente etiológico por produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inibindo a capacidade do parasita de neutralizá-las. Apesar da eficácia comprovada na fase aguda da doença, o tratamento com estes compostos apresentou alguns problemas como toxicidade, ineficácia na fase crônica e necessidade da administração por longo período de tempo. Assim, este trabalho, uma revisão bibliográfica abrangendo o período de 2014 a 2018, tem como objetivo demonstrar a eficácia de produtos naturais contra o *T.cruzi* e apresentá-los como alternativa ao tratamento atual da doença de Chagas. Para isso, foram encontrados 13 estudos *in vivo* sobre o tema nas bases de dados Scopus, Scielo, Web of Science e Pubmed. Estes estudos foram classificados em três grupos: compostos fenólicos (lignanas e flavonoides), terpenos e óleos essenciais. A partir das informações e dados obtidos, com exceção da astaxantina, concluiu-se que os produtos naturais possuem ação contra o agente etiológico da doença, reduzindo a parasitemia e/ou curando os animais experimentos, ressaltando principalmente as ações terapêuticas da licnofolida (terpeno) em nanocápsulas e do óleo essencial extraído de *Syzygium aromaticum*, os quais tiveram as maiores porcentagens de cura parasitológica. Os tratamentos com a licnofolida nanoencapsulada, nas doses de 2 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia, resultaram em 100% de taxa de cura em alguns grupos de camundongos *Swiss* infectados com cepas Y e CL. Camundongos *Swiss* infectados com cepas Y e tratados com o óleo essencial de *S.aromaticum*, nas doses de 100 mg/kg e 250 mg/kg, obtiveram taxas de cura de 44,4% e, 22,2%, respectivamente.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Produtos naturais. Tratamento.

ABSTRACT

Discovered in 1909 by the Brazilian physician Carlos Justiniano Chagas, the Chagas disease or American trypanosomiasis is an infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, that usually progress to chronicity, causing great morbidity and mortality in the infected individuals. Included in the World Health Organization (WHO) list of the 17 tropical neglected diseases, it affects about 8 million people worldwide, being the majority concentrated in Latin America, where it is regarded as serious public health issue. For its treatment, there are two approved drugs, benznidazole and nifurtimox. Both of them are nitro heterocyclic compounds that eliminate the etiological agent by producing reactive oxygen species (ROS) and decreasing the parasite capability to neutralize them. Despite their established effectiveness during the acute phase of the illness, the treatment using these compounds can lead to some issues such as high toxicity, the outbreak of severe side effects, inefficacy in the chronic phase and long-term intake schemes. Thus, this report, a bibliographic review (2014-2018), aims to demonstrate the efficacy of natural products against the *T.cruzi* and show them as alternative for the current Chagas disease treatment. For this, 13 studies about this subject were found in Scopus, Scielo, Web of Science and Pubmed databases. These studies were classified in three groups: phenolic compounds (lignans and flavonoids), terpenes and essential oils. According to the information and data acquired, except astaxanthin, it was concluded that the natural products action against the disease etiological agent by decreasing the parasitemia and/or curing the experimental animals, emphasizing mainly the nanoencapsulated lychnopholide (terpene) and the essential oil extracted from *Syzygium aromaticum*, which showed highest percentages of parasitological cure. Treatments with nanoencapsulated lychnopholide at doses of 2 mg/kg/day and 5 mg/kg/day, resulted in 100% of cure rates in some treated Swiss mice groups infected with Y and CL strains. Swiss mice infected with strains Y and treated with the essential oil of *S. aromaticum*, at doses of 100 mg/kg and 250 mg/kg, obtained cure rates of 44.4% and, 22.2%, respectively.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Natural products. Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos artigos	25
Figura 2 - Fluxograma de classificação dos artigos e seus respectivos testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	26
Figura 3 – Gráfico 1: IC ₅₀ em µg/ml dos produtos naturais testados <i>in vitro</i>	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos	30
Tabela 2 - Classificação dos terpenos	32
Tabela 3 - Efeitos <i>in vivo</i> dos produtos naturais frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
Quadro 1 - Artigos selecionados para o respectivo trabalho	52

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	9
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	9
3 JUSTIFICATIVA.....	10
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1 <i>Doença de Chagas e Trypanosoma cruzi.....</i>	11
4.2 <i>Tratamento atual da Doença de Chagas e alguns ensaios clínicos.....</i>	14
4.3 <i>Produtos naturais no tratamento da Doença de Chagas.....</i>	17
5 METODOLOGIA.....	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1 <i>Seleção dos artigos sobre produtos naturais.....</i>	25
6.2 <i>Os produtos naturais, sua utilização na sociedade humana e seus efeitos anti-Trypanosoma cruzi.....</i>	27
6.3 <i>Os compostos fenólicos (lignananas e flavonoides).....</i>	29
6.3.1 <i>Flavonoides.....</i>	31
6.3.2 <i>Lignananas.....</i>	31
6.4 <i>Terpenos.....</i>	31
6.4.1 <i>Lactonas sesquiterpênicas (LS).....</i>	32
6.4.2 <i>Diterpenos.....</i>	33
6.4.3 <i>Triterpenos.....</i>	33
6.4.4 <i>Tetraterpenos.....</i>	34
6.5 <i>Óleos essenciais.....</i>	34
6.6 <i>Visão geral dos efeitos in vitro anti-Trypanosoma cruzi dos produtos naturais selecionados.....</i>	35
6.7 <i>Efeitos in vivo dos produtos naturais avaliados contra o Trypanosoma cruzi.....</i>	37
7 CONCLUSÃO.....	44
8 REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE A.....	52

1 INTRODUÇÃO

A ideia deste trabalho surgiu devido à importância de se buscar tratamentos alternativos contra a doença de Chagas. A doença de Chagas é uma infecção protozoária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, tendo como principais vetores insetos triatomíneos, os quais transmitem o parasita por suas fezes contaminadas durante o repasto sanguíneo aos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem. Atualmente, a doença afeta cerca de 8 milhões de pessoas, e é causa de morbidade e mortalidade em indivíduos de baixa renda e que vivem em condições precárias de vida (ALEXANDRE et al, 2014; SÁNCHEZ et al, 2015; ECHEVERRIA, MORILLO, 2019).

Os fármacos atuais utilizados no tratamento da doença de Chagas são nifurtimox e benznidazol. Estes apresentam muitos efeitos adversos e baixa eficácia terapêutica especialmente na fase crônica, além do tempo prolongado de tratamento (SÁNCHEZ et al, 2015).

Assim, o presente trabalho tem como tema principal os produtos naturais no tratamento da doença de Chagas e consistiu em uma revisão bibliográfica dos últimos 5 anos (2014-2018), compilando informações oriundas de artigos publicados neste período. Esta iniciativa teve por objetivo organizar e comparar os vários estudos e pesquisas sobre o assunto realizados recentemente, tornando-os mais acessíveis aos profissionais das áreas das Ciências Biológicas e da Saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Fazer uma revisão bibliográfica dos produtos naturais avaliados *in vivo* e que apresentaram atividades anti-*Trypanosoma cruzi* de artigos publicados nos últimos 5 anos (2014 – 2018).

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar uma explanação sobre as principais classes de substâncias de origem natural encontradas nos artigos;
- Indicar a ação tripanocida por concentração, dosagem e tempo de exposição de cada substância contra cepas específicas do *T.cruzi* (Colombiana, cepa Y, CL, AM14, Ninoa e RA);
- Comparar os dados e informações coletados para definir a(s) substância(s) mais eficaz(es) em uma determinada cepa.

3 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma enfermidade de caráter endêmico nos países da América Latina, sendo desde sua descoberta, negligenciada (WHO, 2012). Afetando, principalmente pessoas de baixa renda, que vivem em condições precárias de moradia em locais sem saneamento básico, fazendo com que a busca por um tratamento acessível e de baixo custo seja de necessidade imprescindível.

Os únicos tratamentos disponíveis atualmente para a doença de Chagas são por uso de fármacos de origem sintética, que são parcialmente efetivos e apresentam efeitos adversos graves (ECHEVERRIA, 2019; SÁNCHEZ et al, 2015) .

A diversidade de produtos naturais com propriedades terapêuticas pode mudar essa realidade. Produtos naturais incluem plantas, organismos marinhos, fungos ou bactérias e todos os compostos extraídos destes. Aqueles que possuem propriedades terapêuticas são utilizados desde o início da história da civilização humana e, durante muito tempo, foram o principal recurso terapêutico empregado na prevenção, tratamento e cura de distúrbios e disfunções em homens e animais. A descoberta e o isolamento dessas substâncias possibilitaram a produção de novos fármacos, mais eficazes, específicos e com menos efeitos adversos, aumentando a adesão do paciente ao tratamento (WOU, 2017).

Sendo assim, esse trabalho abordará os estudos e conhecimentos obtidos durante os últimos cinco anos sobre as atividades dos produtos naturais, descrevendo as substâncias ativas por suas classes químicas, seus modos de ação e as reações que levam a atividade anti-*T. cruzi*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma enfermidade causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cuja descoberta foi feita em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chaga (CHAGAS, 1909). Mesmo após 110 anos de sua descoberta, a doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde pública com mais de 8 milhões de pessoas afetadas pela doença, endêmica em 21 países da América Latina (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). A doença de Chagas configura-se como uma das 18 doenças tropicais negligenciadas e atualmente na América Latina os países Argentina, Brasil e México são os três com maior número de pessoas infectadas (WHO, 2012).

Apesar da doença de Chagas ser endêmica na América Latina, os padrões de migração a tornaram globalizada. Dados epidemiológicos recentes, atribuem o deslocamento de pessoas da América Latina para outras regiões do mundo sendo um dos fatores disseminadores da doença em regiões não endêmicas e sem vetores naturais, como os países da Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; PINHEIRO et al., 2017). Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 300.000 pessoas estejam infectadas, embora alguns estudos relatem 250.000 pessoas somente no Texas e, um milhão ou mais casos em todo o país (REQUENA-MENDEZ et al., 2015; HOTEZ et al., 2013). Na Europa, estima-se que só na Espanha existam cerca de 45.000 a 67.000 casos de doença de Chagas, e mais de 100.000 casos em todo o continente. Estes cálculos baseiam-se principalmente no número de latino-americanos imigrantes, separados em diferentes países de origem e destino, e a prevalência no país de origem, porque atualmente não há vigilância epidemiológica para a doença (STRASEN et al., 2014). Acredita-se que a verdadeira prevalência possa estar subestimada, pois a maioria dos portadores da doença de Chagas esteja assintomática. Assim, muitos indivíduos não têm conhecimento de que estão infectados com o *T. cruzi*, e profissionais da saúde em países não endêmicos não possuem experiência com a doença, o que dificulta o diagnóstico, a avaliação e o tratamento apropriado, além da limitação de acesso a serviços de saúde por parte de imigrantes ilegais (GASCON; BERN, PINAZZO, 2010). Apenas Espanha, França e Reino Unido tem controle e

regulamentação de doação de sangue, sendo a Espanha o país com maior densidade migratória de indivíduos oriundos da América Latina. Nos outros países europeus, os dados da prevalência da doença de Chagas são regionais e não há coleta de dados epidemiológicos, controle de bancos de sangue e assim, não há uma visão geral da doença nestes países para controle efetivo da doença de Chagas (STRASEN et al, 2013) porque a maioria dos casos são assintomáticos.

Os principais meios de infecção por *T.cruzi* são o vetorial, por ingestão oral, transfusão sanguínea, por transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (ANGHEBEN et al., 2015). O principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas nos mamíferos se dá por insetos vetores ou triatomíneos da família *Reduviidae* e ocorre por contaminação com tripomastigotas metacíclicos presentes nas suas fezes ou urina, eliminados durante ou após o repasto sanguíneo. A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre quando as fezes contendo tripomastigotas metacíclicos contaminam mucosas, conjuntivas e/ou superfícies lesadas. Estas formas evolutivas ao penetrarem no hospedeiro invadem os fagócitos sendo capazes de escapar de seus mecanismos de destruição e se transformarem em amastigotas. Após a multiplicação os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas. Posteriormente, estes são liberados por ruptura celular e alcançam o sistema circulatório, passando então a ser denominados tripomastigotas sanguíneos potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada (LANA; MACHADO, 2010) ou para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo, completando assim o ciclo evolutivo do parasito. Outro meio de transmissão que vem se destacando cada vez mais é por via oral, devido à contaminação de alimentos com as fezes dos triatomíneos e por trituração do inseto infectado durante a preparação dos alimentos, que no momento de ingestão, o contato do alimento com a mucosa bucal e no trato gastrointestinal facilita a penetração do parasita e consequente infecção (BRASIL, 2015; ALEXANDRE et al., 2014).

