

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Potencial anti-*Trichomonas vaginalis* de *Manilkara rufula*:  
análise fitoquímica, semissíntese e mecanismo de morte do parasito**

**PATRÍCIA DE BRUM VIEIRA**

**PORTO ALEGRE, 13 de Julho de 2015.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Potencial anti-*Trichomonas vaginalis* de *Manilkara rufula*:  
análise fitoquímica, semissíntese e mecanismo de morte do parasito**

Tese apresentada por

**Patrícia de Brum Vieira** para obtenção do GRAU

DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientação: Profa. Dr. Tiana Tasca

Coorientação: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 13 de Julho de 2015.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13/07/2015 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Mario Steindel  
Universidade Federal de Santa Catarina

#### CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Patrícia de Brum

Potencial anti-*Trichomonas vaginalis* de *Manilkara rufula*: análise fitoquímica, semissíntese e mecanismo de morte do parasito / Patrícia de Brum Vieira. -- 2015.

188 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientador: Alexandre José Macedo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. *Manilkara rufula*. 3. Mecanismo de morte. 4. Semissíntese. I. Tasca, Tiana, orient. II. Macedo, Alexandre José, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A estudante recebeu bolsa de estudos da CAPES.



Aos meus pais, **Luiz e Lúcia**, e ao meu grande amor,  
**Frederico**, dedico este trabalho.





## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me proporcionar tantas oportunidades.

A Profa. Dr. Tiana Tasca, exemplo de profissional competente, dedicado, ético e humano que tenho e sempre terei presente na minha vida, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, apoio, compreensão e empolgação. Pela amizade e convívio. Agradeço imensamente pela paciência e por acreditar em mim e por me fazer acreditar que é possível sempre.

Aos meus queridos colegas de Laboratório de Pesquisa em Parasitologia – GPTrico – Camila, Amanda, Odelta, Dariana, Márcia, Nícolas, Graziela, Lúcia e Fernanda. Agradeço pela troca de conhecimentos, pela convivência e pela amizade construída. Pelas conversas e risadas que tornam o ambiente de trabalho tão agradável. Pelos momentos de descontração fora do laboratório. Muito obrigada pela ajuda de todos vocês no desenvolvimento desta tese. Agradeço especialmente à Camila, ao Nícolas e à Grazi.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo pelos ensinamentos e disponibilidade para ajudar sempre. Pelos convívio e amizade. Muito obrigada. Ao seu grupo de pesquisa pela troca de experiências, convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Jaume Bastida por me receber em seu laboratório e toda a disponibilidade me orientando em um mundo totalmente novo, a fitoquímica.

A todos os amigos de Barcelona que tornaram a distância da família e amigos daqui menos dolorida, Natália, Laura, Ying, Rafa, Karla, Diego, Lili, Ana e Raúl. Muito obrigada por todos momentos que passamos juntos seja no laboratório ou fora dele.

A todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento desta tese, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

À Denise meu agradecimento especial pela incrível parceria, por toda a ajuda na identificação dos compostos, pela disponibilidade e amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o doutorado. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Aos meus pais, Luiz e Lúcia, agradeço pela educação que me proporcionaram e por todos os ensinamentos que me deram ao longo da vida. Pelo apoio, incentivo, conforto, compreensão e amor incondicional.

À minha querida irmã Morgana, José, Renata e Helena, muito obrigada pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

Aos meus pais de coração, Roque e Deli, pelo carinho, conforto, incentivo, orações e conversas.

Ao Filipe, Aline, Renan e Ângela, muito obrigada pelo incentivo e companheirismo, pelos momentos descontraídos e de muitas risadas. Agradeço principalmente ao Renan, pela parceria sempre seja nos momentos sérios, seja nas horas de pedaladas e descontração, muito obrigada.

Ao meu amado, Frederico, que foi meu porto seguro nesta caminhada, pelo amor e companheirismo. Pelo incentivo e apoios incondicionais em cada novo desafio. Pelas conversas que me acalmavam e davam forças para continuar. Agradeço pela paciência e compreensão. Por acreditar em mim e me mostrar que sou capaz. Muito obrigada por me proporcionar a realização de mais esta conquista.

## RESUMO

Embora seja uma das áreas mais ameaçadas na Terra, há poucos estudos sobre o potencial farmacológico da Caatinga. Este bioma é exclusivamente brasileiro e as plantas encontradas na região apresentam características únicas que as tornam fontes imensuráveis de compostos ativos. O parasito *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. A infecção está associada a sérias consequências em saúde e casos de resistência ao fármaco de escolha, metronidazol, estão em constante crescimento. Desta forma, a necessidade por alternativas para o tratamento da tricomoníase é evidente. O objetivo desta tese foi avaliar o potencial anti-*T. vaginalis* de plantas oriundas da Caatinga. A planta *Manilkara rufula* apresentou a mais potente atividade frente ao parasito e um fracionamento bioguiado foi realizado. Triterpenos pentacíclicos (caproato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina e lupeol) foram identificados nas frações apolares de *M. rufula*, porém com baixa atividade antiparasitária. Derivados triterpênicos semissintéticos, frações contendo flavonoides, taninos e saponinas também foram testados. Nossos resultados demonstraram que o ácido ursólico e a fração H100 apresentaram potente atividade anti-*T. vaginalis* e ambos afetaram o crescimento e viabilidade dos trofozoítos. Além disso, o ácido ursólico e a fração H100 induziram importantes alterações na ultraestrutura dos organismos, indicando que o mecanismo de morte do parasito ocorreu por danos na membrana. A fração H100 induziu a lise total de eritrócitos e reduziu a adesão dos parasitos às células epiteliais, sugerindo, novamente, a ação sobre membrana. A fração H100 não apresentou citotoxicidade às células epiteliais. Os resultados apresentados demonstraram o potencial da planta *M. rufula* contra *T. vaginalis* e contribuem para o entendimento das propriedades farmacológicas das plantas da Caatinga, bem como para o desenvolvimento racional de alternativas para o tratamento da tricomoníase.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, Caatinga, ácido ursólico, flavonoides, saponinas, mecanismo de morte



## ABSTRACT

*Manilkara rufula* anti-*Trichomonas vaginalis* potential: phytochemistry analysis, semi-synthesis and mechanism of death of the parasite

Although it is one of the most endangered areas on Earth, there are few studies on the pharmacological potential of the Caatinga. This is an exclusively Brazilian biome and its plants present unique characteristics that make them an immeasurable source of active compounds. The parasite *Trichomonas vaginalis* is the etiologic agent of trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide. The infection has been associated with serious consequences in health and cases of resistance to metronidazole are constantly increasing. Then, the necessity of new alternatives to the treatment of trichomoniasis is evident. The aim of this thesis was to evaluate the anti-*T. vaginalis* potential of plants from Caatinga. The *Manilkara rufula* plant showed the most potent activity against the parasite and bioguided fractionation was performed. Pentacyclic triterpenes ( $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin caproate and  $\beta$ -amyrin and lupeol acetate) were identified in the nonpolar fractions of *M. rufula*, however, low antiparasitic activity was observed. Triterpenic semisynthetic derivatives, fractions containing flavonoids, tannins and saponins were also tested. Our results showed that ursolic acid and H100 fraction exhibited potent anti-*T. vaginalis* activity and both affect growth and viability of trophozoites. In addition, ursolic acid and H100 fraction induced significant alterations in the ultrastructure of the parasite, indicating that the mechanism of death is by membrane damage. The H100 fraction induced complete lysis of erythrocytes and reduced the parasites adhesion to epithelial cells, once again, suggesting that the H100 action was on parasite membrane. The fraction H100 showed no cytotoxicity to epithelial cells. The results demonstrated the potential of the plant *M. rufula* against *T. vaginalis* and contributed to the understanding of the pharmacological properties of the Caatinga plants, as well as for the rational development of alternatives for trichomoniasis treatment.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, Caatinga, ursolic acid, flavonoids, saponins, mechanism of death.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection  
CDC – Centers for Disease Control  
DST – Doença sexualmente transmissível  
EIMS – Electron ionization mass spectrometry  
FDA – Food and Drug Administration  
FDA – Fluorescein diacetate  
GC-MS – Gas chromatography–mass spectrometry  
HIV – Human Immunodeficiency Virus  
HRESI-MS – High-resolution electrospray ionization mass spectrometry  
IR - infrared  
LC-DAD-MS – Liquid chromatography-diode array detector- mass spectrometry  
MALDI-MS – Matrix-assisted laser desorption/ionization  
MALDI-TOF/TOF – Matrix -assisted laser desorption/ionization-time of flight  
MIC – minimum inhibitory concentration  
NMR – nuclear magnetic resonance  
PI – propidium iodide  
RDA – Retro-Diels–Alder reaction  
ROS – Reactive oxygen species  
SEM – Scanning electron microscopy  
TEM – Transmission electron microscopy  
TMS – Tetramethylsilane  
TYM – Trypticase-yeast extract-maltose  
VLC – vacuum liquid chromatography





## SUMÁRIO

1. Introdução .....	23
2. Estado da arte .....	27
2.1 Produtos naturais .....	27
2.2 Bioma Caatinga .....	28
2.2.1 <i>Croton nummularius</i> .....	29
2.2.2 <i>Senna lechriosperma</i> .....	30
2.2.3 <i>Manilkara rufula</i> .....	30
2.3 Artigo de revisão publicado no periódico <i>Parasitology Research</i> .....	32
3. Objetivos .....	47
4. Capítulo I. Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially active against <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	51
5. Capítulo II. Caatinga plant with potential activity against two trichomonads: <i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	85
6. Capítulo III. New saponin of the medicinal plant <i>Manilkara rufula</i> from the Brazilian semi-arid region, Caatinga: isolation, identification and anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity.....	113
7. Discussão geral.....	151
8. Conclusões .....	167
9. Perspectivas .....	171
10. Referências .....	175
11. Anexo .....	187
11.1. Anexo 1 – Artigos e capítulos de livros publicados durante a vigência do doutorado .....	187



## INTRODUÇÃO





## 1. Introdução

Ao longo da história, o homem tem utilizado uma grande variedade de recursos naturais para sobreviver. Na medicina tradicional, o uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas afecções da saúde se remonta a milhares de anos atrás, com registros que datam da antiga Babilônia, Egito, Índia e China. Na indústria farmacêutica moderna, apesar da grande variedade de moléculas derivadas da química combinatória, os produtos naturais continuam desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de fármacos (NGO et al., 2013). Newman e Cragg (2012) destacam que a contribuição da área de produtos naturais é bastante significativa para a obtenção de novos fármacos durante um período de 30 anos (1981-2010), sendo que cerca de 35% dos fármacos aprovados são de origem natural ou derivados semissintéticos. Além disso, 30% são moléculas sintéticas inspiradas em produtos naturais ou apresentam um farmacóforo desenvolvido a partir de compostos naturais. Destaca-se que 15 medicamentos antiparasitários foram aprovados pelas autoridades sanitárias entre janeiro de 1981 e junho de 2006, destes 65% são produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN & CRAGG, 2007). Desta forma, o entendimento da diversidade química dos produtos naturais fornece uma destacável estratégia para o desenvolvimento racional de fármacos. Neste sentido, a grande biodiversidade dentro do território brasileiro coloca o Brasil em uma posição estratégica para o desenvolvimento racional e exploração sustentável de novos metabólitos com valor terapêutico.