No Brasil, 80% da área considerada endêmica anteriormente, está sob vigilância epidemiológica, com taxas de infestação domiciliar por triatomíneos inferior a 5% recentemente (BRASIL, 2015). Os riscos de transmissão vetorial têm progressivamente diminuído, principalmente após a introdução de medidas nacionais baseadas no controle vetorial e transfusional. Estas ações bem-sucedidas empregadas no Brasil foram adaptadas às condições locais e estendidas para outros países do Cone Sul (WHO, 2012). A situação não é semelhante para casos de

infecção vertical ou congênita, que tem sido progressivamente negligenciada em detrimento dos outros meios de transmissão da doença, com estimativa de 15 mil infecções anuais somente na América Latina. No caso de transplantes de órgãos, é necessário saber o endemismo da região do doador e receptor para triagem e controle de infecção. E em ambientes laboratoriais, o uso adequado de equipamentos de segurança, o manejo adequado de materiais contaminados e outras boas práticas são efetivas na prevenção da infecção por *T.cruzi* (BRASIL, 2015). Até recentemente, a infecção por transmissão sexual em humanos não tinha sido bem esclarecida. A possibilidade deste tipo de transmissão foi então relatada por um grupo de pesquisadores, ALMEIDA e colaboradores e GOMES e colaboradores (2019) na Universidade Federal de Brasília. No qual sêmen humano de doadores infectados foi aplicado em roedores por via intraperitoneal. A partir da necropsia destes animais, a descoberta de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, muscular e da região geniturinária dos camundongos confirmaram a possibilidade de contrair a doença por via sexual. (ALMEIDA et al., 2019; GOMES et al., 2019)

A doença de Chagas se manifesta em duas fases evolutivas: aguda e crônica. Na fase aguda, estão presentes sintomas inespecíficos, e que podem ser confundidos com manifestações clínicas de outras enfermidades, como febre, aumento ganglionar e hepatoesplênico e mal-estar geral. No entanto, em alguns casos sinais peculiares desta fase são determinantes para o diagnóstico, que inclui o chagoma, inchaço produzido por inflamação no local de picada do inseto vetor e o sinal de Romaña, edema periorbital quando o local de entrada do parasita ocorre na mucosa ocular (RASSI, 2010). O tempo de duração é de uma a duas semanas, com parasitemia elevada, e desaparecimento total dos sintomas de 2 a 3 meses após a infecção inicial. Como geralmente, a maioria destes pacientes em quadro clínico agudo são assintomáticos, estes facilmente evoluem para a fase crônica da doença (RASSI, 2010). Com parasitemia baixa, mas sorologia positiva para *T.cruzi*, a fase crônica se manifesta anos ou décadas após a aguda. A maioria dos indivíduos crônicos não manifestam nenhuma sintomatologia e exames de imagem são incapazes de detectar alguma lesão nos órgãos dos mesmos, permanecendo indefinidamente em um período crônico indeterminado. Porém, indivíduos podem evoluir para fase crônica sintomática consequente das reações imunes e inflamatórias com desenvolvimento de lesões que alteram a forma e fisiologia do

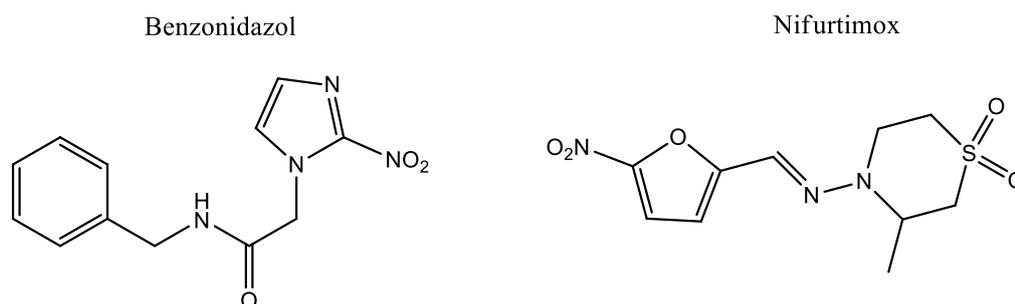
coração e dos órgãos que compõem o trato gastrointestinal (megacólon e/ou megaesôfago), ou podem desenvolver a forma mista com alterações cardíacas e gastrointestinais (RASSI, 2010).

A doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das doenças tropicais negligenciadas juntamente com leishmaniose, filariose e hanseníase, afetando principalmente indivíduos em situações precárias econômicas e sociais, por exemplo baixo e/ou nenhum acesso a saneamento básico e condições de pobreza extrema (SANGENITO et al., 2019). As questões de saúde associadas a esta doença, como a redução da produtividade e mortalidade dos trabalhadores, têm um fardo econômico significativo que representa uma perda de mais de meio milhão de anos de vida ajustados por incapacidade e um custo médio anual de 7,2 bilhões de dólares por ano (CONNERS et al, 2016).

4.2 Tratamento atual da Doença de Chagas e alguns ensaios clínicos

O tratamento convencional da doença de Chagas é feito por administração de dois fármacos sintéticos com reconhecida eficácia, o nifurtimox e o benznidazol. A segunda opção de tratamento, o nifurtimox (Lampit, Bayer[®]) teve sua comercialização interrompida no Brasil na década de 80 (COURA; DE CASTRO, 2002), embora continue sendo produzido em El Salvador, pela Bayer[®], doado à OMS e usado em outros países endêmicos da América Latina. O benznidazol foi sintetizado pelo laboratório Roche, na Suíça, e seus direitos de fabricação cedidos ao Laboratório farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) em 2003. O LAFEPE tinha matéria-prima residual [Ingrediente Farmacêutico Ativo (API)] fornecido pela Roche. Como foi necessário produzir API-BZ localmente, a fim de garantir o fornecimento adequado, o Ministério da Saúde do Brasil negociou com o LAFEPE para produção da matéria-prima para a empresa privada local Nortec. LAFEPE foi o único produtor de benznidazol no mundo até 2011, quando a ausência da certificação para o Boas Práticas de Fabricação (GMP) para produção de benznidazol emitida por a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) destacou a impossibilidade de comercialização do medicamento por meio da estratégia Pan-Americana Organização da Saúde (OPAS), o principal mecanismo de aquisição para países endêmicos. (PINHEIRO et al., 2017). O benznidazol e o nifurtimox são compostos nitro-heterocíclicos. O primeiro contém um grupo nitro ligado ao anel imidazólico e, o

segundo, o grupo nitro é ligado ao anel furânico. Ambas as substâncias atuam como pró-fármacos, devendo ser ativadas por nitrorredutases para que possam exercer seus efeitos citotóxicos no *T. cruzi* (WILKINSON; KELLY, 2009). O mecanismo de ação desses fármacos ainda não foi completamente elucidado, mas sabe-se que atuam por estresse oxidativo, pela formação de espécies reativas de oxigênio e que produzem intermediários altamente eletrofílicos que podem afetar várias moléculas na célula.



Porém, os índices de cura desses fármacos variam muito e são mais eficazes contra os parasitos na fase aguda da doença com taxas entre 65 a 80 %, sendo utilizados na fase crônica somente com o objetivo de diminuir a parasitemia e evitar que ocorram lesões de órgãos vitais (COURA & CASTRO, 2002; SANCHÉZ et al. 2015). Na fase aguda, a parasitemia é maior, e tanto nifurtimox quanto o benznidazol combatem as formas sanguíneas de maneira adequada, e apenas o nifurtimox tem uma certa eficácia contra ninhos parasitários teciduais (COURA & CASTRO, 2002; SANCHÉZ et al. 2015). Entretanto algumas questões com relação ao uso de nifurtimox e benznidazol tornam-se empecilhos à terapêutica: seu esquema de tratamento prolongado e inúmeras e significativas reações adversas (URBINA, 2001; COURA & CASTRO, 2002).

Entretanto, as razões para as diferenças na eficácia do benznidazol quando administrado na fase aguda ou crônica ainda não estão totalmente claras, mas alguns pesquisadores sugerem que possivelmente estão relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco, como a meia-vida relativamente curta e a limitada penetração tecidual (URBINA, 2009). Os resultados obtidos no BENEFIT, um estudo randomizado multicêntrico realizado com pacientes na fase crônica da doença de Chagas e portadores de cardiopatia, demonstraram que o tratamento com benznidazol reduz significativamente a detecção de parasitas circulantes, ainda que não cause impacto na progressão clínica cardíaca da doença (MORILLO et al., 2015). Apesar do grande número de moléculas avaliadas

experimentalmente *in vitro*, poucos são os compostos que apresentaram capacidade de induzir cura parasitológica ou interferir na evolução da doença em modelos animais. Os estudos pré-clínicos realizados ao longo dos anos identificaram algumas classes farmacológicas e estratégias terapêuticas que são especialmente promissoras. Dentre essas prováveis alternativas, alguns compostos destacam-se por serem capazes de induzir cura parasitológica na infecção experimental, como os inibidores da biossíntese de ergosterol (MOLINA et al., 2000; URBINA; DOCAMPO, 2003), derivados nitroimidazólicos (BAHIA et al., 2012) ou de interferir no curso da infecção, como as arilimidamidas (SOEIRO; CASTRO, 2013), inibidores da tripanotona redutase (BLAU et al., 2013). Dentre os inibidores da biossíntese de ergosterol, destacam-se o posaconazol, o ravuconazol e o E1224, pró-fármaco do ravuconazol como os compostos que apresentaram maior atividade em ensaios pré-clínicos. Esses fármacos foram desenvolvidos originalmente como antifúngicos, afetando a síntese de ergosterol, o esteroide mais abundante na membrana celular de *T. cruzi* e indispensável à proliferação desse protozoário. O posaconazol e o E1224 foram avaliados em ensaios clínicos de fase II. Entretanto, os resultados de ambos os ensaios evidenciaram que apesar do posaconazol e E1224 apresentarem perfil favorável de segurança e toxicidade, falharam em induzir cura parasitológica em cerca de 90% dos pacientes tratados (MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2014; TORRICO et al., 2018). Um dos medicamentos “redescoberto” pelo Drugs for Neglected Tropical Diseases *initiative* (DNDi) para a doença de Chagas é o nitrocomposto fexinidazol. Bahia e colaboradores (2012) confirmaram que o fexinidazol é eficaz na cura da infecção experimental por *T. cruzi* em modelo murino, nas fases aguda e crônica da doença, incluindo infecções induzidas por cepas resistentes ao benznidazol. O mecanismo de ação do fexinidazol não está estabelecido, porém sabe-se que ele é um pró-fármaco com rápida metabolização. Os ensaios clínicos com o posaconazol e o E1224 confirmaram o potencial do benznidazol como um fármaco capaz de induzir cura parasitológica em pacientes com doença de Chagas crônica indeterminada (ou a ausência de falha terapêutica, mais precisamente). Embora a principal desvantagem do benznidazol seja seu perfil de toxicidade, ainda há uma falta de conhecimento dos fatores de risco a serem considerados e do impacto do tempo e da concentração na toxicidade. Muitos dos efeitos adversos graves, pelo menos teoricamente, poderiam estar relacionados ao regime de dosagem, que foi estabelecido empiricamente há mais de 40 anos.

Assim, considerando as dificuldades encontradas no tratamento da doença de Chagas, a busca por novos medicamentos permanece.

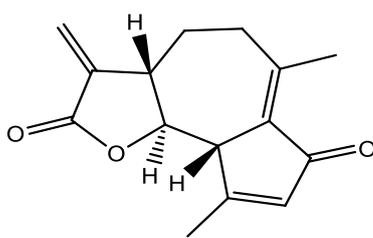
4.3 Produtos naturais no tratamento da Doença de Chagas

A natureza é uma fonte inesgotável de recursos para os humanos e outros animais, ajudando-os na sua conservação e bem-estar. Os produtos naturais se inserem nesse contexto, como fontes de cura para moléstias e enfermidades, sendo usados a mais de mil anos na medicina (VAZ, 2017; WOU, 2017).

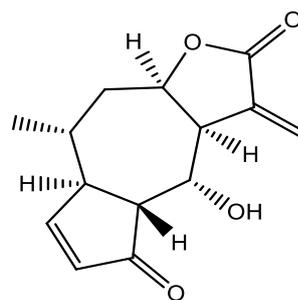
O aumento recente de interesse na busca de fármacos oriundos de produtos naturais se deve aos resultados insatisfatórios dos meios alternativos de síntese de fármacos, o que inclui alterações químicas conformacionais. As vantagens de produtos naturais levam em consideração a disponibilidade de uma gama imensa de moléculas diferentes e bioativas, que servem como protótipos para novas substâncias, e aprimoramento das características farmacocinéticas das que já foram estudadas. Além disso, associar todo o conhecimento adquirido ao objetivo de melhorar os processos de detecção, isolamento e elucidação estrutural dessas moléculas em extratos vegetais e de outros produtos naturais (BUTLER, 2004; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Atualmente, em paralelo ao campo da moderna química farmacêutica, os estudos de busca de novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas e das leishmanioses no Reino Vegetal e Fungi tem trazido novas e boas perspectivas, devido à abundância de famílias de compostos que exibem grande conectividade molecular e estereoquímica bem definidas (SWINNEY; ANTONY, 2011; KIM; PARK, 2014).