Os diferentes biomas do Brasil apresentam uma ampla variedade de climas, tipos de solos e altitudes, fornecendo um conjunto único de variáveis ambientais para a especialização de diferentes espécies de plantas e desenvolvimento de defesas químicas. A Caatinga representa o principal bioma no Nordeste do Brasil, é caracterizada por elevadas temperaturas, baixa umidade e poucas chuvas (AGRA et al., 2007a). Assim, as plantas encontradas nesta região possuem um metabolismo especializado para garantir a sobrevivência nestas condições extremas, levando à produção de uma diversidade de metabólitos secundários com promissoras propriedades farmacológicas. Atualmente, o interesse nesta região vem aumentando e diferentes grupos de pesquisa demonstraram a atividade biológica de plantas da

Caatinga como antioxidante (DAVID et al., 2007), antifúngica (FONTENELLE et al., 2008), analgésica, anti-inflamatória (MENDES et al., 2010) antibiofilme e antibacteriana (TRENTIN et al., 2011; TRENTIN et al., 2013).

Considerando a ampla gama de atividades farmacológicas demonstrada pelas plantas da Caatinga, o nosso interesse foi despertado para avaliar a atividade destas plantas contra o parasito *Trichomonas vaginalis*, agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Em 2008, cerca de 280 milhões de novos casos de tricomoníase foram relatados no mundo (WHO, 2012). Em mulheres, a infecção varia desde casos assintomáticos até severa vaginite. Em contrapartida, em homens a tricomoníase é geralmente assintomática (PETRIN et al., 1998; BAKARE et al., 1999). Quando não tratada corretamente, a tricomoníase acarreta inúmeras consequências, incluindo problemas na gravidez (KLEBANOFF et al., 2001), nascimento prematuro e baixo peso de recém-nascidos (COTCH et al., 1997), predisposição ao câncer cervical e de próstata (VIIKKI et al., 2000; SUTCLIFFE et al., 2012), doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006) e infertilidade (GRODSTEIN et al., 1993). Além disso, o parasito atua como agente facilitador para a transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (SORVILLO et al., 2001; VAN DER POL et al., 2008).

O tratamento da tricomoníase baseia-se no uso de 5-nitroimidazóis, metronidazol e tinidazol, únicos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). No entanto, estes fármacos apresentam limitações como efeitos adversos, carcinogênicos e teratogênicos, além de crescentes casos de resistência, o qual pode variar de 2,5 a 9,6% (SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006). É importante salientar que não existem sistemas de vigilância para a identificação de isolados resistentes, assim estes números podem ser subestimados. Além disso, a tricomoníase afeta desproporcionalmente pessoas na base da pirâmide socioeconômica e desta maneira, recebe poucos investimentos para o desenvolvimento de novas alternativas. No entanto, sem tratamentos adicionais para a tricomoníase, centenas de milhares de pessoas permanecerão infectadas por *T. vaginalis*, e conforme já alertado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, USA), a tricomoníase é considerada uma infecção parasitária negligenciada (SECOR et al., 2014).

**ESTADO DA ARTE**







## 2. Estado da arte

### 2.1 Produtos naturais

A utilização de produtos naturais na cura de doenças é tão antiga e universal quanto a própria medicina. Algumas plantas como alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), mirra (*Commiphora* sp.) e papoula (*Papaver somniferum*) foram mencionadas como medicinais em escrituras da Mesopotâmia e datam de 2600 a.C. Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na medicina tradicional em civilizações como a egípcia e chinesa e muitas destas plantas seguem em uso até os dias de hoje. Na indústria farmacêutica moderna, apesar da grande variedade de moléculas derivadas da química combinatória, os produtos naturais continuam desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de fármacos (NGO et al., 2013). Conforme Newman e Cragg (2012), os produtos naturais continuam contribuindo significativamente para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Cerca de 40% dos fármacos utilizados atualmente foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Dos fármacos aprovados nos últimos 30 anos, 35% correspondem a compostos de origem natural e derivados semissintéticos e 30% são moléculas sintéticas inspiradas em um farmacóforo desenvolvido a partir de compostos naturais. A ampla variedade química e a biodiversidade mundial garantem o grande interesse nessa área.

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. A grande variedade de vida encontrada, mais de 20% do número total de espécies do planeta, eleva o Brasil como o principal país entre as 17 nações megadiversas (MMA, 2012). Em sua grande extensão territorial, o Brasil possui um clima bem diferenciado, o que contribui para a formação de zonas biogeográficas distintas ou biomas: a Floresta Amazônica, maior floresta tropical úmida do mundo; o Pantanal, maior planície inundável; o Cerrado de savanas e bosques; os campos dos Pampas; a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica; e a Caatinga de florestas semiáridas.

## 2.2 Bioma Caatinga

A Caatinga (do tupi: *ka'a* [mata] + *tinga* [branca] = mata branca) é o único bioma exclusivamente brasileiro, o que significa que em nenhuma outra parte da Terra pode ser encontrado grande parte do seu patrimônio biológico. A denominação é oriunda da coloração esbranquiçada apresentada pela vegetação durante o período de seca. Consiste de uma planície semiárida que ocupa uma área de cerca de 850.000 km<sup>2</sup>, englobando parte dos estados da Paraíba, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Maranhão, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (região Nordeste do Brasil) e parte norte de Minas Gerais (região sudeste do país) (MMA, 2012).

A Caatinga é o bioma brasileiro mais fragilizado, devido ao uso insustentável de seus solos e recursos naturais ao longo de centenas de anos de ocupação. A região apresenta uma rica biodiversidade que desperta interesse em diversas áreas como agrosilvipastoril e indústria, principalmente a farmacêutica. As plantas da Caatinga são amplamente utilizadas pela população para o tratamento de diversas enfermidades do trato respiratório, gastrointestinal, geniturinário, circulatório, doenças infecciosas, parasitárias e doenças venéreas (ALMEIDA et al., 2006) (AGRA et al., 2007b). Atualmente, o uso popular destas plantas tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa, os quais demonstraram atividades antioxidante (DAVID et al., 2007), antifúngica (FONTENELLE et al., 2008), analgésica, anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), antibiofilme e antibacteriana (TRENTIN et al., 2011; TRENTIN et al., 2013). O grande interesse nestas plantas está na capacidade de se adaptar a condições edafoclimáticas extremas. A exposição a pouca quantidade de água, ao clima seco e à elevada incidência de radiação podem levar à produção de metabólitos secundários de elevada complexidade, distintos de plantas encontradas em diferentes regiões e com interesse farmacológico.

No entanto, apesar da importância e ampla utilização destas plantas na medicina popular, há pouca investigação com rigor científico para comprovar, ou ao menos elucidar, o potencial das mesmas. Neste sentido, estudos de bioprospecção e avaliação da atividade farmacológica são etapas importantes para suprir esta lacuna.

A seleção de plantas para estudo pode basear-se em quatro estratégias distintas: i) seleção fitoquímica, na qual uma classe específica de compostos é pesquisada; ii) seleção aleatória de plantas ativas frente uma ação farmacológica predeterminada; iii) seleção seguindo relatos de atividade microbiológica e iv) seleção etnofarmacológica (COS et al., 2006). Neste estudo, as plantas foram selecionadas seguindo a estratégia de seleção aleatória de plantas contra uma atividade farmacológica definida, no caso, com atividade anti-*T. vaginalis*. No entanto, visando à preservação ambiental, somente foram coletadas plantas com grande disponibilidade e sem risco de extinção. Assim, três plantas foram selecionadas: *Croton nummularius*, *Manilkara rufula* e *Senna lechriosperma*.

### 2.2.1 *Croton nummularius*

*Croton nummularius* Baill. (Adansonia 4: 360. 1864) não apresenta registro de nomes populares, segundo dados do Banco de Dados de Plantas do Nordeste (BDPN, 2013). O gênero *Croton* é composto por cerca de 1200 espécies, é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae e embora possua uma distribuição pantropical, o maior número de espécies é encontrado nas Américas. No Brasil encontra-se cerca de 350 espécies de *Croton*, principalmente na Caatinga, Cerrado e campos rupestres. A espécie *C. nummularius* é nativa e endêmica do Brasil, somente encontrada na microrregião do Vale do Ipanema, na chapada de São José, Buíque (SILVA et al., 2010b).

As espécies de *Croton* apresentam uma variedade de usos medicinais nas diversas regiões onde são encontradas. As cascas, folhas, raízes e sementes são utilizadas para diabetes, problemas gastrointestinais, hipercolesterolemia, leucemia, úlcera, diarreia, reumatismo disenteria, anorexia, hepatite, obesidade, problemas respiratórios, anti-inflamatórios, analgésico e até mesmo como adoçante (SALATINO et al., 2007), o que demonstra o potencial farmacológico deste gênero. No entanto, nenhuma atividade biológica foi encontrada após a pesquisa em diferentes bases de dados (Pubmed, Scopus, ScienceDirect, SciFinder) relacionada à espécie *C. nummularius*.

### 2.2.2 *Senna lechriosperma*

*Senna lechriosperma* H.S.Irwin & Barneby é conhecida popularmente por besouro (nos estados do Ceará e Piauí) e candieiro (no estado de Pernambuco). Este gênero pertence à família Fabaceae ou Leguminosae, a qual é relatada como a família botânica mais representativa na Caatinga, pois apresenta 293 espécies em 77 gêneros. A espécie *S. lechriosperma* é endêmica e nativa do Brasil, sendo encontrada somente na região da Caatinga, principalmente na depressão sertaneja setentrional nos estados do Piauí, Ceará e Pernambuco, penetrando ligeiramente para o sul, no norte da Bahia, e para o oeste, no leste do Maranhão. Possui grande potencial forrageiro, sendo utilizada na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos.