Há várias substâncias naturais com ação terapêutica e que demonstraram ação tripanocida. As originadas de plantas são geralmente metabólitos secundários, que por sua vez são compostos químicos produzidos pelas plantas, não essenciais para o seu metabolismo e processos vitais, mas que adicionalmente apresentam função protetora contra agentes patogênicos, 'vírus', 'bactérias', 'fungos' e contra outras espécies vegetais, agindo como promotores da seleção natural e sobrevivência dessas plantas (FUMAGALI et al, 2008; VAZ, 2008). Os metabólitos secundários são classificados em alcaloides, flavonoides, terpenos e quinonas (FUMAGALI et al, 2008). Os derivados do ácido mevalônico, como as lactonas sesquiterpênicas, tem sido considerados como fontes promissoras de fármacos anti-

T. cruzi, já que apresentam alta toxicidade para diferentes formas parasitárias do protozoário e baixa toxicidade em relação às células do hospedeiro mamífero (VAZ, 2008). As lactonas sesquiterpênicas são sesquiterpenóides que possuem um esqueleto de 15 átomos de carbonos, derivados de hemiterpenos (pirofosfatos de isopentenila, IPP, e dimetilalila, DMAPP). Estas substâncias foram identificadas em plantas da família *Asteraceae* pertencentes aos gêneros *Lychnophora*, *Mikania*, *Artemisia*, *Eupatorium* e *Neurolaena*, e em outras várias plantas das famílias *Acanthaceae*, *Apiaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae* e *Rutaceae* (SAEIDNIA; GOHARI; HADDADI, 2013; JIMENEZ et al, 2014). A deidroleucodina extraída da *Artemisia douglassiana* e a helenalina da *Gaillardia megapotamica*, são lactonas sesquiterpênicas citotóxicas capazes de ativar o processo apoptose em células protozoárias por alquilação do material genético e aumentar o estresse oxidativo (JIMENEZ, 2014).



Deidroleucodina

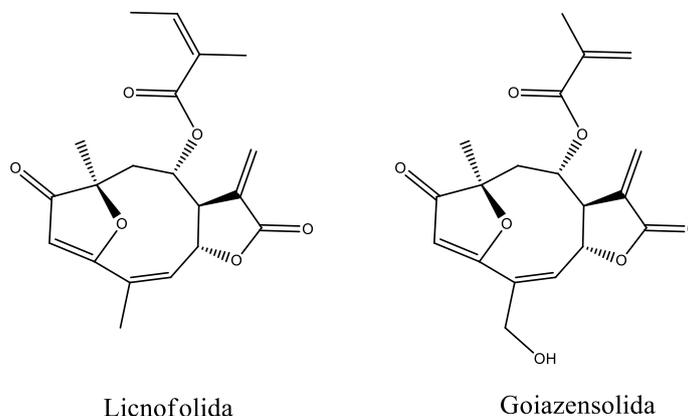


Helenalina

Oliveira et al., 1996, avaliaram a atividade anti-*T. cruzi* de 45 espécies vegetais pertencentes à família *Asteraceae*. Destas, nove foram ativas contra o *T. cruzi*, das quais três pertenciam ao gênero *Lychnophora*, de ocorrência apenas no Brasil e popularmente conhecidas como "arnica brasileira", "arnica" ou "arnica da serra" e usadas na medicina popular brasileira para tratar inflamação, dor, reumatismo, hematomas e picadas de insetos (OLIVEIRA et al, 1996; SAÚDE et al., 1998).

A realização dos testes *in vivo* para avaliação da eficácia terapêutica em modelo murino, experimentalmente infectados por *T. cruzi*, foi motivada pelos resultados *in vitro* obtidos por Oliveira (et al, 1996) e Saúde, Raslan e Souza Filho (1998) que realizaram o estudo fitoquímico das espécies *L. passerina*, *L. trichocarpa* e *L. pinaster*. Dentre os constituintes químicos isolados destas espécies, destacaram-se as lactonas sesquiterpênicas goiazensolida e licnofolida. A licnofolida, obtida de *L. trichocarpa* inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas

sanguíneos na concentração de 150 µg/ml (OLIVEIRA et al., 1996; SAÚDE; RASLAN; SOUZA FILHO, 1998). De *L. passerina* isolou-se a goiazensolida que inibiu 100% dos tripomastigotas sanguíneos da cepa Y na concentração de 240 µg/ml (OLIVEIRA et al., 1996).



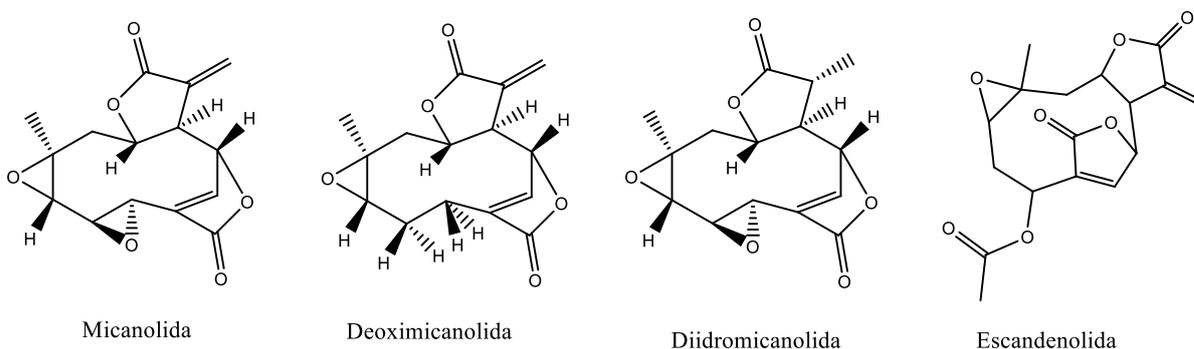
A licnofolida foi testada *in vivo* pelo grupo de pesquisa da Escola de Farmácia da UFOP. Uma formulação farmacêutica nanoestruturada contendo licnofolida foi desenvolvida com o intuito de superar obstáculos apresentados pela substância, tais como baixa solubilidade, propriedade farmacocinética desfavorável (BRANQUINHO et al., 2017), cardiotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (BRANQUINHO et al., 2017). A licnofolida veiculada em nanocápsulas oriundas de dois tipos de polímeros foi administrada por diferentes vias e diferentes regimes terapêuticos, a camundongos infectados com cepas de *T. cruzi* com diferentes perfis de resistência/susceptibilidade, nas fases aguda e crônica da infecção (BRANQUINHO et al., 2014; MELLO et al., 2016).

As nanocápsulas foram capazes de liberar de modo controlado a licnofolida, que foi capaz de eliminar o *T. cruzi*, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção. A eficácia terapêutica foi de 30 a 66% de cura parasitológica e sorológica em ambas as fases da infecção com cepa CL e Y de *T. cruzi* (BRANQUINHO et al., 2014; MELLO et al., 2016). Dados obtidos e ainda não publicados, mostraram cura de 50 a 100% dos animais infectados com cepa resistente ao benznidazol e nifurtimox (VL-10) nas fases aguda e crônica, o que representa uma perspectiva positiva para o tratamento da doença de Chagas humana.

Outra lactona sesquiterpênica avaliada *in vivo* pelo nosso grupo de pesquisa foi a goiazensolida, isolada de *Lychnophora passerina*. Solução de goiazensolida foi administrada por diferentes vias e doses em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. Na avaliação pós-tratamento em animais infectados

pelas cepas CL e Y, foi observada uma diminuição significativa da parasitemia quando comparados ao grupo controle não tratado. A taxa de sobrevivência dos camundongos infectados com cepa Y e tratados com goiazensolida foi de 100% na dose de 5,0 mg/kg/dia oral, e para os animais tratados com benznidazol na dose de 100 mg/kg/dia oral, foi de 87,5%. Nenhum dos camundongos foi considerado curado. Este resultado, em particular, aliado aos demais, representaram uma boa perspectiva do uso da goiazensolida para o tratamento da doença de Chagas a ser explorada (MILAGRE, 2018).

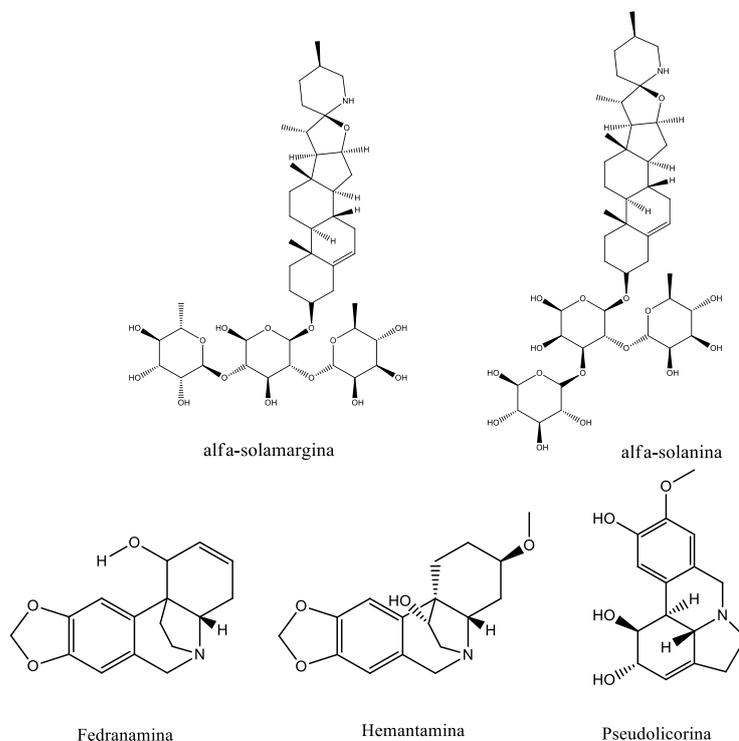
As lactonas sesquiterpênicas micanolida, desoximicanolida, diidromicanolida e escandenolida, obtidas de plantas do gênero *Mikania*, mostraram efeito significativamente similar contra as formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas, excetuando a última lactona sesquiterpênica citada, que apresentou baixo índice de seletividade para as formas parasitárias e baixa eficácia contra o *T.cruzi* (LAURELLA et al, 2017).



Os sesquiterpenos aromadendranos, cariofilenos, coloratanas e drimanas, isolados de *Pogostemo cablin*, e o de origem marinha como o elatol, substância extraída de algas brasileiras da espécie *Laurencia dendroidea*, apresentaram efeitos semelhantes às lactonas contra o *T.cruzi* (SAEIDNIA; GOHARI; HADDADI, 2013).

Pertencente à classe dos alcaloides esteroidais, os glicoalcaloides α -solamargina e α -solanina eliminaram em experimentos *in vitro* os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* e os helmintos *Strongyloides stercoralis* e *Schistosoma mansoni*. Acredita-se que α -solamargina e α -solanina se ligam às mucinas, proteínas de membrana do parasito, porém o mecanismo de ação específico ainda não foi definido.

Os alcaloides Fedranamina, hemantamina, pseudolicorina, e outras várias provenientes da *Phaedranassa dubia*, foram efetivas contra *T.cruzi*, *L.donovani*, *P.falciparum* e *T.b.rhodesiense* (VAZ, 2017; DURANGO et al,2008).

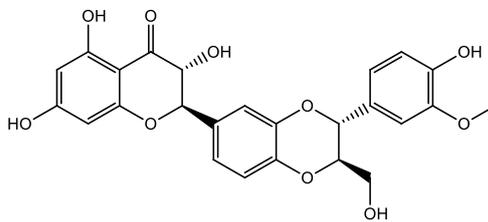


O flavonoide quercetina, obtido de várias espécies vegetais foi testada *in vitro* contra cepas de *T. cruzi*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*, e por causa de atividades anti-inflamatória e anti-oxidante, os flavonoides tem agregado interesse na área científica.

As lecitinas se ligam aos açúcares de membrana dos parasitas (*T. cruzi*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*), interferindo na fisiologia deles. Este mecanismo de ação acontece por parte daquelas lecitinas extraídas da soja, *Glycine maxe Ricinus communis* (VAZ, 2017).

Das sementes de *Silybum marianum*, planta da família *Asteraceae*, foi extraído o complexo de isoflavolignan silimarina, composto por silibinina (flavolignana) e pelos esteroisomeros de silibinina: isosilibinina, silicristina, isosilicristina, silidianina e silimonina. Torchelsen, 2019, testou pela primeira vez a atividade *in vitro* e *in vivo* de silibinina e de silibinina associada a benzimidazol (SLB+BZ) frente a cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados *in vivo* em camundongos demonstraram que a silibinina em monoterapia não foi capaz de controlar a parasitemia e a mortalidade dos animais. As avaliações parasitológicas mostraram 100% de negatividade na maioria dos grupos de animais tratados com combinação

de drogas. Diante disso, pôde-se constatar que a associação de compostos seja uma alternativa promissora para o tratamento da doença de Chagas.