O gênero *Senna* é fonte de inúmeros compostos com grande diversidade estrutural, garantindo assim ampla variedade de propriedades farmacológicas, como laxante e purgativa, as quais são comparáveis ao fármaco bisacodil (Lacto-purga®). Além disso, apresentam atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, antiparasitária, inseticida, antitumoral e hepatoprotetora (SILVA et al., 2010a), demonstrando o grande potencial farmacológico deste gênero. Nenhum relato de atividade biológica atribuída à espécie *S. lechriosperma* foi encontrado após a pesquisa em diferentes bases de dados (Pubmed, Scopus, ScienceDirect, SciFinder).

### 2.2.3 *Manilkara rufula*

*Manilkara rufula* (Miq.) H.J. Lam, Blumea 4(2): 356. 1941. [*Mimusops rufula* Miq. in Martius, Fl. bras. 7:44. 1863] [sin. het. *Manilkara duckei* Monach.] – Typus (K): Brasil. Piauí, Serra da Batalha, IX.1839 (fl), Gardner 2910.

O gênero *Manilkara* pertence à família Sapotaceae, a qual compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies de distribuição pantropical (MONTENEGRO et al., 2006). No Brasil, são registradas 19 espécies do gênero *Manilkara*, as quais estão distribuídas na floresta Atlântica, restinga, tabuleiro costeiro, Caatinga, Cerrado e floresta Amazônica (ALMEIDA JR, 2010). No Nordeste, o gênero está representado por 12 espécies nativas, com representantes em diferentes ecossistemas. A espécie

*M. rufula* é uma árvore com 5 a 10 metros de altura e endêmica no Brasil, ocorrendo em áreas de Caatinga, Cerrado e na transição Caatinga-Cerrado, podendo ser observada nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe, Tocantins e Bahia.

Em diferentes bases de dados (Pubmed, Scopus, ScienceDirect, SciFinder) foi encontrado apenas um estudo relatando a atividade biológica de *M. rufula*. No entanto, vários estudos relatam a atividade de outras espécies do gênero *Manilkara*. Na medicina tradicional indiana uma planta do mesmo gênero, *M. laurifolia*, é utilizada como anti-helmíntica e adstringente (ESKANDER et al., 2005). Atividade antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral, antiúlcera, hipotensiva, anti-HIV, espasmolítica foram atribuídas a diferentes espécies de *Manilkara*, (AKHTAR et al., 2010; FERNANDES et al., 2013). O extrato aquoso ou metanólico de folhas de *M. zapota* possui atividade antibacteriana (Gram positivas e negativas) e antifúngica (MONDAL et al., 2012). Muelas-Serrano et al. (2000) demonstraram atividade antiparasitária de diferentes plantas incluindo dois gêneros da família Sapotaceae. Além disso, a atividade anti-*T. vaginalis* de extrato metanólico e diclorometano de folhas de *M. dissecta* foi demonstrada (DESRIVOT et al., 2007). As atividades relacionadas a espécies de *Manilkara* indicam o grande potencial farmacológico do gênero. A grande miscelânea de atividades biológicas relatada para espécies de *Manilkara* é atribuída à variedade de metabólitos secundários presente nestas espécies como saponinas triterpênicas (SAHU et al., 1997; ESKANDER et al., 2006), triterpenos (MISRA & MITRA, 1969; RHOORRI-FRIH et al., 2013) e compostos fenólicos como flavonoides (MA et al., 2003) e taninos (WANG et al., 2012). No entanto, poucos estudos relatam o tipo de compostos envolvidos na atividade biológica, pois a maioria destes estudos foi realizada com extratos brutos e apenas análises fitoquímicas qualitativas foram realizadas, demonstrando a necessidade da realização de estudos mais aprofundados nesta área.

### 2.3 Artigo de revisão publicado no periódico *Parasitology Research*

A parte 2.3 é constituída de artigo de revisão publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 32 – 44.

Vieira, PB, Giordani, RB, Macedo, AJ, Tasca, T. Natural and synthetic compound anti-Trichomonas vaginalis: an update review. *Parasitology Research*. 2015, 114:1249-1261. Doi: 10.1007/s00436-015-4340-3

## **OBJETIVOS**

.....





### 3. Objetivos

Tendo em vista que i) a tricomoníase é um sério problema de saúde pública; ii) afeta desproporcionalmente a base da pirâmide socioeconômica; iii) possui terapia restrita a dois fármacos; e iv) um crescente número de isolados de *Trichomonas vaginalis* apresenta resistência aos fármacos utilizados no tratamento, evidenciando, desta forma, a grande necessidade de terapias alternativas para o tratamento, o objetivo geral deste estudo foi:

Avaliar o potencial anti-*T. vaginalis* de plantas oriundas da Caatinga, contribuindo para o desenvolvimento racional de alternativas para o tratamento da infecção.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de extratos brutos obtidos de diferentes plantas oriundas da Caatinga;
2. Realizar o fracionamento e identificação dos extratos com atividade anti-*T. vaginalis* promissora;
3. Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* dos compostos isolados e identificados como responsáveis pela atividade antiparasitária do extrato bruto;
4. Investigar o mecanismo de morte do parasito induzido pelos compostos ativos;
5. Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos frente a células epiteliais vaginais;
6. Avaliar o efeito dos compostos ativos na citoaderência dos parasitos, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio.



## **ARTIGOS CIENTÍFICOS**





#### **4. Capítulo I. Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis***

Patrícia de Brum Vieira, Nícolas Luiz Feijó da Silva, Gloria Narjara Santos da Silva, Denise Brentan Silva, Norberto Peporine Lopes, Simone Cristina Baggio Gnoatto, Márcia Vanusa da Silva, Alexandre José Macedo, Jaume Bastida, Tiana Tasca. Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*.

O texto completo do Capítulo I, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 55 – 84, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para a publicação em periódico científico

**Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially  
active against *Trichomonas vaginalis***

Patrícia de Brum Vieira<sup>1</sup>, Nicolás Luiz Feijó da Silva<sup>1</sup>, Gloria Narjara Santos da  
Silva<sup>2</sup>, Denise Brentan Silva<sup>3,4</sup>, Norberto Peporine Lopes<sup>4</sup>, Simone Cristina Baggio  
Gnoatto<sup>2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>5</sup>, Alexandre José Macedo<sup>6,7</sup>,  
Jaume Bastida<sup>8</sup>, Tiana Tasca<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil; Emails: [patriciasbrum@yahoo.com.br](mailto:patriciasbrum@yahoo.com.br) (P.B.V.); [nicolaslfsilva@gmail.com](mailto:nicolaslfsilva@gmail.com) (N.L.F.S.); [tiana.tasca@ufrgs.br](mailto:tiana.tasca@ufrgs.br) (T.T.).

<sup>2</sup>Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil; Emails: [narjarags@gmail.com](mailto:narjarags@gmail.com) (G.N.S.S.); [simone.gnoatto@ufrgs.br](mailto:simone.gnoatto@ufrgs.br) (S.C.B.G.).

<sup>3</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, 79090-900, Brasil; Email: [denisebrentan@gmail.com](mailto:denisebrentan@gmail.com) (D.B.S.).

<sup>4</sup>Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brasil; Email: [npelopes@fcrfp.usp.br](mailto:npelopes@fcrfp.usp.br) (N.P.L.).

<sup>5</sup>Centro de Ciências Biológicas e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brasil; Email: [marcia.vanusa@ufpe.br](mailto:marcia.vanusa@ufpe.br) (M.V.S.).

<sup>6</sup>Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil; Email: [alexandre.jose.macedo@gmail.com](mailto:alexandre.jose.macedo@gmail.com) (A.J.M.).

<sup>7</sup>Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA), Núcleo de Biprospecção da Caatinga (NBioCaat), Campina Grande, Pernambuco, Brasil.

<sup>8</sup>Departamento de Produtos Naturais, Biologia Vegetal e Ciências do Solo, Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Barcelona, 08028, Espanha; Email: [jaumbastida@gmail.com](mailto:jaumbastida@gmail.com) (J.B.).

\*Author to whom correspondence should be addressed, email [tiana.tasca@ufrgs.br](mailto:tiana.tasca@ufrgs.br); Phone: +55 51 3308 5325; Fax: +55 51 3308 5437.

**Abstract:** *Trichomonas vaginalis* causes trichomoniasis, the most common but overlooked non-viral sexually transmitted disease worldwide. The treatment is based at 5'-nitroimidazoles, however, failure are related to resistance of *T. vaginalis* to chemotherapy. Caatinga is a uniquely Brazilian region and plants from this area present diverse biological activity, however, with few studies. In this report, crude extract of *Croton nummularius*, *Senna lechriosperma* and *Manilkara rufula* were tested *in vitro* against *T. vaginalis*. *Manilkara rufula* presented a potent effect against the parasite and a bioguided fractionation was performed. Four major compounds were identified from the crude extract of *M. rufula*: **1b**, **2a**, **2b**, and **3a**. In addition, six derivatives of  $\alpha$ -amyrin (**1**),  $\beta$ -amyrin (**2**) and lupeol (**3**) were synthesized. Anti-*T. vaginalis* activity of all derivatives, **1**, **2**, **3** and oleanolic (**4**) and ursolic (**5**) acids was evaluated. Compound **5** demonstrated the best activity (MIC 50  $\mu$ M) and about 98% of parasite viability was reduced after 2h of incubation. Several important ultrastructural alterations were observed by scanning electron microscopy. Moreover, **5** presented high cytotoxicity to cancer cell lines (H7hVII and HeLa) and low cytotoxicity against Vero line (normal cell line). Compound **5** improved metronidazole effect against *T. vaginalis* resistant isolate when in association.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*; Caatinga plants; triterpenes; ursolic acid; cytotoxicity.



## **5. Capítulo II. Caatinga plant with potential activity against two trichomonads: *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus***

Patrícia de Brum Vieira, Nicolás Luiz Feijó da Silva, Denise Brentan Silva, Norberto Peporine Lopes, Márcia Vanusa da Silva, Jaume Bastida, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Caatinga plant with potential activity against two trichomonads: *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*.

O texto completo do Capítulo II, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 88 – 112, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para a publicação em periódico científico.

Caatinga plant with potential activity against two trichomonads:

*Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*

Patrícia de Brum Vieira<sup>1</sup>, Nicolás Luiz Feijó da Silva<sup>1</sup>, Denise Brentan Silva<sup>2,3</sup>,

Norberto Peporine Lopes<sup>3</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>4</sup>,

Jaume Bastida<sup>5</sup>, Alexandre José Macedo<sup>6,7</sup>, Tiana Tasca<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil;

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil;

<sup>4</sup>Centro de Ciências Biológicas e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

<sup>5</sup>Departamento de Produtos Naturais, Biologia Vegetal e Ciências do Solo, Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha;

<sup>6</sup>Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

<sup>7</sup>Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA), Núcleo de Biprospecção da Caatinga (NBioCaat), Campina Grande, Pernambuco, Brasil.

\*Author to whom correspondence should be addressed, email [tiana.tasca@ufrgs.br](mailto:tiana.tasca@ufrgs.br);

Phone: +55 51 3308 5325; Fax: +55 51 3308 5437.

**Abstract:** *Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis the most common but overlooked non-viral sexually transmitted disease worldwide. *Tritrichomonas foetus* infects the bovine urogenital tract, causing bovine trichomoniasis. Significant economic losses may occur due to infertility and abortion among cattle. Human and bovine trichomoniasis present treatment restrictions and efforts to identify new alternatives are essential. The present study evaluated the anti-trichomonads activities of seven fractions (M30, M50, M100, A10, A30, A50, and A70) from *Manilkara rufula*. M30 and M50 fractions presented the highest anti-trichomonads activities. Twenty known flavonoids and tannins were identified. Standard flavonoids were evaluated and did not reduce significantly the parasite viability. Altogether, the results demonstrated the potential of *M. rufula* fractions against *T. vaginalis* and *T. foetus* and, for the first time, to our knowledge, flavonoids and tannins were identified from leaves of *M. rufula*.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, anti-trichomonads activity, Caatinga, *Manilkara rufula*.



**6. Capítulo III. *Manilkara rufula* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga: anti-*Trichomonas vaginalis* activity, isolation and identification of active compounds**

Patrícia de Brum Vieira, Nicolas Luiz Feijó da Silva, Camila Braz Menezes, Denise Brentan Silva, Norberto Peporine Lopes, Márcia Vanusa da Silva, Jaume Bastida, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. *Manilkara rufula* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga: anti-*Trichomonas vaginalis* activity, isolation and identification of active compounds

O texto completo do Capítulo III, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 116 – 147, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para a publicação em periódico científico.

Manilkara rufula from the Brazilian semi-arid region, Caatinga: anti-*Trichomonas vaginalis* activity, isolation and identification of active compounds

Patrícia de Brum Vieira<sup>1</sup>, Nicolás Luiz Feijó da Silva<sup>1</sup>, Camila Braz Menezes<sup>1</sup>,  
Márcia Vanusa da Silva<sup>2</sup>, Denise Brentan Silva<sup>3</sup>, Norberto Peporine Lopes<sup>4</sup>,  
Alexandre José Macedo<sup>5,6</sup>, Jaume Bastida<sup>7</sup>, Tiana Tasca<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

<sup>2</sup>Centro de Ciências Biológicas e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>4</sup>Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil;

<sup>5</sup>Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

<sup>6</sup>Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA), Núcleo de Biprospecção da Caatinga (NBioCaat), Campina Grande, Pernambuco, Brasil.

<sup>7</sup>Departamento de Produtos Naturais, Biologia Vegetal e Ciências do Solo, Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha.

\*Author to whom correspondence should be addressed, email [tiana.tasca@ufrgs.br](mailto:tiana.tasca@ufrgs.br);

Phone: +55 51 3308 5325; Fax: +55 51 3308 5437.

**Abstract:** *Trichomonas vaginalis* infects the urogenital tract and causes trichomoniasis, the most widespread nonviral sexually transmitted disease in humans. This infection affects 276 million people worldwide and increases susceptibility to HIV infection and cervical and prostate cancers. The mainstay medication for trichomoniasis is metronidazole; however, resistance cases have increased. New alternatives to treat trichomoniasis are vital. The H100 fraction of *Manilkara rufula* (Caatinga plant) reduced 100% of parasite viability. This fraction was active against fresh clinical isolates and presented synergic effect with metronidazole. The H100 fraction was totally hemolytic, but did not present cytotoxicity to mammalian cells. In addition, profound alterations on parasite ultrastructure were observed. Parasites cytoadherence to epithelial cells were significantly reduced by H100 fraction. Purified fraction Purified fraction with saponin as major components reduced 100% of *T. vaginalis* viability. Altogether, these results indicated that the H100 fraction induced parasite death by membrane damage and the compound responsible for the activity was a saponin. In addition, it was demonstrated the potential of a Caatinga plant as alternative to treat trichomoniasis.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*, Caatinga plants, *Manilkara rufula*, saponin activity





## DISCUSSÃO GERAL





## 7. Discussão geral

Muito antes do surgimento da escrita, o homem já fazia uso de plantas para fins alimentares e medicinais. Os primeiros registros de uso de plantas medicinais foram feitos em cuneiforme e datam de 2600 a.C. na Mesopotâmia. Entre as substâncias usadas estão óleos de espécies de *Cedrus* e *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, espécies de *Commiphora* e *Papaver somniferum*, muitas das quais continuam sendo utilizados no tratamento de gripes, resfriados e infecções parasitárias (GURIB-FAKIM, 2006). Embora uma grande variedade de moléculas seja derivada da química combinatória, produtos naturais desempenham um papel chave no desenvolvimento de novos fármacos. Cerca de 40% dos fármacos utilizados atualmente foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Nos últimos 30 anos, 35% dos fármacos aprovados por órgãos competentes são compostos de origem natural ou derivados semissintéticos. Além disso, 30% são compostos sintéticos inspirados em farmacóforo desenvolvido a partir de um produto natural. Destaca-se que dos 14 fármacos antiparasitários aprovados nos últimos 30 anos, aproximadamente 70% são de origem natural ou derivados semissintéticos (NEWMAN & CRAGG, 2012; NGO et al., 2013), deixando evidente, desta forma, a grande importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o entendimento desta grande biodiversidade nos fornece uma variedade de entidades químicas para o desenvolvimento racional de novos fármacos. O Brasil apresenta uma grande biodiversidade, ocupando uma posição importante para o desenvolvimento racional e sustentável de novas entidades químicas com propriedades terapêuticas.

Neste sentido, o objetivo desta tese visou o estudo químico e farmacológico de plantas oriundas da região da Caatinga. Este bioma está exposto a condições edafoclimáticas diferenciadas, como baixa umidade e elevada temperatura e exposição a raios UV (AGRA et al., 2007a). Para sobreviver a estas condições extremas, as plantas se adaptam, resultando em um metabolismo secundário diferenciado com promissoras propriedades farmacológicas.

Considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da tricomoníase, neste estudo foi avaliado o potencial anti-*T. vaginalis* de

três plantas da Caatinga, *C. nummularius*, *M. rufula* e *S. lechriosperma*. Na literatura, estudos relatando a atividade biológica destes gêneros foram encontrados (SALATINO et al., 2007; SILVA et al., 2010a; MONDAL et al., 2012; FERNANDES et al., 2013). No entanto, um único estudo foi encontrado na literatura sobre as propriedades biológicas de *M. rufula* (ARCOVERDE et al., 2014). Nenhum relato sobre as propriedades farmacológicas de *C. nummularius* e *S. lechriosperma* foi encontrado, deixando evidente a necessidade de novos estudos nesta área.

A tricomoníase, infecção causada pelo parasito *T. vaginalis*, é um sério problema de saúde pública. Anualmente, 276 milhões de novos casos de infecção são relatados no mundo (WHO, 2012). No entanto, como a tricomoníase não é uma doença de notificação compulsória, estes números são subestimados. Além da elevada incidência/prevalência da tricomoníase, a infecção está associada a sérias consequências como problemas na gravidez, infertilidade e predisposição ao câncer cervical e prostático (POOLE & MCCLELLAND, 2013). É importante salientar que a infecção aumenta em cerca de três vezes o risco de aquisição e transmissão do vírus HIV (SORVILLO et al., 2001; VAN DER POL et al., 2008; KISSINGER & ADAMSKI, 2013). Assim, medidas eficazes para o tratamento e diagnóstico da tricomoníase podem contribuir grandemente para a redução da transmissão da AIDS.

As opções terapêuticas para o tratamento da tricomoníase se restringem aos 5-nitroimidazóis, sendo o metronidazol o tratamento de escolha. No entanto, apesar da eficácia na maioria dos casos, um crescente aumento de resistência vem sendo observado, sendo estimado em cerca de 10% (SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006). Entretanto, não existe sistema de vigilância para detectar casos de resistência ao metronidazol (SECOR et al., 2014), assim, estes números podem ser mais expressivos. Neste sentido, uma estratégia na busca de novas alternativas para o tratamento da tricomoníase é a busca por compostos estruturalmente distintos dos 5-nitroimidazóis e, por consequência, com mecanismos de ação alternativos.

Sendo assim, no Capítulo I desta tese foi avaliada a atividade anti-*T. vaginalis* do extrato bruto de folhas e ramos das três plantas. Porém, apenas os extratos de

folhas e ramos de *M. rufula* apresentaram promissora atividade antiparasitária. Desta forma, foi realizado o fracionamento com os extratos de *Manilkara*.