Silibinina

5 METODOLOGIA

Realizou-se uma busca na literatura científica disponível nas bases de dados NCBI – PubMed, Scielo, Scopus e Web of Science no período de 4 meses, contemplando estudos de 2014 a 2018. Foram consultados artigos originais sobre o tema em língua portuguesa, inglesa e espanhola.

A busca por estes artigos fez-se na área de busca avançada dos bancos de dados especificados acima, por cruzamentos de palavras-chaves como se segue:

- natural products x Chagas disease x *in vivo*;
- natural products x Chagas disease x treatment;
- natural products x *T.cruzi* x efficacy;
- Chagas disease x natural products x dogs;
- Chagas disease x natural products x rats;
- Chagas disease x natural products x mouse.

Critérios de inclusão: Na triagem dos artigos válidos para utilização no trabalho, utilizou-se como fatores de inclusão artigos em línguas portuguesa, espanhola e inglesa; pesquisas de produtos naturais, independente da origem, que foram testados *in vivo*, nos últimos 5 anos; estudos *in vivo* feitos em modelos experimentais não humanos, como cães, camundongos e ratos; produtos naturais livres e em formulações farmacêuticas e em combinação com outros medicamentos no tratamento da doença, e com efeitos apenas contra o *Trypanosoma cruzi*.

Os artigos selecionados na pesquisa foram filtrados tendo como referência o ano de publicação, grupo experimental, e o composto natural isolado. E para facilitar as buscas, utilizou-se também como palavras-chaves, classes de compostos naturais em seus respectivos termos em inglês: Alcaloides (Alcaloids), flavonoides (Flavonoids), terpenos (Terpenes), óleos essenciais (Essential oils) e saponinas (Saponins).

Critérios de exclusão: Os artigos que não foram incluídos no trabalho, foram os que apresentaram as seguintes particularidades: ser estudo somente *in vitro*; ser revisão bibliográfica; ter sido publicado fora do período do tempo determinado; ser estudos sobre substâncias sintéticas e seus derivados; estudos *in silico*; e pesquisas

que envolvessem extratos vegetais e substâncias naturais que não atuem diretamente contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

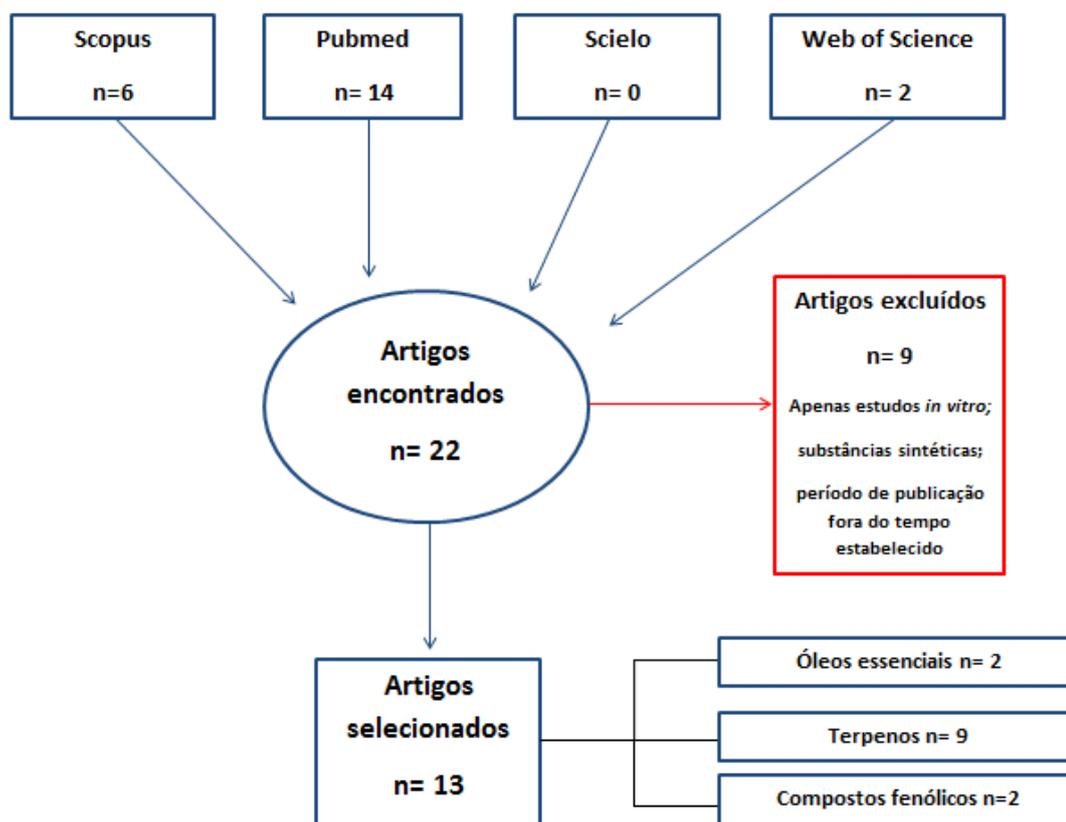
Após aplicação dos métodos de inclusão e exclusão, os artigos elencados e que se encaixaram no perfil deste trabalho, foram analisados em relação aos compostos utilizados, e estes compostos foram distribuídos em grupos de produtos naturais: terpenos (óleos essenciais), flavonoides, alcaloides, ácidos graxos, glicosídeos, quinonas, lignanas e xantonas. Depois do agrupamento dos compostos, analisamos suas ações *in vitro*, a partir das dosagens destes compostos, do período de tempo de teste, das Concentrações que inibem 50% (IC50) de cada um, e das linhagens de células utilizadas. E *in vivo*, onde foi considerado relevante, o animal experimental utilizado (camundongo, rato e/ou cães), as dosagens dos produtos testados e as comparações entre grupos controle e grupos de testes. Todos estes parâmetros serviram para se definir a eficácia dos compostos naturais avaliados nos artigos selecionados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção dos artigos sobre produtos naturais

Do total de artigos encontrados nas bases de dados analisadas (Pubmed, Web of Science, Scielo e Scopus), foram selecionados 13 artigos, excluindo os que apresentaram os critérios de exclusão definidos na metodologia, como artigos com testes apenas *in vitro*, substâncias sintéticas, período de publicação fora do estabelecido e sobre outras doenças parasitárias (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos artigos



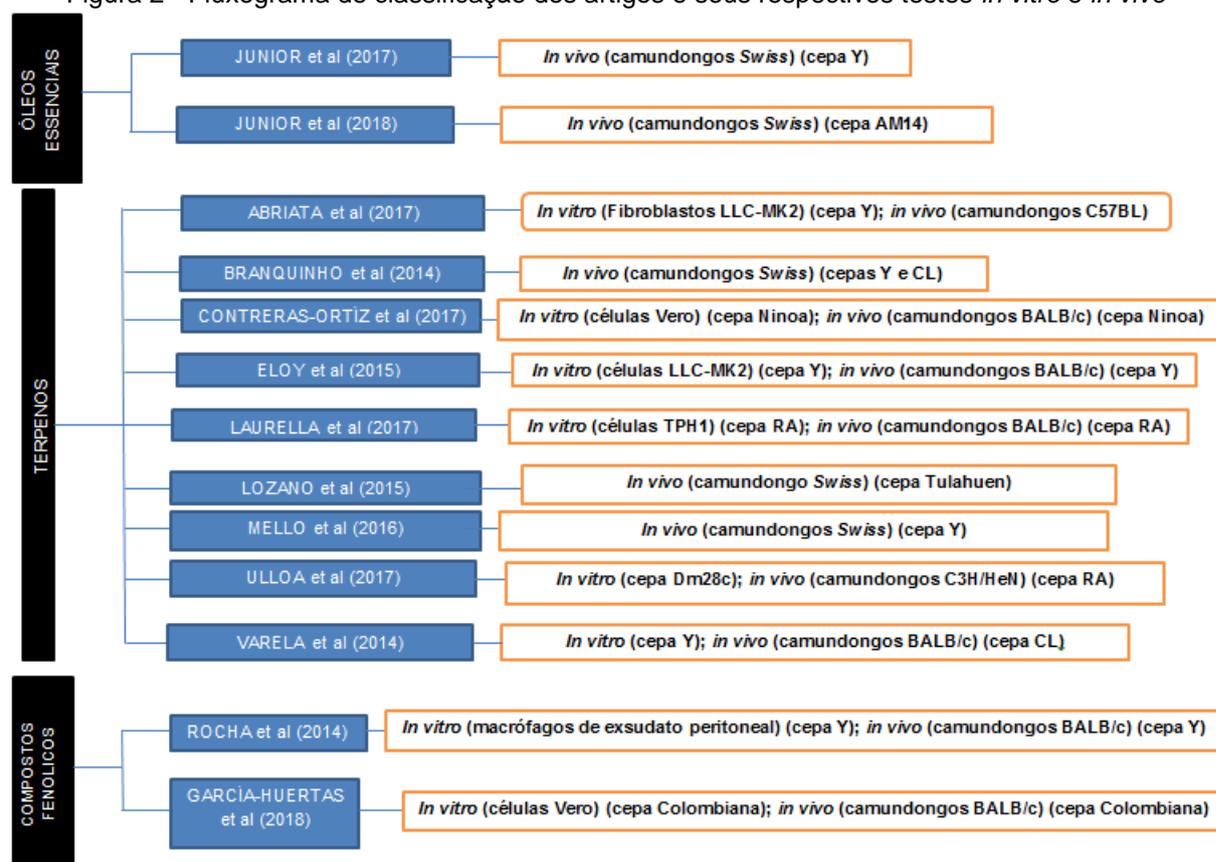
Fonte: Autoria própria (2019)

Os artigos selecionados foram separados de acordo com a classe de metabolitos secundários estudados (Figura 2). Dois artigos abordaram os compostos fenólicos: Rocha e colaboradores, 2014, informou sobre flavonoides diméricos e García-huertas e colaboradores, 2018, sobre um fenilpropanóide isolado de *Piper jericóense*.

Nove artigos sobre terpenos: Abriata e colaboradores, 2017 e Eloy e colaboradores, 2015, abordaram sobre ácido ursólico em formulações farmacêuticas contra o *T.cruzi*; Branquinho e colaboradores, 2014, Laurella e colaboradores, 2017, Mello e colaboradores, 2016, Ulloa e colaboradores, 2017, relataram sobre lactonas sesquiterpênicas; Lozano e colaboradores, 2015 informou sobre diterpeno obtido da *Salvia gilliesii* e outro com atividade tripanocida descrito por Varela e colaboradores, 2014, obtido da *Aristeguietia glutinosa*; e por fim, os efeitos da astaxantina em camundongos infectados na fase aguda descrito por Contreras-ortíz e colaboradores, 2017.

Dois estudos do mesmo autor, Zanusso Junior e colaboradores, 2017; 2018, trataram sobre óleos essenciais.

Figura 2 - Fluxograma de classificação dos artigos e seus respectivos testes *in vitro* e *in vivo*

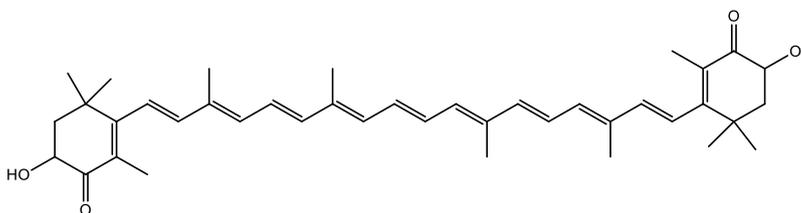


Fonte: Autoria própria (2019)

Os camundongos utilizados para testes foram principalmente das linhagens Swiss (5 estudos) e BALB/c (6 estudos), apenas um utilizou o camundongo C3H/HeN e outro C57BL/6. As cepas do *T.cruzi* utilizadas foram principalmente a Y (6 estudos), as outras utilizadas foram as AM14 (1 estudo), CL (2 estudos), Ninoa (1

estudo), RA (1 estudo), Tulahuen (1 estudo), C3H/HeN (1 estudo) e a Colombiana (1 estudo).

Para testes de citotoxicidade utilizaram-se de células Vero, fibroblastos LLC-MK2, células TPH1 e macrófagos de exsudato peritoneal. Nos estudos que foram realizados os testes de citotoxicidade, a maioria resultou em concentrações altas em comparação às concentrações de ação tripanocida dos fármacos padrões para tratamento da doença de Chagas (benznidazol e nifurtimox), fato este que facilitou a pesquisa destes produtos naturais em testes *in vivo*. Um caso em exceção foi o da astaxantina, cujas concentrações que mostraram citotoxicidade foi de 20 a 30 µg/100 µl em células Vero, enquanto com o nifurtimox fármaco para comparação, obteve-se citotoxicidade de 400 µg/100 µl.



Astaxantina

6.2 Os produtos naturais, sua utilização na sociedade humana e seus efeitos anti-*Trypanosoma cruzi*

Produtos naturais são definidos como toda substância de origem biológica, proveniente e produzida por organismos vivos. E devido à existência de múltiplos organismos vivos, desde bactérias até os mais complexos vertebrados e vegetais, os produtos naturais possuem uma grande diversidade na natureza e o número destes compostos excede em quantidade aos de moléculas sintéticas e semissintéticas produzidas pelo homem (WOU, 2017).

A evolução e a seleção natural proveram a estas substâncias funções biológicas e estruturais únicas, o que possibilitou sua utilização para diversos fins. Sendo utilizadas como meios de tratamento de doenças na medicina tradicional e moderna, na fabricação de medicamentos, cosméticos, produtos sanitários, agroquímicos e conservantes de alimentos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; WOU, 2017).

A gama de moléculas complexas de origem natural tem sido um dos focos principais na descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas como a doença de Chagas, principalmente considerando as falhas do tratamento convencional (BUTLER, 2004; WOU, 2017; SCRIPPS, 2019). A diversidade de combinações moleculares e o delineamento de grupos funcionais químicos dos compostos naturais são cruciais na síntese de novos produtos na área medicinal (VAZ, 2017). Para se entender a importância deste fato, dados de pesquisas revelaram que da década de 1980 até os dias atuais, 80% das 99 substâncias simples usadas como medicamentos no tratamento do câncer foram sintetizadas a partir de produtos naturais, e que cerca de 40% da composição química de produtos naturais está ausente da base química de muitos compostos utilizados na medicina atual. Apesar da relevância destes compostos na descoberta de medicamentos, e de ser uma fonte com perspectivas inovadoras futuras, o uso destes produtos naturais ainda apresenta alguns desafios como a dificuldade em se extrair compostos específicos de extratos complexos, de se modificar a estrutura química, e de se sintetizar estas moléculas em escala industrial (SCRIPPS, 2019).

Existem muitos exemplos de produtos naturais utilizados na área médica. A estreptomicina, um dos importantes antibióticos usados na clínica, foi obtida da bactéria *Streptomyces griseus*, e serviu de base para a síntese e descoberta de outros compostos antimicrobianos. No reino Fungi, o gênero *Penicillium* forneceu substâncias como a penicilina e a griseofulvina, também antimicrobianos que revolucionaram a prática médica. Além de drogas anticâncer, antimaláricas, analgésicas e anti-hipertensivas que foram extraídas de vegetais e de animais (CALIXTO, 2012; WOU, 2017).

Há dois tipos de produtos naturais: os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os *metabolitos primários* são compostos envolvidos em processos vitais na manutenção dos organismos vivos, como na produção energética, no desenvolvimento estrutural, no crescimento, e no processo de respiração. E possuem uma ampla distribuição entre os seres vivos. Os metabólitos primários são os constituintes das principais macromoléculas biológicas, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Por outro lado, os *metabolitos secundários* são compostos que não estão envolvidos diretamente com estes processos vitais e não são indispensáveis para sobrevivência. No entanto, contribuem para aumentar a sobrevivência dos seres vivos. Os metabólitos secundários não possuem

distribuição ampla entre os seres vivos como os primários, e são específicos de uma família, gênero ou espécie, sendo utilizados para classificação taxonômica (WOU, 2017; PERES, 2017).

Os produtos naturais com atividade tripanocida usados para testes em pesquisas são em sua maioria metabólitos secundários originários de plantas e extratos vegetais. Apesar de não estarem associados diretamente a processos vitais das plantas, os metabólitos secundários apresentam importante papel na interação das plantas com o ambiente externo, por ações defensivas contra patógenos, predadores, outras plantas e danos físicos causados por radiação e alterações de temperatura. Além de auxiliarem na atração de insetos polinizadores, por permitir a composição de cores atrativas de flores e folhas (UCHYAMA, 2009; PERES, 2017; VAZ, 2017).

Além de desempenhar estas ações relevantes para manter a integridade das plantas, estes metabólitos possuem efeitos terapêuticos no tratamento de patologias humanas, os quais, já são conhecidos há longo tempo por fazerem parte da tradição cultural de muitos povos ao redor do mundo, principalmente de comunidades mais carentes (VAZ, 2017). Antes considerados como substâncias inúteis para o metabolismo vegetal, hoje em dia é de reconhecimento da ciência, as ações destes compostos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários como o *T.cruzi*. Este fato implica na importância dos metabólitos secundários como alternativa ao tratamento convencional de doenças parasitárias negligenciadas.

Os principais metabólitos secundários originários de vegetais são os alcaloides, os compostos fenólicos e os terpenos. Suas principais vias de biossíntese são as vias do mevalonato, do ácido chiquímico e a partir do piruvato e 3-fosfoglicerato (PERES, 2017).

Neste trabalho, são abordados apenas duas classes principais de produtos naturais, os flavonoides e os terpenos, já que estas foram as únicas encontradas nos artigos selecionados, e o grupo dos óleos essenciais, dando uma explicação da presença destes compostos na natureza, sua estrutura química e a utilização destes contra o *T.cruzi*.

6.3 Os compostos fenólicos (lignanas e flavonoides)

Os compostos fenólicos são as substâncias que possuem maior distribuição no reino vegetal. Tem a função de proteger as plantas contra danos externos, como radiação UV e contra infecções por vírus, bactérias e fungos e tem ação atrativa para insetos polinizadores, já que conferem cores atrativas às flores (PERES, 2017; MARTINS, 2012). Possuem em sua estrutura básica anéis aromáticos substituídos por hidroxila, os quais conferem a essas substâncias efeitos antioxidantes (MARTINS, 2012).

Como a classe dos compostos fenólicos é extensa, eles são classificados considerando-se a cadeia carbônica principal, como é mostrado na Tabela 1 (MARTINS, 2012):

Tabela 1 - classificação dos compostos fenólicos

ESTRUTURA	CLASSE
C6	Fenóis
C6-C1	Ácidos hidroxibenzóicos
C6-C3	Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Benzofenonas e Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenzenos e Antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonóides
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados ou proantocianidinas

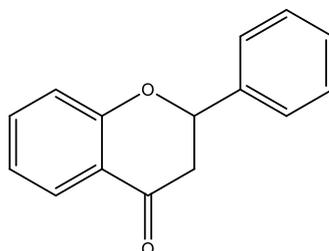
C6 (anel benzênico)

Fonte: Martins (2012)

A biossíntese dos compostos fenólicos é feita por duas vias distintas, a via do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico. Sendo a via do ácido chiquímico a principal, e na qual se formam os primeiros compostos fenólicos, os fenilpropanóides, a partir do aminoácido fenilalanina, e que darão forma a outros compostos mais complexos (PERES, 2017).

6.3.1 Flavonoides

Flavonóides tem a estrutura básica de dois anéis aromáticos conectados por um anel pirano (MOREIRA, 2013).



Estrutura básica dos flavonóides

Os flavonoides estão presentes em frutas, cereais, chás, vinhos e outros. São classificados em flavanonas, flavonóis, flavonas, antocianidina, flavanóis e isoflavonas (DUTRA, 2009; NABAVI et al, 2017;).

Os flavonoides por serem compostos fenólicos, biologicamente atuam como antioxidantes, mas também tem sido relatadas ações antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiparasitárias (MARTINS, 2012; NABAVI et al, 2017).

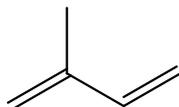
Sua ação antiparasitária tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* contra o *T.cruzi* (NABAVI et al., 2017).

6.3.2 Lignanas

As lignanas são polímeros de fenilpropanóides, e assim como tantos outros metabolitos secundários têm ação protetora contra potenciais patógenos que acometem as plantas. São mais comuns em plantas do gênero *Piper* (SOUZA et al, 2012; LAURENTIZ et al, 2015). Muitas espécies de plantas incluídas neste gênero apresentaram efeitos contra o *T. cruzi*, por exemplo, *P. heterophyllum*, *P. solmsianum*, *P.aduncum*, e em pesquisa recente da *Piper jericóense* (GARCÍA-HUERTAS et al, 2018).

6.4 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides são metabolitos secundários formados por unidades isoprenóides, estruturas básicas constituídas de 5 átomos de carbono (hemiterpenos). (BERGAMASCHI, 2017; FELIPE, BICAS, 2017).



Unidade isoprenóide

Os terpenos são sintetizados nas plantas por duas vias diferentes, a primeira é a via do ácido mevalônico ou mevalonato, nesta via, três moléculas de acetil- CoA se unem e, após algumas etapas, originam o ácido mevalônico. Então, por reações sequenciais se forma o difosfato de isopentenila (IPP). A segunda via de biossíntese é a do metileritritolfosfato, na qual, este é sintetizado por condensação do gliceraldeído-3-fosfato com piruvato, e que posteriormente origina o difosfato de dimetilalila (DMAPP) que é um isômero do IPP. O DMAPP se converte livremente em IPP, e ambos os compostos são a base para a construção dos terpenos (MARTINS, 2012; FELIPE, BICAS, 2017).



O número em unidades isoprenicas definirá a classificação dos terpenos (Tabela 2) em hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos ou carotenoides (BERGAMASHI, 2017; FELIPE, BICAS, 2017; MARTINS, 2012).

Tabela 2 - Classificação dos terpenos

Terpenos	Unidades isoprenicas	Átomos de Carbono
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Carotenóides	8	40
Poli-isopreno (Borracha)	>100	>500

Fonte: Bergamaschi (2017)

6.4.1 Lactonas sesquiterpênicas

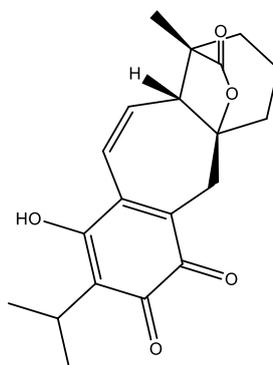
O grupo das lactonas sesquiterpênicas é o mais extenso, abrangendo mais de 5.000 estruturas e estando presente em várias famílias das angiospermas

(MARTINS, 2012; CHATUVERDI, DWIVED, MISHRA, 2015; WILDNER, 2016). As lactonas sesquiterpênicas são oriundas da ciclização de três unidades isoprênicas com um éster cíclico contendo 5 carbonos (γ -lactona) (WILDNER, 2016). Estes metabólitos secundários são, portanto, agrupados segundo o número de carbonos inseridos na ciclização.

Apesar de serem encontradas em várias famílias de plantas, as lactonas sesquiterpênicas estão mais concentradas na família das *Asteraceae*, com mais de 3000 estruturas relatadas (WILDNER, 2016). O gênero *Mikania* é um dos muitos gêneros inseridos nesta família e que tem em sua composição lactonas sesquiterpênicas com interessante atividade anti-*T.cruzi* e anti-*Leishmania braziliensis*.

6.4.2 Diterpenos

Os diterpenos são aqueles que possuem em sua estrutura química 4 unidades isoprênicas. A 5-epi-icetexona é um diterpeno extraído da *Salvia gilliesii* e que possui ação contra o *T.cruzi* (SANCHEZ et al, 2006, LOZANO et al, 2015)



5-epi-icetexona

6.4.3 Triterpenos

O triterpenóide pentacíclico, ácido ursólico, encontra-se na natureza principalmente nas cascas da maçã (*Pyrus malus*), atuando na composição da camada de cera que envolve este fruto como agente emulsificante junto com polímeros e outros compostos de cadeia carbônica longa. Esta camada de cera serve como proteção contra fatores externos biológicos, químicos e físicos. Além das cascas da maçã, o triterpenóide pode ser encontrado nas partes aéreas do orégano

(*Origanum vulgare*), dos eucaliptos (*Eucalyptus globulus*) e do café (*Coffea arabica*) (FRIGHETO et al, 2008; KATASHIMA et al, 2017; SILVEIRA, 2017).

Suas ações biológicas são anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica, de atenuação da atrofia muscular, estimulação da síntese de fibras musculares e de controle do processo de obesidade (SILVEIRA, 2017; KATASHIMA et al, 2017)

6.4.4 Tetraterpenos

A astaxantina é um tetraterpeno ou carotenoide que apresenta em sua estrutura química 40 átomos de carbono, formando uma cadeia longa com insaturações alternadas que permitem a absorção de radiação na faixa do visível e ultravioleta (UV). Este fato resulta na coloração avermelhada deste carotenoide, e dos produtos industriais e naturais que o contém. Por razão da coloração, a astaxantina é utilizada na indústria como corante e aditivo de alimentos e na criação de peixes como o salmão, cuja cor característica é proveniente desta substância (HARLOW; RARTNER, 2004; SEABRA; PEDROSA, 2010; MESQUITA; TEIXEIRA, SERVULO, 2017).