Após a realização de sucessivas cromatografias em coluna, frações enriquecidas com triterpenos pentacíclicos foram obtidas. Os compostos foram identificados como acetato de  $\beta$ -amirina e acetato de lupeol, caproato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. Tendo em vista que estes compostos são amplamente conhecidos na literatura, a identificação dos mesmos foi baseada na comparação do padrão de fragmentação na espectroscopia de massas com bases de dados do NIST e dados da literatura (SHAI et al., 2008; FERNANDES et al., 2013; FINGOLO et al., 2013). Os compostos caproato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina são de difícil separação devido à isomeria de posição existente entre os mesmos. Desta forma, optou-se por trabalhar com frações enriquecidas com estes compostos. Estas frações apresentaram baixa atividade anti-*T. vaginalis*. Apesar de inúmeras atividades biológicas serem atribuídas a estes compostos, as frações enriquecidas com triterpenos pentacíclicos apresentaram baixa capacidade de reduzir a viabilidade do parasito (em média 40%). Estes resultados divergem dos obtidos por Shai et al. (2008), que reportaram atividade antifúngica e antibacteriana de derivados ursano e lupano. Os ácidos ursólico e betulínico apresentam atividade antitumoral e antiviral (AIKEN & CHEN, 2005). Derivados dos esqueletos ursano e lupano apresentam atividade antiprotozoária *in vitro* contra *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma* (TAKETA et al., 2004; INNOCENTE et al., 2012; SILVA et al., 2013; INNOCENTE et al., 2014). Além disso, foi relatada atividade anti-inflamatória e antioxidante de três triterpenos pentacíclicos isolados da resina de *Manilkara bidentada* (RHOURRI-FRIH et al., 2013). Apesar da vasta diversidade de atividades relatadas para estes compostos, os triterpenos pentacíclicos não foram ativos contra *T. vaginalis*. Uma das hipóteses sugeridas para justificar a baixa atividade é que estes compostos foram testados como frações enriquecidas, não como compostos isolados como relatado na literatura. Há décadas o desenvolvimento de derivados a partir de triterpenos naturais vem apresentando um papel de destaque em química medicinal, como evidenciado na literatura (SILVA et al., 2013; HUA et al., 2015; SILVA et al., 2015). Na tentativa de melhorar a atividade das frações obtidas de *M. rufula*, seis derivados, com estrutura baseada nos padrões  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e

lupeol, foram semissintetizados: acetato de  $\alpha$ -amirina, caproato de  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina, caproato de  $\beta$ -amirina, acetato de lupeol e caproato de lupeol.

A atividade anti-*T. vaginalis* dos derivados semissintetizados foi avaliada e, de forma inesperada, também apresentou baixa atividade antiparasitária. Na concentração de 100  $\mu$ M, o composto caproato de lupeol apresentou a menor redução da viabilidade de *T. vaginalis*, 28,6% em comparação com o controle. Os demais compostos reduziram cerca de 40% da viabilidade dos trofozoítos. Estes resultados corroboram os dados obtidos para as frações enriquecidas em triterpenos. Apesar de dados da literatura relatarem que derivados a partir de diferentes esqueletos apresentam diferentes atividades biológicas (LIU, 2005; GAUTHIER et al., 2009; WANG & FANG, 2009), neste estudo, foi demonstrado que compostos obtidos a partir de três diferentes esqueletos (ursano, oleanano e lupano) apresentaram atividades anti-*T. vaginalis* similares.

Os três padrões utilizados na semissíntese, bem como dois ácidos derivados a partir destes (ácido ursólico e oleanólico), foram testados contra *T. vaginalis*. Os compostos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol e ácido oleanólico demonstraram uma baixa redução da viabilidade do parasito, cerca de 25% na concentração de 100  $\mu$ M. No entanto, o composto ácido ursólico, na mesma concentração, reduziu 100% da viabilidade dos trofozoítos.

Tendo em vista a potente atividade apresentada pelo ácido ursólico, a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) foi determinada. A determinação da MIC se deu através de contagens sob microscópio de luz, um método cansativo e trabalhoso. Assim, para minimizar erros de contagens, organismos na MIC e em uma concentração acima foram incubados em meio TYM fresco. A viabilidade dos parasitos foi avaliada a cada 24 h durante 144 h. Após 24 h de incubação, nenhum crescimento foi observado, confirmando 50  $\mu$ M como CIM verdadeira. O ácido ursólico apresentou um efeito antiproliferativo e não reversível, visto que o crescimento dos parasitos foi totalmente inibido após a remoção do composto. Após a confirmação da MIC, uma curva cinética de crescimento foi realizada para avaliar o efeito do ácido ursólico no crescimento e viabilidade dos

parasitos. Como esperado, a condição controle (trofozoítos não tratados com ácido ursólico) apresentaram um clássico pico de crescimento, como demonstrado em estudos prévios (BRANDELLI et al., 2013; INNOCENTE et al., 2014). Por sua vez, organismos tratados com ácido ursólico 50  $\mu$ M não apresentaram um pico de crescimento. Após 2 h de tratamento, o crescimento dos parasitos foi significativamente reduzido, sendo totalmente abolido após 12 h de tratamento. Depois deste período não foi possível visualizar organismos íntegros, apenas restos celulares.

No sentido de melhorar a acurácia da curva cinética de crescimento obtida por contagens, foram realizadas análises por citometria de fluxo. Corantes fluorogênicos são bastante aceitos como indicadores sensíveis da viabilidade celular em vários tipos celulares (HUMPHREYS et al., 1994). Neste estudo os organismos tratados ou não com ácido ursólico foram corados simultaneamente com FDA (do inglês, *fluorescein diacetate*) e PI (do inglês, *propidium iodide*) para aumentar a resolução do método. Trofozoítos com membranas intactas retêm o FDA e apresentam cor verde. Ao contrário, organismos não funcionais incorporam o PI e são considerados como não viáveis. Os trofozoítos não tratados com ácido ursólico (controle) apresentaram apenas marcação com FDA. Porém, organismos tratados com ácido ursólico também marcaram com FDA e não coraram com PI. Ao comparar a quantificação da fluorescência apresentada pelo controle com os organismos tratados, observou-se que, mesmo corados com FDA, o número de trofozoítos foi drasticamente reduzido. É provável que o ácido ursólico atue na membrana, causando danos na mesma de forma a impedir a marcação com PI. Além disso, apenas detritos celulares foram encontrados nas amostras tratadas, não viabilizando a marcação com PI. Apesar da inviabilidade da marcação com PI, os dados obtidos por citometria de fluxo corroboram os resultados obtidos por contagens, demonstrando que, apesar de trabalhoso e cansativo, contagens em hemocítmetro são adequadas para a determinação da viabilidade de trofozoítos de *T. vaginalis*.

Tendo em vista a provável ação do ácido ursólico na membrana dos parasitos, ferramentas de microscopia eletrônica foram importantes para o entendimento do efeito induzido pelo ácido ursólico em *T. vaginalis*. Para avaliar o efeito do ácido

ursólico na ultraestrutura de *T. vaginalis*, trofozoítos foram tratados ou não com ácido ursólico 50 µM durante 2 h. Após o tratamento verificou-se, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a perda da forma típica apresentada pelos organismos não tratados. Além disso, os trofozoítos tornaram-se arredondados e, em seguida, foram observados projeções e orifícios na membrana do parasito. Apesar das alterações na membrana, foi possível observar a membrana ondulante e flagelos. Como mencionado anteriormente, o tratamento com ácido ursólico destrói os trofozoítos e tratamentos maiores que 2 h não são possíveis. As análises por MEV de *T. vaginalis* demonstraram que o ácido ursólico causou profundas alterações, tais como trofozoítos arredondados e enrugados, além de significativo danos na membrana, como mencionado anteriormente, ocorreu a formação de orifícios e projeções foram observadas na membrana, além da mesma torna-se enrugada. Estas características indicam que o parasito está em processo de morte, como reportado em estudos anteriores para organismos tratados com compostos como licorina e candimina, griseofulvina e derivado de hidroxiquinuclidina (MARIANTE et al., 2006; GIORDANI et al., 2010; GIORDANI et al., 2012; ROCHA et al., 2014). O ácido ursólico apresenta uma atividade antitumoral vastamente conhecida (DALLA VECHIA et al., 2009; HUA et al., 2015). No entanto, apesar do amplo estudo desenvolvido nesta área, o mecanismo pelo qual a citotoxicidade é exercida permanece não esclarecido. Na literatura encontra-se estudos acerca da atividade antiparasitária, no entanto, pouco se sabe a respeito do mecanismo de morte induzido pelo ácido ursólico. Neste sentido, os resultados apresentados neste estudo contribuem demonstrando que o ácido ursólico age na membrana do parasito.

Além da grande importância destes compostos na investigação do mecanismo de morte em organismos como o *T. vaginalis*, este estudo, para o nosso conhecimento, é o primeiro a avaliar a atividade biológica destes compostos frente ao parasito *T. vaginalis*, bem como é a primeira vez que estes compostos foram descritos para a espécie *M. rufula*, contribuindo para o conhecimento acerca das plantas oriundas da Caatinga.

Nos Capítulos II e III deste estudo, avaliou-se a atividade anti-*T. vaginalis* de frações com caráter mais polar obtidas a partir do extrato bruto de folhas de *M. rufula*.



Considerando que o principal objetivo desta tese era identificar compostos ativos obtidos a partir de plantas da Caatinga contra *T. vaginalis* e que frações com caráter mais apolar apresentaram baixa atividade antiparasitária, novas abordagens foram seguidas na identificação dos compostos responsáveis pela atividade do extrato bruto de folhas de *M. rufula*. Nas primeiras etapas do fracionamento dos triterpenos, foi realizada uma extração visando a separação dos triterpenos de compostos fenólicos e açúcares (TAPONDJOU et al., 2011). A atividade destas frações foi avaliada e 90% da viabilidade dos trofozoítos foi reduzida (dados não demonstrados), indicando que os compostos ativos responsáveis pela potente atividade do extrato bruto de *Manilkara* eram compostos com caráter mais polar.

Desta maneira, o extrato bruto foi submetido a extração com diferentes proporções de acetona:água, visando à extração de compostos fenólicos. As quatro frações obtidas foram testadas frente ao parasito *T. vaginalis* e todas demonstraram uma promissora atividade antiparasitária. No entanto, a fração ML-A10 foi escolhida para estudo, pois o perfil cromatográfico obtido por CCD indicava que a fração estava mais limpa em relação às demais. Para limpeza desta fração foi realizada cromatografia em coluna com a resina Sephadex® LH20, seguindo o método proposto por Trentin et al. (2013). A partir da coluna obteve-se oito frações e os resultados obtidos originaram os Capítulos II e III.

No Capítulo II avaliou-se a atividade de sete frações (M30, M50, M100, A10, A30, A50 e A70) frente a *T. vaginalis* e *Tritrichomonas foetus*, o agente etiológico da tricomoníase bovina. Frente a *T. vaginalis* estas frações reduziram cerca de 85% da viabilidade dos parasitos, indicando que os compostos presentes nestas não são os responsáveis pela potente atividade apresentada pelo extrato bruto de *M. rufula*. No entanto, frente a *T. foetus* as frações M30 e M100 apresentaram uma potente atividade, pois na concentração de 1,0 mg/mL reduziram 100% da viabilidade dos trofozoítos, indicando seu potencial contra este parasito que causa inúmeras perdas econômicas (RAE & CREWS, 2006) e não possui tratamentos adequados e aprovados pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (CARVALHO & GADELHA, 2007). As demais frações apresentaram moderada redução da viabilidade de *T. foetus*.

A diferença observada nas atividades antiparasitárias pode ser atribuída à composição de cada fração. Para avaliar esta hipótese, as frações foram analisadas por LC-DAD-MS/MS em modo negativo e positivo e compostos com massa molecular acima de 1000 Da foram analisados por MALDI-MS e MALDI-MS/MS. Baseado nas análises espectroscópicas de MS, MS/MS e UV e em comparação com padrões de fragmentação previamente publicados e com padrões autênticos, foi possível a identificação de flavonoides como ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, epicatequina, galocatequina 3-O-galato, epicatequina 3-O-galato, quercetina 3-O- $\alpha$ -ramnopirranose, rutina, entre outros flavonoides; e de taninos condensados formados por subunidades de procianidina e prodelfinidina nas frações obtidas por cromatografia em coluna. Como pode ser observado no perfil cromatográfico, todas as frações possuem os mesmos compostos com algumas exceções, variando apenas a quantidade de cada composto. Assim, a diferença na composição de cada fração justifica a diferença na atividade antiparasitária.

Tendo em vista que as frações M30 e M100 apresentaram as melhores atividades antiparasitárias e na sua constituição possuem flavonoides como compostos majoritários, a atividade anti-*T. vaginalis* e anti-*T. foetus* de padrões autênticos de flavonoides foi avaliada na tentativa de identificar o composto responsável pela atividade antiparasitária. Nenhum dos padrões avaliados reduziu significativamente a viabilidade de *T. vaginalis*, já que apenas 20% de redução foi observada. Frente a *T. foetus* a redução foi moderada, aproximadamente 40%. A exceção da rutina que reduziu 80% da viabilidade de *T. foetus*. Os resultados indicam que os flavonoides não são os únicos responsáveis pela atividade anti-*T. vaginalis* e anti-*T. foetus* demonstrada pelas frações M30 e M100. Estes resultados contrariam dados da literatura que demonstram inúmeras atividades biológicas atribuídas aos diferentes compostos identificados nas frações de *M. rufula*. Salvamani et al. (2014) demonstraram que miricetina e rutina apresentam atividades antioxidantes, anticarcinogênica, antiplaquetária, hipoglicêmica e citoprotetora. Catequinas apresentam propriedades anti-inflamatórias e afetam a agregação plaquetária. Além disso, catequinas apresentam atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana (CUSHNIE & LAMB, 2005). Provavelmente a atividade das frações M30 e M100 seja devida ao efeito sinérgico entre os diferentes flavonoides, já que os mesmos

apresentaram-se pouco ativos quando testados isoladamente. É possível também que a atividade seja devida à presença de saponinas na fração M30 e proantocianidinas na fração M100, já que ambos metabólitos foram identificados por MALDI-EM/EM. Tanto saponinas como proantocianidinas são amplamente conhecidas na literatura por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, anticâncer, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e inibição da agregação plaquetária (AUGUSTIN et al., 2011; WANG et al., 2012; TRENTIN et al., 2013).

No Capítulo III avaliou-se a atividade anti-*T. vaginalis* da oitava fração obtida por cromatografia em coluna. A fração H100 apresentou potente atividade frente a trofozoítos de *T. vaginalis*. Esta fração foi separada das demais, pois foi eluída da coluna apenas com água, enquanto as demais frações foram eluídas com o auxílio de solventes orgânicos. Em um primeiro momento, a MIC desta fração foi determinada por contagens e confirmada por cultivo como discutido anteriormente. A MIC foi 0,5 mg/mL, demonstrando o potencial desta fração frente ao parasito *T. vaginalis*. Segundo Cos et al. (2006) um extrato é considerado relevante e seletivo quando apresenta valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 0,1 mg/mL. No entanto, para organismos extracelulares como *T. vaginalis* pontos de corte mais robustos são necessários para ensaios de atividade. Além disso, normalmente a atividade anti-*T. vaginalis* é expressa como MIC (VIEIRA et al., 2015). Assim a H100 apresentou uma atividade relevante e seletiva contra o parasito *T. vaginalis*, demonstrando o potencial desta fração para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento da tricomoníase. Em seguida, foi avaliado o efeito da fração H100 na viabilidade e crescimento dos trofozoítos através da realização de uma curva cinética de crescimento. Após 4 h de tratamento com a fração H100 foi observado uma significativa redução no número de parasitos, porém, a completa redução do crescimento foi observada 24 h após o tratamento com a fração H100. Assim, os demais experimentos foram realizados após 4 h de incubação, pois neste tempo alterações morfológicas já puderam ser observadas, evitando-se a presença exagerada de detritos celulares.

Tendo em vista o potencial anti-tricomonádídeos demonstrado pelas frações M30, M100 e H100, a citotoxicidade frente as células HMVII e HeLa foi avaliada. A

fração H100 não apresentou citotoxicidade frente as duas linhagens celulares avaliadas, indicando que o efeito desta é seletivo antiparasitário e não afeta as células do hospedeiro. Apesar das frações M30 e M100 apresentarem uma elevada citotoxicidade às células testadas, esta análise não deve ser considerada o único critério para exclusão ou inclusão de um composto para a realização de testes em animais. Schmidt et al. (2002) demonstraram que o composto helenalina apresentou citotoxicidade moderada quando testada *in vitro*, no entanto, em ensaios *in vivo*, utilizando camundongos como modelo, o composto não foi tóxico. A M30 e a M100 são frações não purificadas, desta forma, a citotoxicidade apresentada pelas mesmas pode ser devido a compostos que não são os responsáveis pela atividade antiparasitária, sendo necessário novos fracionamentos para comprovar esta hipótese.

Fatores de virulência e patogenicidade, tais como citoaderência às células epiteliais e evasão do sistema imune, podem variar entre isolados padrões e clínicos frescos (PETRIN et al., 1998) e estes fatores podem influenciar a atividade antiparasitária da fração H100. Assim, a atividade da H100 contra oito isolados clínicos frescos foi avaliada. Na concentração de 0,5 mg/mL, a qual reduziu totalmente o crescimento do isolado padrão, apenas dois isolados clínicos frescos tiveram a viabilidade totalmente abolida, TV-LACM2 e TV-LACH4. A viabilidade dos demais isolados foi fortemente reduzida, entre 85 e 95%. Estes resultados corroboram com resultados previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrando que extratos ou compostos purificados apresentam variável atividade frente a diferentes isolados clínicos frescos (BRANDELLI et al., 2013; INNOCENTE et al., 2014). Outro fator variável entre diferentes isolados é a resistência ao metronidazol, um problema em constante crescimento entre isolados clínicos. Segundo Butler et al. (2010) diferentes níveis de resistência podem ser atribuídos considerando a MIC anaeróbica: baixo nível – 30-60  $\mu$ M; nível moderado – 60-120  $\mu$ M; e alto nível – igual ou maior a 235  $\mu$ M. Neste estudo, foi demonstrado que a MIC para o isolado TV-LACM2R é 73  $\mu$ M (nível moderado de resistência). Assim, na tentativa de melhorar o efeito do metronidazol contra o isolado TV-LACM2R, foi determinada a MIC da fração H100 frente ao isolado resistente, a qual foi 1,0 mg/mL. O efeito sinérgico entre o metronidazol e a fração H100 foi observado quando MIC/2 (0,5 mg/mL) foi associada

a uma baixa concentração de metronidazol (15  $\mu$ M). Estes resultados demonstram que a fração H100 é uma alternativa promissora contra isolados resistentes de *T. vaginalis*.

Tendo em vista a potente atividade anti-*T. vaginalis* da fração H100, o mecanismo de morte dos parasitos induzido por esta fração foi avaliado através de um conjunto de experimentos. Em um primeiro momento foi avaliada a atividade hemolítica. Esta análise simples indica a ação de compostos na membrana dos eritrócitos, atividade comumente atribuída às saponinas, devido ao caráter anfifílico apresentado por estas e a capacidade de complexar com esteroides, proteínas e fosfolípídeos das membranas (GAUTHIER et al., 2009). As saponinas são amplamente encontradas em plantas superiores como dicotiledôneas, principalmente nas famílias Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae e Primulaceae (PODOLAK et al., 2010). A fração H100 obtida a partir da planta *M. rufula*, membro da família Sapotaceae, contém saponina e este metabólito pode ser o responsável pela potente atividade da fração H100.

Técnicas de microscopia de fluorescência e eletrônica foram empregadas na identificação da ação da fração H100 na membrana dos parasitos. Organismos corados com DAPI e FLUTAX-2 indicam a ação da fração H100 na membrana dos parasitos, pois como demonstrado em estudos prévios (LECKE et al., 2002; VIEIRA et al., 2008), o FLUTAX-2, um derivado ativo do Taxol, pode ligar-se e marcar microtúbulos em trofozoítos intactos, permitindo uma acurada visualização dos microtúbulos por microscopia de fluorescência. Desta forma, após o tratamento com a fração H100, observou-se a marcação dos microtúbulos com FLUTAX-2, no entanto, a morfologia clássica dos trofozoítos não foi verificada. Ao contrário, os organismos não tratados demonstraram a forma clássica de trofozoítos de *T. vaginalis*. Em contrapartida, organismos tratados não apresentaram alterações nucleares identificadas pela marcação com DAPI como demonstrado por Mariante et al. (2006).