Na natureza, a astaxantina é produzida por microalgas, no caso da *Haematococcus pluvialis*, e por leveduras como *Xantophyllomyces dendrorhous*, e encontra-se ligada quimicamente a proteínas e ácidos graxos, sendo que sua forma livre é muito instável e sofre fácil degradação por oxidação. Pertencente ao grupo das xantofilas, carotenoides com grupamentos hidroxila e carbonila, os quais proporcionam à astaxantina atividade antioxidante e capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO) (SEABRA, PEDROSA, 2010; MESQUITA, TEIXEIRA, SERVULO, 2017) .

Sua capacidade antioxidante é dita como sendo muito maior que do ácido ascórbico ou vitamina C.

6.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de moléculas simples e voláteis e são extraídos a partir de pelos glandulares, canais oleíferos e células parenquimáticas, estruturas que estão presentes em praticamente todas as partes das plantas, desde folhas até sementes. Possuem aroma agradável que os tornam bastante úteis para uso humano na área da medicina popular, na aromaterapia, na

confeção de fragrâncias, no uso como sedativos, expectorantes, analgésicos e antissépticos.

Os óleos essenciais são hidrofóbicos e, portanto, são solúveis em solventes apolares e pouco polares, tem aspecto incolor ou ligeiramente amarelado, e são instáveis em contato com a luz, umidade e a altas temperaturas. Para extração são utilizados métodos de separação por arraste de vapor d'água, prensagem a frio e outros (MARTINS, 2010; AZAMBUJA, 2017).

Óleos essenciais das espécies *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Syzygium aromaticum* testados A cromatografia revelou a composição química predominante por eugenol no óleo essencial de *S.aromaticum* (ZANUSSO JUNIOR et al, 2017; 2018).

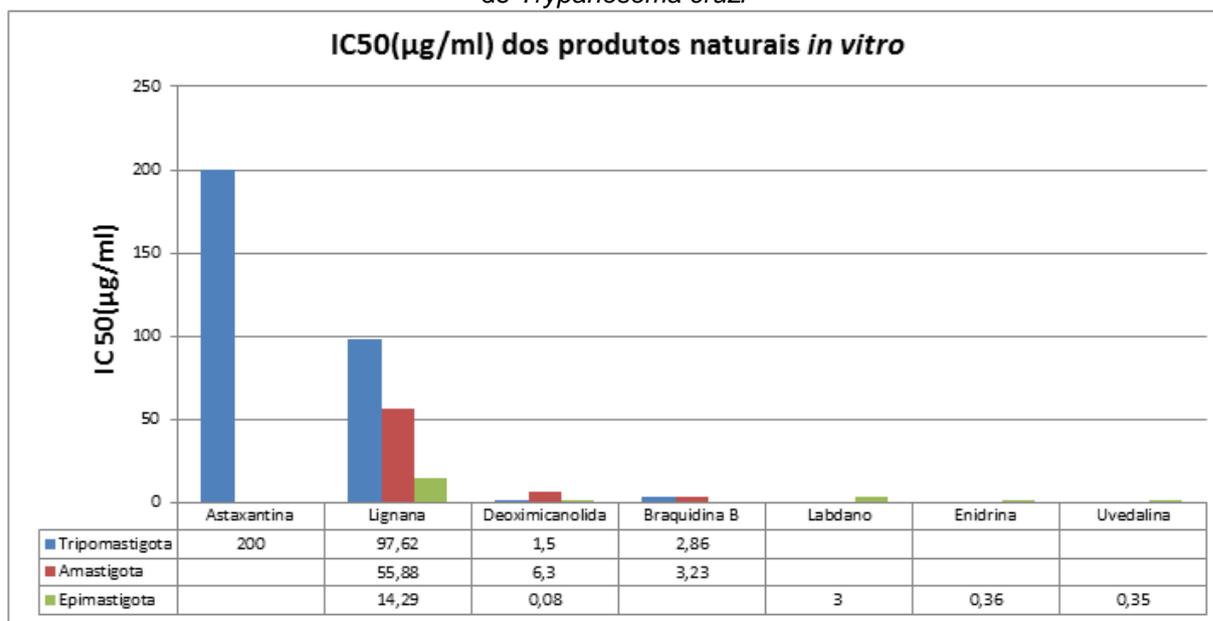
6.6 Visão geral dos efeitos *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* dos produtos naturais selecionados

Dentre os treze artigos estudados, seis avaliaram os produtos naturais também *in vitro*. Sete são referentes aos produtos naturais que foram testados e que obtiveram *in vitro* IC50 contra diferentes estágios do parasita, e muitas vezes abaixo das IC50 resultantes da utilização dos fármacos convencionais (benznidazol e nifurtimox) em grupos controle.

A astaxantina e a lignana (CONTRERAS-ORTIZ et al, 2017; GARCÍA-HUERTAS et al, 2018) foram os produtos naturais que apresentaram IC50 maiores (Figura 3). A astaxantina em meio axênico contendo tripomastigotas metacíclicos, diminuiu a taxa de sobrevivência dos parasitas em 82%, sendo que em culturas contendo os parasitas com células Vero, a mesma substância não apresentou nenhum efeito. Em testes de citotoxicidade (células Vero), a astaxantina (CONTRERAS-ORTIZ et al, 2017) alterou a viabilidade celular em concentrações na faixa de 20-30 µg/100 µl. Quanto à lignana (*P. jericóense*), os valores de IC50 obtidos em formas tripomastigotas e amastigotas foram altos (97,62 e 55,88 µg/ml, respectivamente) em comparação a concentração de 14,29 µg/ml contra as formas epimastigotas e aos valores de IC50 do benznidazol contra tripomastigotas e amastigotas (27,8 e 21 µg/ml, respectivamente) (GARCÍA-HUERTAS et al, 2018).

Os menores valores de IC50 foram observados para enidrina, uvedalina e deoximicanolida contra a forma epimastigota, cujos valores são inferiores a 1 µg/ml e menores que as IC50 do benznidazol (ULLOA et al, 2017; LAURELLA et al, 2017).

Figura 3 – Resultados das atividades dos produtos naturais avaliados *in vitro* sobre diferentes formas do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: A autoria própria (2019)

Três compostos foram isolados do extrato de *Arrabidaea brachypoda*, em um estudo do ano de 2014, pela equipe de Rocha et al., 2014, da Universidade Estadual Paulista. Por espectrometrias no UV, de massas e RMN, puderam definir a estrutura destes compostos como sendo flavonoides diméricos, denominados de braquidinas, A, B, e C. Os três compostos foram testados *in vitro*, e apenas as braquidinas B e C tiveram efeitos contra o *T.cruzi*, bloqueando a capacidade do parasita de infectar macrófagos em culturas de células contendo tripomastigotas cepa Y. A braquidina B foi a que apresentou os valores mais promissores contra o protozoário e foi posteriormente testada *in vivo* (ROCHA et al, 2014; NABAVI et al, 2017).

Da espécie *Smalanthus sonchifolius*, pertencente à família *Asteraceae*, obteve-se a enidrina, uvedalina e polimatina B. Estas LS foram testadas *in vitro* na cepa Dm28c do *T.cruzi*, e apresentaram atividade com IC50 satisfatórias na eliminação do protozoário, quando comparadas com a IC50 calculada para benznidazol. A enidrina e a uvedalina foram testadas *in vivo* contra cepa RA do *T.cruzi*, causando baixos valores de parasitemia (ULLOA et al, 2017).

Quatro lactonas sesquiterpênicas foram isoladas das partes aéreas de duas espécies de *M. variifolia* e *M. micrantha*, e dentre as 4, a deoximicanolida se destacou por ter os maiores índices de seletividade para as formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, e também por ter tido Concentrações Inibitórias 50% (IC50) baixas contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (PUENTE et al, 2019; LAURELLA et al, 2017).

Estudos anteriores revelaram a ação do diterpeno 5-epi-icetexona isolado da *Salvia gilliensi* Benth contra a forma epimastigota em diferentes cepas do *T. cruzi*, determinando a IC50 de 6,5 µM/ml (SANCHEZ et al, 2006). Seis anos após a publicação do estudo de Sanchez (et al, 2006), observou-se que a mesma substância promoveu a redução *in vitro* de formas intracelulares e tripomastigotas da cepa Y.

6.7 Efeitos *in vivo* dos produtos naturais avaliados contra o *Trypanosoma cruzi*

A Tabela 3 apresenta as atividades *in vivo* dos produtos naturais avaliados frente ao *T. cruzi* nos artigos selecionados por dois parâmetros, a redução de parasitemia e a cura dos animais experimentados.

Todos os treze testes *in vivo* foram realizados em camundongos. Os produtos apresentados na Tabela 3 agiram diminuindo a parasitemia ou curando os animais experimentados, o que demonstrou a ação tripanocida dos mesmos.

A principal hipótese é que devido ao efeito antioxidante, o carotenoide em associação com nifurtimox em testes impeça a produção de ERO's pelo nifurtimox, causando a persistência do parasita na infecção.

A astaxantina em associação com nifurtimox *in vivo*, na dose de 10 mg/kg/dia, por via oral, não levou a efeitos satisfatórios, porque não causou redução de parasitemia nem melhorou os níveis de sobrevivência dos camundongos testados infectados com cepa Ninoa na fase aguda, em relação ao nifurtimox, considerando o uso desta substância inadequado para o tratamento na fase aguda da doença. Porém, devido às suas ações anti-inflamatórias e imunomodulatórias, há uma hipótese de utilização da astaxantina na fase crônica, já que este carotenoide foi capaz de diminuir a infiltração linfocitária e a produção de citocinas de inflamação importantes na causa da cardiomiopatia e hepatoesplenomegalia. *In vitro*, eliminou

os parasitas em culturas axênicas e apresentou citotoxicidade em células Vero apenas em altas concentrações (CONTRERAS-ORTIZ et al, 2017).

Tabela 3 - Efeitos *in vivo* dos produtos naturais frente ao *Trypanosoma cruzi*

Substância/Espécie vegetal	Redução da parasitemia	Cura dos animais experimentados
Ácido Ursólico	X	
Astaxantina	-----	-----
Braquidina B (<i>A.brachypoda</i>)	X	
Deoximicanolida (<i>Mikania sp.</i>)	X	
Diterpeno (<i>S.gilliesii</i>)	X	
Enidrina/ Uvedalina (<i>S.sonchifolius</i>)	X	
Diterpeno Lábdano (<i>A. glutinosa</i>)	X	
Licnofolida (<i>Lychnophora trichocarpha</i>)	X	X
Lignana (<i>P.jericoense</i>)	X	
Óleo essencial (<i>C.citratius</i>)	X	X
Óleo essencial (<i>S.aromaticum</i>)	X	X
Óleo essencial (<i>S.aromaticum</i>) + benznidazol	X	X
Óleo essencial (<i>Z.officinalis</i>)	X	X

Legenda:

(X) – com atividade *in vivo*

(-----) – sem atividade *in vivo*

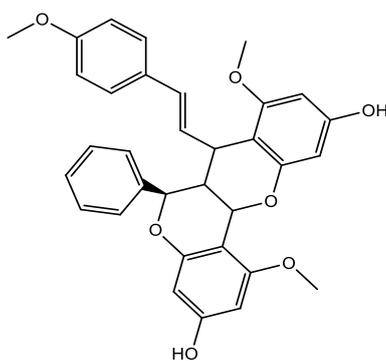
Fonte: Autoria própria (2019)

Todos os produtos naturais, com exceção da astaxantina, causaram redução de parasitemia nos animais. Estudos recentes utilizaram o triterpeno ácido ursólico como componente de formulações farmacêuticas para o tratamento da doença de Chagas. A baixa solubilidade em água e a difícil absorção intestinal interferem na biodisponibilidade do ácido ursólico, o que estimulou os pesquisadores a buscar por formas farmacêuticas que melhorassem os efeitos do composto no organismo. Dois estudos testaram o triterpeno ácido ursólico em animais infectados com cepa Y do *T. cruzi*. O primeiro deles administrou o ácido ursólico veiculado em dispersão sólida de Poloxamer 407 com caproato de sódio, por via intraperitoneal a em camundongos BALB/c, na dose de 20 mg/kg/dia. A dispersão sólida contendo o triterpeno resultou em acentuada redução da parasitemia em relação ao mesmo composto em solução livre. O segundo estudo avaliou o ácido ursólico veiculado em nanocarreadores de poli- ϵ -caprolactona, administrado a camundongos machos C57BL/6 na dose de 13,15 μ g/dia por via retro orbital. O efeito da formulação de ácido ursólico em nanocarreadores foi comparado ao grupo tratado com benznidazol, na dose de 2,5 μ g/dia, que reduziu em três vezes a parasitemia, enquanto a formulação contendo o

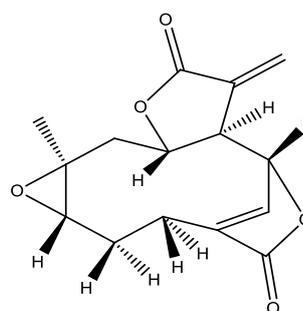
ácido ursólico reduziu os valores da parasitemia em duas vezes, quando comparando aos grupos não tratados e aos grupos que receberam nanocarreadores vazios. Ambas as formulações se mostraram seguras em testes de citotoxicidade em cultura de fibroblastos (ABRIATA et al, 2017; ELOY et al, 2015).