Dando sequência à investigação do mecanismo de morte, alterações na ultraestrutura de *T. vaginalis* foram avaliadas por MEV e MET (microscopia eletrônica de transmissão). Como esperado, após o tratamento com a fração H100 observou-se

a perda da morfologia típica dos trofozoítos. De uma maneira tempo-dependente, observou-se a formação de pseudocistos ou formas endoflageladas, como demonstrado após o tratamento com griseofulvina (MARIANTE et al., 2006). Após 4 h de tratamento, observou-se o início do processo de internalização dos flagelos, o qual completou-se após 24 h de tratamento. Os pseudocistos são uma forma de defesa de *T. vaginalis* que aparece em condições ambientais desfavoráveis como em esquemas de resfriamento e aquecimento e tratamentos com hidroxiureia (PEREIRA-NEVES et al., 2003). Através MET verificou-se que os hidrogenossomos encontram-se extravasados no meio extracelular, evidenciando o rompimento da membrana do parasito. Estes resultados corroboram com a análise hemolítica e a microscopia de fluorescência, indicando que o mecanismo de morte induzido pela fração H100 ocorre através de danos na membrana do parasito. Visto que análises preliminares demonstram a presença de saponinas na fração H100 e que estes compostos podem se complexar com componentes da membrana, o efeito da H100 na citoaderência de *T. vaginalis* a células mamíferas foi avaliado. Além disso, a adesão do parasito a células do hospedeiro é determinante para a patogênese da tricomoníase. A citoaderência é um mecanismo complexo que envolve, principalmente, proteínas de superfície (adesinas) e glicoconjugados (lipofosfoglicano). O nível de adesão está diretamente associado à virulência do isolado e é isolado-dependente (PETRIN et al., 1998). Como demonstrado em estudo prévio (dados não publicados), o isolado TV-LACM6 é fortemente aderente e o efeito da fração H100 foi avaliado. Como controle positivo foi utilizado o periodato, um agente oxidante de polissacarídeos, tais como o lipofosfoglicano (GILBERT et al., 2000). A fração H100 reduziu significativamente a adesão dos parasitos às células mamíferas, indicando um possível desequilíbrio do lipofosfoglicano, modulando a citoaderência. Estes resultados vão ao encontro do que já foi demonstrado, indicando que a fração H100 age na membrana dos parasitos e o composto responsável pela atividade, provavelmente seja uma saponina, pois estes compostos têm a capacidade de se complexar com fosfolipídeos de membrana, tais como o lipofosfoglicano do *T. vaginalis*, o qual é constituído por uma âncora de ceramida ligada a fosfoinositol e poli-N-acetilactosamina (SINGH et al., 2009).

Além do papel do lipofosfoglicano na adesão de *T. vaginalis*, este glicoconjugado desencadeia uma resposta inflamatória específica e aumenta a

expressão da interleucina (IL) 8, a qual recruta neutrófilos para o sítio da infecção, sendo a principal célula encontrada no corrimento vaginal de pacientes com tricomoníase (KUCKNOOR et al., 2007). Nos neutrófilos, as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) auxiliam na eliminação de microrganismos fagocitados e atuam como sinalizadoras. No entanto, neste estudo, neutrófilos estimulados por *T. vaginalis* tratados com a fração H100 não aumentaram a produção de ROS, indicando que tanto a fração como o metronidazol não desempenham um papel imunomodulador em relação à produção de ROS por neutrófilos. Em recente estudo, Mallo et al. (2013) demonstraram que o metronidazol não tem ação moduladora na formação de ROS.

Todavia segue a questão: qual é o composto responsável pela potente ação da fração H100? Na tentativa de responder esta questão, sete frações analisadas preliminarmente por MALDI-MS foram testadas contra *T. vaginalis*. Duas destas frações continham taninos hidrolisáveis e flavonoides. Como já mencionado anteriormente, flavonoides não são os responsáveis pela atividade anti-*T. vaginalis* e, mais uma vez, as frações contendo flavonoides não apresentaram atividade antiparasitária. Em contrapartida, as frações purificadas contendo saponina reduziram 100% a viabilidade dos parasitos. Desta forma, pode-se afirmar que os compostos responsáveis pela promissora atividade demonstrada pelo extrato bruto das folhas de *M. rufula* são saponinas. No entanto, análises estão em andamento identificar e elucidar a estrutura destes compostos.

Porém cabe ressaltar a importância dos resultados apresentados nesta tese. Primeiro, apesar da Caatinga ser um bioma de características únicas no mundo, poucos estudos com rigor científico são realizados acerca das propriedades biológicas e fitoquímicas das plantas deste bioma. Segundo, a terapia para tricomoníase humana é restrita aos 5-nitroimidazóis e os casos de resistência estão em constate crescimento. Terceiro, não existem tratamentos adequados e aprovados para a tricomoníase bovina. Desta forma, é essencial a busca por terapias alternativas tanto para a tricomoníase humana quanto para a tricomoníase bovina. Neste sentido, os resultados apresentados identificaram pela primeira vez, para o nosso conhecimento, flavonoides, taninos e saponinas em extratos obtidos de folhas de *M. rufula*. Além

disso, este é o primeiro relato da atividade anti-*T. vaginalis* e anti-*T. foetus* desta planta bem como de compostos obtidos a partir da mesma. Além disso, foi sugerido o mecanismo de morte dos parasitos induzidos pelos extratos e frações obtidos da *M. rufula*.



## CONCLUSÕES

.....



## 8. Conclusões

Os resultados apresentados nesta tese permitem as seguintes conclusões:

1. Os extratos brutos das folhas e ramos de *M. rufula* apresentaram potente atividade anti-*T. vaginalis in vitro*;
2. Análises por CG-EM e RMN permitiram a identificação dos compostos acetato de  $\beta$ -amirina, acetato de lupeol e caproato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. Estas frações apresentaram baixa atividade anti-*T. vaginalis*. Entretanto, é a primeira vez que estes compostos foram identificados na planta *M. rufula*;
3. Derivados semissintéticos (acetato de  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina, acetato de lupeol, caproato de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e caproato de lupeol) apresentaram baixa atividade anti-*T. vaginalis*;
4. O ácido ursólico causou a morte de trofozoítos de *T. vaginalis* pela indução de profundas alterações na ultraestrutura do parasito como formação de projeções e orifícios na membrana, bem como a perda da morfologia piriforme clássica;
5. Frações ricas em flavonoides, taninos e saponinas reduziram a viabilidade de *T. foetus*, provavelmente pela ação na membrana dos parasitos;
6. A fração H100, rica em saponinas, apresentou uma potente atividade anti-*T. vaginalis*. A H100 induziu a morte dos parasitos através de importantes alterações na ultraestrutura dos trofozoítos. Além disso, a H100 reduziu a adesão dos trofozoítos a células humanas, sem apresentar citotoxicidade;



**PERSPECTIVAS**





## 9. Perspectivas

No sentido de avançar acerca de informações fitoquímicas e biológicas de plantas oriundas da Caatinga, bem como no entendimento dos mecanismos de morte do parasito amitocondriado *T. foetus*, as seguintes perspectivas são sugeridas:

1. Realização de fracionamento bioquímico das frações ricas em flavonoides com atividade anti-*T. foetus*;
2. Avaliação do mecanismo de morte do parasito induzido pelos compostos ativos;
3. Avaliação da citotoxicidade dos compostos ativos frente a células epiteliais vaginais;
4. Elucidação da estrutura dos compostos responsáveis pela atividade anti-*T. vaginalis* e anti-*T. foetus*.





## REFERÊNCIAS

— . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . . — . . .



## 10. Referências

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. d.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, 114-140, 2007a.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASILIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, n.2, p.383-95, 2007b.
- AIKEN, C.; CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends in Molecular Medicine*, v.11, n.1, p.31-36, 2005.
- AKHTAR, N.; ALI, M.; ALAM, M. S. Gallic acid esters from the stem bark of *Mimusops elengi* L. *Natural Product Research*, v.24, n.10, p.962-72, 2010.
- ALMEIDA, C. F.; AMORIM, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. Medicinal plants popularly used in the Xingo region - a semi-arid location in Northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed*, v.2, 15, 2006.
- ALMEIDA JR, E. B. **Diversidade de *Manilkara Adans.* (Sapotaceae) para o Nordeste do Brasil.** 2010. 158 (Doutorado), Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. d. S.; DE ALMEIDA NEVES, F. P.; DIONÍZIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. d. S.; DA SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. d. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Natural Product Research*, v.28, n.16, p.1297-1301, 2014.
- AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, v.72, n.6, p.435-57, 2011.
- BAKARE, R. A.; ASHIRU, J. O.; ADEYEMI-DORO, F. A.; EKWEOZOR, C. C.; ONI, A. A.; OKESOLA, A. O.; ADEBAYO, J. A. Non-gonococcal urethritis (NGU) due to *Trichomonas vaginalis* in Ibadan. *West African Journal of Medicine*, v.18, n.1, p.64-8, 1999.
- BRANDELLI, C. L. C.; VIEIRA, P. B.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbya-Guarani indigenous group in Brazil. *BioMed Research International*, v.2013, 7, 2013.

- BUTLER, S. E.; AUGOSTINI, P.; SECOR, W. E. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitology Research*, v.107, n.4, p.1023-7, 2010.
- CARVALHO, K. P.; GADELHA, A. P. Effects of three benzimidazoles on growth, general morphology and ultrastructure of *Trichomonas foetus*. *FEMS Microbiology Letters*, v.275, n.2, p.292-300, 2007.
- CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive *Herpes simplex virus* type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*, v.33, n.12, p.747-52, 2006.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, n.3, p.290-302, 2006.
- COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G., 2nd; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sexually Transmitted Diseases*, v.24, n.6, p.353-60, 1997.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.26, n.5, p.343-356, 2005.
- DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, v.32, p.1245-1252, 2009.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDAO, H. N.; BRANCO, A.; DE FATIMA AGRA, M.; BARBOSA, M. R.; DE QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*, v.78, n.3, p.215-8, 2007.
- DESRIVOT, J.; WAIKEDRE, J.; CABALION, P.; HERRENKNECHT, C.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Antiparasitic activity of some New

- Caledonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.112, n.1, p.7-12, 2007.
- ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; ABDEL-KHALIK, S. M.; SOLIMAN, H. S.; MAHMOUD, II; LONG, C. Saponins from the leaves of *Mimusops laurifolia*. *Journal of Natural Products*, v.68, n.6, p.832-41, 2005.
- ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; POUNY, I.; SOLIMAN, H. S.; ABDEL-KHALIK, S. M.; MAHMOUD, II. Saponins from the seeds of *Mimusops laurifolia*. *Phytochemistry*, v.67, n.16, p.1793-9, 2006.
- FERNANDES, C. P.; CORREA, A. L.; LOBO, J. F.; CAMEL, O. P.; DE ALMEIDA, F. B.; CASTRO, E. S.; SOUZA, K. F.; BURTH, P.; AMORIM, L. M.; SANTOS, M. G.; FERREIRA, J. L.; FALCAO, D. Q.; CARVALHO, J. C.; ROCHA, L. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard, Sapotaceae. *BioMed Research International*, v.2013280810, 2013.
- FINGOLO, C.; SANTOS, T.; FILHO, M.; KAPLAN, M. Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules*, v.18, n.4, p.4247-4256, 2013.
- FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, n.5, p.1383-90, 2008.
- GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.17, n.5, p.2002-8, 2009.
- GILBERT, R. O.; ELIA, G.; BEACH, D. H.; KLAESSIG, S.; SINGH, B. N. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunity*, v.68, n.7, p.4200-4206, 2000.
- GIORDANI, R. B.; JUNIOR, C. O. R.; DE ANDRADE, J. P.; BASTIDA, J.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCIA, T.; DE ALMEIDA, M. V. Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chemical Biology and Drug Design*, v.80, n.1, p.129-133, 2012.

- GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v.73, n.12, p.2019-2023, 2010.
- GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v.137, n.5, p.577-84, 1993.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v.27, n.1, p.1-93, 2006.
- HUA, S. X.; HUANG, R. Z.; YE, M. Y.; PAN, Y. M.; YAO, G. Y.; ZHANG, Y.; WANG, H. S. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel ursolic acid derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.95435-452, 2015.
- HUMPHREYS, M. J.; ALLMAN, R.; LLOYD, D. Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry*, v.15, n.4, p.343-348, 1994.
- INNOCENTE, A.; SILVA, G.; CRUZ, L.; MORAES, M.; NAKABASHI, M.; SONNET, P.; GOSMANN, G.; GARCIA, C.; GNOATTO, S. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules*, v.17, n.10, p.12003-12014, 2012.
- INNOCENTE, A. M.; VIEIRA, P. B.; FRASSON, A. P.; CASANOVA, B. B.; GOSMANN, G.; GNOATTO, S. C.; TASCA, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. *Parasitology Research*, v.113, n.8, p.2933-40, 2014.
- KISSINGER, P.; ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually Transmitted Infections*, v.89, n.6, p.426-433, 2013.
- KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; LEVENO, K. J.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M. Failure of metronidazole to prevent preterm

- delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *New England Journal of Medicine*, v.345, n.7, p.487-93, 2001.
- KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cell Microbiology*, v.9, n.11, p.2586-97, 2007.
- LECKE, S. B.; TASCA, T.; SOUTO, A. A.; DE CARLI, G. A. *Trichomonas vaginalis*: microtubule cytoskeleton distribution using fluorescent taxoid. *Experimental Parasitology*, v.102, n.2, p.113-116, 2002.
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, n.1-2, p.92-94, 2005.
- MA, J.; LUO, X. D.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products*, v.66, n.7, p.983-6, 2003.
- MALLO, N.; LAMAS, J.; LEIRO, J. M. Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, n.6, p.2476-84, 2013.
- MARIANTE, R. M.; VANCINI, R. G.; BENCHIMOL, M. Cell death in trichomonads: new insights. *Histochemistry and Cell Biology*, v.125, n.5, p.545-56, 2006.
- MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v.129, n.3, p.391-7, 2010.
- MISRA, G.; MITRA, C. R. *Mimusops manilkara*, constituents of fruit and seed. *Phytochemistry*, v.8, n.1, p.249-252, 1969.
- MMA. 2012. **Caatinga**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: 20/02/2012.
- MONDAL, S.; DAS, D.; ROY, S. K.; ISLAM, S. S. Isolation, purification and structural characterization of an acetylated heteroglycan from the unripe fruits of *Manilkara zapota* L. *Carbohydrate Research*, v.35474-8, 2012.
- MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e

- anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16, n.Suplem, p.611-67, 2006.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTINEZ-DIAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; GOMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of american plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, n.1-2, p.101-7, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, n.3, p.461-77, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v.75, n.3, p.311-35, 2012.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Natural Products Reports*, v.30, n.4, p.584-92, 2013.
- PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K. C.; BENCHIMOL, M. Pseudocysts in trichomonads--new insights. *Protist*, v.154, n.3-4, p.313-29, 2003.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.300-317, 1998.
- PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, v.9, n.3, p.425-474, 2010.
- POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, v.89, n.6, p.418-422, 2013.
- RAE, D. O.; CREWS, J. E. *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America- Food Animal Practice*, v.22, n.3, p.595-611, 2006.
- RHOURRI-FRIH, B.; RENIMEL, I.; CHAIMBAULT, P.; ANDRÉ, P.; HERBETTE, G.; LAFOSSE, M. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. *Fitoterapia*, v.88, n.0, p.101-108, 2013.
- ROCHA, D. A.; DE ANDRADE ROSA, I.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W.; BENCHIMOL, M. The effect of 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH) and metronidazole on *Trichomonas vaginalis*: a comparative study. *Parasitology Research*, v.113, n.6, p.2185-97, 2014.



- SAHU, N. P.; KOIKE, K.; JIA, Z.; NIKAIDO, T. Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. *Phytochemistry*, v.44, n.6, p.1145-9, 1997.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.1811-33, 2007.
- SALVAMANI, S.; GUNASEKARAN, B.; SHAHARUDDIN, N. A. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *BioMed Research International*, v.2014, p. 11, 2014.
- SCHMIDT, T. J.; BRUN, R.; WILLUHN, G.; KHALID, S. A. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, v.68, n.8, p.750-1, 2002.
- SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, n.12, p.4209-10, 2006.
- SECOR, W. E.; MEITES, E.; STARR, M. C.; WORKOWSKI, K. A. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.90, n.5, p.800-804, 2014.
- SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, n.2, p.238-44, 2008.
- SILVA, D. H. S.; VIEGAS JR., C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Spectaline, cassine and semi-synthetic analogues as potential candidate drugs for the treatment of Alzheimer disease. *Revista Virtual de Quimica*, v.2, n.1, p.38-46, 2010a.
- SILVA, G. N.; SCHUCK, D. C.; CRUZ, L. N.; MORAES, M. S.; NAKABASHI, M.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R.; GNOATTO, S. C. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. *Tropical Medicine and International Health*, v.20, n.1, p.29-39, 2015.
- SILVA, G. N.; MARIA, N. R.; SCHUCK, D. C.; CRUZ, L. N.; DE MORAES, M. S.; NAKABASHI, M.; GRAEBIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R.; GNOATTO,

- S. C. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria Journal*, v.1289, 2013.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F. d.; GOMES, A. P. d. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.24441-453, 2010b.
- SINGH, B. N.; HAYES, G. R.; LUCAS, J. J.; SOMMER, U.; VISEUX, N.; MIRGORODSKAYA, E.; TRIFONOVA, R. T.; SASSI, R. R.; COSTELLO, C. E.; FICHOROVA, R. N. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconjugate Journal*, v.26, n.1, p.3-17, 2009.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging infectious diseases*, v.7, n.6, p.927-32, 2001.
- SUTCLIFFE, S.; NEACE, C.; MAGNUSON, N. S.; REEVES, R.; ALDERETE, J. F. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis - a proposed molecular mechanism. *PLoS Pathogens*, v.8, n.8, p.e1002801, 2012.
- TAKETA, A. T. C.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G.; PIRES, V. S.; SCHENKEL, E. P.; GUILLAUME, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. *Journal of Natural Products*, v.67, n.10, p.1697-1700, 2004.
- TAPONDJOU, L. A.; NYAA, L. B.; TANE, P.; RICCIUTELLI, M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; LUPIDI, G.; PONOU, B. K.; BARBONI, L. Cytotoxic and antioxidant triterpene saponins from *Butyrospermum parkii* (Sapotaceae). *Carbohydrate Research*, v.346, n.17, p.2699-704, 2011.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T.; BAUMVOL, I. J.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, n.1, p.327-35, 2011.
- TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Tannins possessing

- bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PLoS One*, v.8, n.6, p.e66257, 2013.
- VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Diseases*, v.197, n.4, p.548-54, 2008.
- VIEIRA, P. B.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. *Parasitology Research*, v.114, n.4, p.1249-61, 2015.
- VIEIRA, P. B.; BORGES, F. P.; GOTTARDI, B.; STUEPP, C.; LARRÉ, A. B.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Analysis of microtubule cytoskeleton distribution using a fluorescent taxoid in two trichomonadid protozoa: *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus*. *Experimental Parasitology*, v.119, n.1, p.186-191, 2008.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v.39, n.1, p.71-5, 2000.
- WANG, H.; LIU, T.; SONG, L.; HUANG, D. Profiles and alpha-amylase inhibition activity of proanthocyanidins in unripe *Manilkara zapota* (chiku). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.12, p.3098-104, 2012.
- WANG, S. R.; FANG, W. S. Pentacyclic triterpenoids and their saponins with apoptosis-inducing activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.9, n.16, p.1581-96, 2009.
- WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9. *Reproductive health matters*, v.20, n.40, p.207-209, 2012.



**ANEXOS**





## 11. Anexo

### 11.1. Anexo 1 – Artigos e capítulos de livros publicados durante a vigência do doutorado

Vieira, P. B., Brandelli, C. L. C., Verissimo, C. M., Tasca, T. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. *Revista HCPA (Online)*, **2012**, 32, 58-70.

Rocha, T. D.; Vieira P. B.; Gnoatto S. C.; Tasca T.; Gosmann G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research*, **2012**, 110(6), 2551-2556.

Brandelli, C. L. C.; Vieira P. B.; Macedo A. J.; Tasca T. Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbya;-Guarani indigenous group in Brazil. *BioMed Research International*, **2013**, 20137.

Cargnin, S. T.; Vieira P. B.; Cibulski S.; Cassel E.; Vargas R. M. F.; Montanha J.; Roehe P.; Tasca T.; von Poser G. L. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitology International*, **2013**, 62(2), 112-117.

Frasson, A. P., Vieira, P. B., Tasca, T. Involvement of extracellular ATP and derivates in *Trichomonas vaginalis* infection. In: Ebert Kuester, Gisa Traugott. Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. 1ed. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc., **2013**, p 187-196

Innocente, A. M.; Vieira P. B.; Frasson A. P.; Casanova B. B.; Gosmann G.; Gnoatto S. C. B.; Tasca T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. *Parasitology Research*, **2014**, 113(8), 2933-2940.

Vieira, P. B.; Silva, N. L. F.; Kist, L. W.; Oliviera, G. M. T.; Bogo, M. R.; De Carli, G. A.; Macedo, A. J.; Tasca, T. Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, **2015**, 110(2), 201-208.