A braquidina B, obtida de *Arrabidaea brachypoda*, foi testada na dose de 100 mg/kg, por via oral, em animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, levando à redução do pico de parasitemia em 92 %, e 80% de taxa de sobrevivência em 20 dias após infecção. Para o grupo tratado com benznidazol (100 mg/kg), obteve-se 99% de redução do pico de parasitemia. Portanto, os efeitos produzidos pela braquidina B e benznidazol foram semelhantes entre si (ROCHA et al, 2014).

A deoximicanolida, substância obtida de *Mikania variifolia* e de *Mikania micrantha*, na dose de 1 mg/kg/dia, reduziu a parasitemia e causou 70% de sobrevivência dos animais na fase aguda após 20 dias de tratamento. Os animais tratados com benznidazol tiveram a parasitemia reduzida 2,3 vezes mais . A deoximicanolida teve maiores índices de seletividade às formas do parasita e apresentou menor citotoxicidade em monócitos TPH1 (LAURELLA et al,2017). O provável mecanismo de ação desta germacranolida parece ocorrer pela reação a grupos tióis no parasita associados à redução de estresse oxidativo (PUENTE et al, 2019; LAURELLA et al, 2017).



Braquidina B



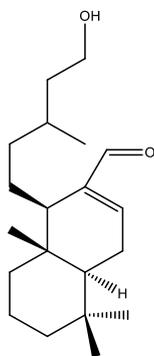
Deoximicanolida

O diterpeno, 5-epi-icetexona, isolado da *Salvia gilliesii*, foi administrado a camundongos, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg/dia. O grupo controle positivo foi tratado com benznidazol (0,1g /kg/dia) por via oral. Após 5 semanas de infecção com cepa Tulahuen, foram feitas biopsias dos animais que demonstraram a ausência de ninhos de amastigotas nos tecidos musculares. A taxa de sobrevivência dos camundongos foi de 75% e 80% para o tratamento com o diterpeno testado e benznidazol, respectivamente (LOZANO et al., 2012; LOZANO et al., 2015). O

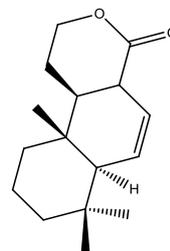
mecanismo de ação provável pode ser por interferência do diterpeno no processo de divisão celular do parasita por inibição das enzimas envolvidas nas fases S e G2 (LOZANO et al, 2012).

O diterpeno labdano (+)-15-hidróxi-7-labden-17-al, isolado da espécie *Aristeguietia glutinosa* e o extrato da planta contendo o diterpeno foram testados nas doses de 10 e 30 mg/kg, em animais infectados com a cepa CL do *T. cruzi*. O tratamento por via oral foi comparado ao grupo tratado com benznidazol (50 mg/kg/dia). Os tratamentos alteraram o nível de parasitemia, e estes foram demonstrados pelos valores de parasitas/ml de sangue. Assim os resultados foram de 99×10^5 parasitas/ml para os tratamentos com o extrato contendo a substância, $10,2 \times 10^5$ para o diterpeno, na dose de 30 mg/kg, $15,1 \times 10^5$ para o diterpeno, na dose de 10 mg e $0,1 \times 10^5$ para o benznidazol. O tratamento com benznidazol na menor dose resultou no menor número de parasitas por ml. No entanto, o diterpeno labdano testado apresentou a menor toxicidade em macrófagos de camundongos, aumentou a sobrevivência destes animais e reduziu a parasitemia a valor muito inferior ao do grupo não tratado, que foi de $16,4 \times 10^5$.

Da mesma espécie (*A. glutinosa*) foram isolados dois diterpenos ((+)-15-hydroxy-7-labden-17-al, (+)-13,14,15,16-tetranorlabd-7-en-17,12-olide) eficazes *in vitro* contra o parasita. Apenas um dos compostos isolados foi testado *in vivo*, por sua maior eficácia nas formas tripomastigotas, que aumentou a taxa de sobrevivência dos animais e reduziu assim como o benznidazol a parasitemia. A eliminação de tripomastigotas sanguíneos foi avaliada, determinando-se o mecanismo de ação por inibição da síntese de esteroides de membrana, em testes com cepa Y (VARELA et al, 2014)



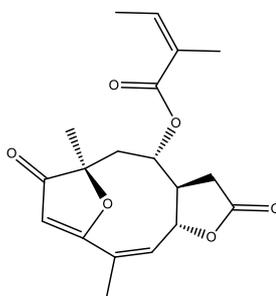
(+)-15-hydroxy-7-labden-17-al



(+)-13,14,15,16-tetranorlabd-7-en-17,12-olide

A enidrina e a uvedalina são duas lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolida e foram avaliadas em camundongos machos C3H/HeN, por via

com as formulações contendo licnofolida reduziram a parasitemia e causaram a cura parasitológica e sorológica dos animais tratados. Além de aumentarem a sobrevivência dos animais em até 100%. A formulação PCL levou a 100 % de cura dos animais infectados com cepa CL e a 62,5% de cura para àqueles infectados com cepa Y. A formulação contendo polietilenoglicol (PLA-PEG) levou a 100% de cura em ambos os grupos testados e aumentou a sobrevivência dos animais em até seis meses pós-tratamento. A licnofolida livre não resultou em nenhuma cura parasitológica, mas sim na sobrevida dos animais experimentados e na redução do pico máximo de parasitemia. O grupo tratado com benznidazol obteve 75% e 100% de cura dos animais infectados com cepa CL e Y, respectivamente (BRANQUINHO et al, 2014).



Licnofolida

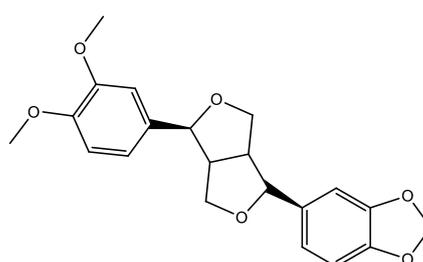
Em outro experimento, a licnofolida foi testada em animais infectados na fase aguda e crônica da doença de Chagas. As formulações de LIC-PCL-NC e LIC-PLA-PEG-NC foram administradas, por via oral, na dose de 5 mg/kg/dia, comparando-se os efeitos da licnofolida em nanocápsulas com o benznidazol na dose de 100 mg/kg/dia e solução de excipientes e nanocápsulas brancas. Outro grupo, na fase crônica, foi tratado com a licnofolida nanocarreada em dose de 2 mg/kg/dia e benznidazol na dose de 50 mg/kg/dia. Todos os grupos foram infectados com cepa Y do *T. cruzi*, e em todos houve cura parasitológica e sobrevida dos animais testados com as nanocápsulas contendo o licnofolida. Alguns animais que receberam as nanocápsulas com a licnofolida também tiveram exames de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) negativos, indicando cura sorológica (MELLO et al, 2016).

Os critérios de cura nos testes envolvendo a licnofolida foram negatização dos exames parasitológicos e sorológicos convencionais (exame de sangue a fresco, hemocultura, teste de reação de cadeia de polimerase (PCR) e (ELISA)).

Experimentos realizados com o óleo essencial extraído da espécie *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecida como cravo da Índia, testado, na dose de 100 mg/kg/dia, causou a cura parasitológica de 44% dos camundongos Swiss e de 22% dos animais tratados com a dose de 250 mg/kg/dia, infectados com cepa Y do *T. cruzi* por gavagem. Possuindo resultados melhores quando comparados aos obtidos para os ensaios realizados com outros óleos essenciais avaliados: óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, na dose de 100 mg/kg/dia, curou 50% dos animais infectados e 11,1% na dose de 250 mg/kg/dia; de *Zingiber officinale*, na dose de 100 mg/kg/dia, curou 22,2%, e na dose de 250 mg/kg/dia, curou 11,1% dos animais infectados (ZANUSSO JUNIOR et al, 2017). Assim, os pesquisadores utilizaram os mesmos óleos essenciais, com as mesmas dosagens anteriores, isolado e em associação com o benznidazol (100 mg/kg), resultando em curas de 12,5% e 37,5 % dos animais infectados, respectivamente (ZANUSSO JUNIOR et al, 2017; 2018).

No estudo com os três óleos essenciais, os critérios de cura foram feitos a partir da negatização de exames parasitológicos de qPCR e hemocultura.

A lignana isolada de *Piper jericóense* apresentou toxicidade para todas as formas do *T. cruzi* (amastigota, tripomastigota e epimastigota) *in vitro*. *In vivo*, esta lignana diminuiu a parasitemia em comparação com grupo controle e o grupo tratado com benznidazol em três doses distintas, 5, 15 e 30 mg/kg (GARCÍA-HUERTAS et al, 2018).



Lignina furofurana da *P.jericóense*

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, obtivemos resultados animadores provindos de compostos fenólicos (Flavonoides e Lignanas), terpenos, e do grupo de óleos essenciais extraídos de três espécies vegetais, que nos experimentos descritos foram capazes de reduzir a parasitemia e/ou alguns deles de curar os animais infectados com o *T. cruzi*. As altas taxas de cura parasitológica como efeito das ações biológicas da licnofolida e do óleo essencial obtido da *S. aromaticum*, ressaltam a eficácia de substâncias de origem natural no combate às moléstias humanas. Assim, os produtos naturais vêm demonstrando importantes ações contra o agente etiológico desta enfermidade, como prováveis substitutos ou associados ao tratamento já utilizado na doença de Chagas.

8 REFERÊNCIAS

ABRIATA, J. P.; ELOY, J.O; RIUL, T.B; CAMPOS. P.M; BARUFFI, M.D; MARCHETTI, J.M. **Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against Trypanosoma cruzi infection.** Materials science and engineering C, v.77, p.1196-1203, 2017.

ALEXANDRE, J. P. O.; JÚNIOR, J. Z.; TESTON, A. P. M. **Tratamento etiológico da doença de Chagas:** um antigo problema de saúde pública. Revista Uningá, Nova Esperança (PR), v.20, n.2, p.91-96, Dezembro 2014.

ALMEIDA, A. B. et al. **Sexual Transmission of American Trypanosomes from Males and Females to Naive Mates.** J. Vis. Exp. p.143, 2019.

ANGHEBEN, A. et al. **Chagas disease and transfusion medicine:** a perspective from non-endemic countries. Blood Transfusion.v.13, n.4, p.540–50, 2015.

AZAMBUJA, W. **O que são óleos essenciais?** Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/o-que-sao-oleos-essenciais/>>. Acesso em: 26 mai. 2019.

BAHIA, M. T. et al. **Fexinidazole:** A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. PLoS negl Trop Dis, v.6, 2012.

BERGAMASCHI, J. M. **Terpenos.** Disponível em: <www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2017.

BERMUDEZ, J. et al. **Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease.** Acta Tropica. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>>. 2016.

BLAU, L. et al. **Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.67, p.142-151, 2013.

BORGES-PEREIRA, J.; COURA, J. R. **Chagas disease:** 100 years after its discovery. A systemic review. [S.l.] Acta tropica, abr.2010.

BRANQUINHO, R. T. et al. **Increased Body Exposure to New Anti-Trypanosomal Through Nanoencapsulation.** Scientific Reports **JCR**, v.7, p.1-12, 2017.

BRANQUINHO, R. T. et al. **Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease.** Journal antimicrobial agents and chemotherapy, v.58, p.2067-2075, 2014.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. Brasília, p.7-86, 2015.

BUTLER, M. S. **The role of natural product chemistry in drug discovery**. Journal of natural products, v.67, p.2141-2153, 2014.

CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Penicilina**: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. Química nova na escola, v.34, p.118-123, 2012.

CASTRO, A. M.; TEIXEIRA, A.; VINAUD, M. **Emerging chagas disease**. 2010. Disponível em :<<https://books.google.com.br/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

CHAGAS, C. Nova **Tripanozomíase Humana: Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi. n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.1, n.2, p.159-218, 1909.

CHATUVERDI, D.; DWIVED, P. K.; MISHRA, M. **Sesquiterpene lactones**: A versatile class of structurally diverse natural products and their semisynthetic analogs as potential anticancer agents. Bioactive natural products, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, 1.ed, p.321-347, 2015.

CONNERS, E. E. et al. **A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants**. Acta Tropica. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.002>>. 2016. Acesso em: 03 mai. 2019.

CONTRERAS-ORTIZ, J. M. E. et al. **Effects of astaxanthin in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi**. Parasite, v.24, p.1-11, 2017.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, p.3-24, 2002.

DIAS, A. D.; URBAN, S.; ROESSNER, U. **A historical overview of natural products in drug Discovery**. Metabolites, Melbourne, abr. 2012.

DURANGO, E.J.O. **Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: Alcaloides de Phaedranassa dubia (Amaryllidaceae) y biflavonoides de Garcinia madruno (Clusiaceae)**. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, p. 153-161, Barcelona, 2008;

DUTRA, F. L. G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistema de estacionamento natural e acelerado**. Dissertação de pós-graduação, Universidade Federal do Paraná, p. 19-25, Curitiba, 2009.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, A. L. **American trypanosomiasis (Chagas disease)**. Infectious Disease Clinics of North America, v.33, p.119–134, 2019.

ELOY, J. O. et al. **Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate.** Brazilian journal of pharmaceutical sciences, v.50, p.101-108, 2015.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais.** Química nova na escola, v.39, p.120-130, São Paulo, 2017.

FRIGHETTO, R. T. S. et al. **Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography.** Food chemistry, v.106, p.767-771, 2008.

FUMAGALI, E. et al. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Maringá, v.8, n.4, p.627-641, dezembro 2008.

GARCÍA-HUERTAS, P. et al. **Activity in vitro and in vivo against Trypanosoma cruzi of a furofuran lignan isolated from Piper jericense.** Experimental parasitology, 2018.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.** Acta trop, v.115, p.22-27, 2010.

GOMES, C. et al. **American trypanosomiasis and Chagas disease: sexual transmission.** International Journal of Infectious Disease, v.81, p. 81-84, 2019.

HARLOW; RARTNER. **Pigments in salmon aquaculture: how to grow a salmon-colored salmon.** Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20071013221146/http://seafoodmonitor.com/sample/salmon.html>>. Acesso em: 25 mai. 2019.

HOTEZ, P. J. et al. **An unfolding tragedy of Chagas disease in North America.** PLoS Negl Trop Dis. v.7, n.10, 2013.

JIMENEZ, V. et al. **Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in Trypanosoma cruzi: a new therapeutic target?** Phytomedicine . [S.l.], v.21, p.1411-1418, setembro 2014.

JONES, A. J. et al. **Trypanocidal Activity of Marine Natural Products.** Marine drugs. Brisbane, p.4058-4082, outubro 2013.

KATASHIMA, C. K. et al. **Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review.** Obesity review, World Obesity Federation, p.1-12, 2017.

KIM, J.; KIM H.; PARK, S.B. **Privileged structures: eficiente chemical “navigators” toward unexplored biologically relevant chemical spaces.** J Am Chem Soc, v.136, n.42, p.14629-38, Oct 22 2014.

LANA, M.; MACHADO, E. M. M. **Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity**. Telleria,j; Tibayrenc M. American trypanosomiasis Chagas disease One hundred years of research. Elsevier, London, 2010.

LAURELLA, L. C. et al. **Assessment of sesquiterpene lactones isolated from *Mikania* plants species for their potential efficacy against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp.** PLOS neglected tropical diseases, p.1-16, 2017.

LAURENTIZ, R. S. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana da lignana diidrocubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos.** Rev. Bras. Pl. Med, v.17, p.782-789, Campinas, 2015.

LOZANO, E. et al. **The in vivo trypanocidal effect of the diterpene 5-epi-icetexone obtained from *Salvia gilliesii*.** Parasitology international, 2015;

LOZANO, E. et al. **Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology international, 61, p.628-633, 2012;

MARTINS, M. C. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc (pau santo) do cerrado.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p. 20-28, Uberlândia, 2012.

MELLO, C. G. C. et al. **Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease.** Antimicrobial agentes and chemotherapy, v.60, p.5215-5222, 2016.

MESQUITA, S. S; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. **Carotenóides: propriedades, aplicações e mercado.** Revista virtual de química, v.9, p.672-688, 2017.

MILAGRE, M.M. **Avaliação anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo de lactona sesquiterpênica isolada de *Lychnophora passerina*.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, p.101, 2018;

MOLINA, J. et al. **Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drugresistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* immunocompetent and immunosuppressed murine hosts.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.44, n.1, p.150-155, 2000.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. **Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease.** 2014. The New England Journal of Medicine, v.371, n.10, p.966, 2014.

MOREIRA,V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros in natura e encapsulado.** Dissertação de pós-graduação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 29, Itapetinga, 2013.

MORILLO, C. A. et al. **Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy**. The New England Journal of Medicine, v.373, n.14, p.1295-1306, 2015.

NABAVI, S. F. et al. **Flavonoids and Chagas disease: the story so far**. Current topics in medicinal chemistry, v,17, p.460-466, 2017.

OLIVEIRA, A. B. et al. **Trypanocidal sesquiterpenes from Lychnophora species**. Phytother Res, v.10, n.4, p.292-295, 1996.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário das plantas**. Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 03 mai. 2019.

PINHEIRO, E. et al. **Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America**. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.50, n.3, p.296-300, 2017.

PUENTE, V. et al. **Primary targets of the sesquiterpene lactone deoxymikanolide on Trypanosoma cruzi**. Phytomedicine, v.56, p.27-34, 2019.

RASSI, A. **Predicting prognosis in patients with Chagas disease: Why are the results of various studies so different?** International Journal of Cardiology, v.145, n.1, p.64–65, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.04.034>>. Acesso em: 03 mai. 2019.

REQUENA-MENDEZ, A. et al. **Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and metaanalysis**. PLoS Negl Trop Dis. 2015.

ROCHA, C. Q. et al. **Dimeric flavonoids from Arrabidaea brachypoda and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity**. Journal of natural products, v.77, p.1345-1350, 2014.

SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; HADDADI, R. **Biogenic trypanocidalsesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs - a mini review**. DARU journal of medical sciences. [S.l.], p.1-9, maio 2013.

SANCHEZ, A. M. et al. **A novel icetaxane diterpene, 5-epi-icetexone from Salvia gilliesii is active against Trypanosoma cruzi**. Acta tropica, 98, p.118-124, 2006.

SÁNCHEZ, E. et al. **Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento**. Anales de la Facultad de Medicina, Medellín, Colombia, v.77, p.39-44, novembro 2015.

SANGENITO, L. S. et al. **Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates**. Current Topics in Medicinal Chemistry, v.19, n.3, 2019.

SAÚDE, D. A., RASLAN, D. S., DE SOUZA FILHO, J. D. **Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha***. *Fitoterapia* LXIX, v.69, n.1, p.90-91, 1998.

SEABRA, L. M. J; PEDROSA, L. F. C. **Astaxanthin**: structural and functional aspects. *Revista de nutrição*, v.23, p.1041-1050, Campinas, 2010.

SCRIPPS - The Scripps Search Institute. **Why natural products?** Disponível em: <<https://www.scripps.edu/shen/NPLI/whynaturalproducts.html>>. Acesso em: 03 mai. 2019.

SILVA, A. A. **A forma nervosa da doença de Chagas**: Histórico, quadro clínico e situação atual. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/patologia/>>. 2017. Acesso em: 10 abr. 2019.

SILVEIRA, A. C. **O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, p.24, São Paulo, 2017.

SIMÕES, M. V. et al. **Cardiomiopatia da doença de Chagas**. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, v.31, n.2, p.173-189, 2018.

SOEIRO, M. N.; CASTRO, S. L. **Drogas tripanossomicidas**: estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>>. 2017. Acesso em: 10 abr. 2019.

SOUZA, V.A; NAKAMURA, C.V; CÔRREA A.G. **Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas**. *Rev. Virtual Quim.*, 4(3), p.197-207, 2012;

STRASEN, J. et al. **Epidemiology of Chagas disease in Europe**: many calculations, little knowledge. *Clis. Res.Cardiol*, v.103, p.1-10, 2013.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. **Drug Discovery**. *Nat. Rev.* v.10, p.507, 2011.

TORCHELSEN, F.K.V.S. **Avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, p.45-52, 2019;

TORRICO, F. et al. E1224 Study Group. **Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebocontrolled trial**. *The Lancet Infectious Diseases*, S1473-3099, [Epub ahead of print], 2018.

UCHYAMA, N. **Antichagasic activities of natural products against Trypanosoma cruzi**. *Journal of health science*, v.55, n.1, p.31-39, 2009.

ULLOA, J. L. et al. **Germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Smallanthus sonchifolius* with promising activity against *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi***. *Parasites & vectors*, v.10, p.1-10, 2017.

URBINA, J. A. **Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.104, Supl 1, p.311-318, 2009.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas Disease: controversies and advances**. Trends in Parasitology, v.9, n.11, p.495-501, 2003.

VARELA, J. et al. **In vivo anti-Trypanosoma cruzi activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from Aristeguietia glutinosa and mechanism of action studies**. Molecules, v.19, p.8488-8502, 2014.

VAZ, N. P. **Can the cure for Chagas disease be found in nature?** Natural remedies in the fight against parasites. [S.l.]: Intech, Cap.4. pp.93-112. 2017.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A.C; WEBER, G.A.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Embrapa clima temperado, v.316, p.16, 2010.

WHO. **Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas**: primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Organização Mundial de Saúde, p.184, 2012.

WILDNER, L. M. **Atividade antimicrobiana in vitro de lactonas sesquiterpênicas e investigação de seu mecanismo de ação**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, p.49-53, Florianópolis, 2016.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. **Trypanocidal drugs: mechanisms resistance and new targets**. Expert reviews in molecular medicine, v.11, p.e31, 2009.

WOU - Western Oregon University. **Chapter 6**: a brief history of natural products and organic chemistry. Disponível em: <<http://www.wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch105-consumer-chemistry/ch105-chapter-6-hydrocarbons/>>. Acesso em: 03 mai. 2019.

ZANUSSO JUNIOR, G. Z. **Efficacy of essential oil of Syzygium aromaticum alone and in combination with benznidazol on murine oral infection with Trypanosoma cruzi IV**. Experimental parasitology, v.185, p.92-97, 2018.

ZANUSSO JUNIOR, G. Z. et al. **Efficacy of some essential oils in mice infected with Trypanosoma cruzi**. Tropical journal of pharmaceutical research, v.16, p.1307-1316, 2017.

APÊNDICE A

Quadro 1 - Artigos selecionados para o respectivo trabalho

AUTOR (ANO)	TÍTULO	PERIÓDICO
Rocha et al (2014)	Dimeric Flavonoids from <i>Arrabidaea brachypoda</i> and Assessment of Their Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> Activity	Journal of Natural Products
García-Huertas et al (2018)	Activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> against <i>Trypanosoma cruzi</i> of a furofuran lignan isolated from <i>Piper jericóense</i>	Experimental Parasitology
Abriata et al (2017)	Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid <i>in vivo</i> efficacy against <i>Trypanosoma cruzi</i> infection	Materials Science & Engineering
Branquinho et al (2014)	Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease	Antimicrobial Agents and Chemotherapy
Contreras-Ortiz et al (2017)	Effects of astaxanthin in mice acutely infected with <i>Trypanosoma cruzi</i>	Parasite
Eloy et al (2015)	Preparation, characterization and evaluation of the <i>in vivo</i> trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate	Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
Laurella et al (2017)	Assessment of sesquiterpene lactones isolated from <i>Mikania</i> plants species for their potential efficacy against <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>Leishmania</i> sp.	PLOS Neglected Tropical Diseases
Lozano et al (2015)	The <i>in vivo</i> trypanocidal effect of the diterpene 5-epi-icetexone obtained from <i>Salvia gilliesii</i>	Parasitology International
Mello et al (2016)	Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease	Antimicrobial Agents and Chemotherapy
Ulloa et al (2017)	Germacranolide-type sesquiterpene lactones from <i>Smallanthus sonchifolius</i> with promising activity against <i>Leishmania mexicana</i> and <i>Trypanosoma cruzi</i>	Parasites & Vectors
Varela et al (2014)	<i>In Vivo</i> Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> Activity of Hydro-Ethanollic Extract and Isolated Active Principles from <i>Aristeguetia glutinosa</i> and Mechanism of Action Studies	Molecules
Zanusso Junior et al (2017)	Efficacy of some essential oils in mice infected with <i>Trypanosoma cruzi</i>	Tropical Journal of Pharmaceutical Research
Zanusso Junior et al (2018)	Efficacy of essential oil of <i>Syzygium aromaticum</i> alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with <i>Trypanosoma cruzi</i> IV	Experimental Parasitology

Fonte: autoria própria (2019)