

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

**Triterpenos obtidos de fontes naturais: semissíntese, citotoxicidade e  
atividade antiprotozoária**

SIMONE TASCA CARGNIN

PORTO ALEGRE, 2017



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

**Triterpenos obtidos de fontes naturais: semissíntese, citotoxicidade e  
atividade antiprotozoária**

Tese apresentada por **Simone Tasca Cargin** para  
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

PORTO ALEGRE, 2017.

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 03/03/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Sandra Haas

Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Cargnin, Simone Tasca  
Triterpenos obtidos de fontes naturais:  
semissíntese, citotoxicidade e atividade  
antiprotzoária / Simone Tasca Cargnin. -- 2017.  
178 f.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Ácido ursólico. 2. Ácido betulínico. 3. Antiprotzoários. 4. Relação estrutura-atividade. 5. Nanotecnologia. I. Cristina Baggio Gnoatto, Simone, orient. II. Título.

*“Sonhe alto, pense em coisas boas, trate bem as pessoas,  
trabalhe duro, e tenha grandes resultados. ”*



## RESUMO

A nível mundial, os protozoários *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* são responsáveis por um grande número de infecções parasitárias, com maior destaque para a malária, com 438.000 mortes anuais. A problemática envolvida no combate a estas infecções está no seu tratamento, especialmente pela resistência dos parasitos aos fármacos comumente utilizados. Portanto, considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas, este trabalho, através da abordagem da valorização de resíduos, do uso de produtos naturais como fonte de moléculas bioativas e da utilização da ferramenta semissíntese, visou à obtenção de compostos com atividade antiprotozoária, especialmente atividade antimalárica. Os compostos naturais ácidos ursólico (AU) e betulínico (AB) foram extraídos do subproduto de uma indústria de suco de maçã (*Malus domestica*) e das cascas do *Platanus acerifolia*, respectivamente, e foram planejados novos derivados por modificação nas posições C-3 e C-28. Duas séries de derivados do AU e AB foram preparadas e identificadas, totalizando 24 compostos, que foram avaliados frente à cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2), e frente a *T. vaginalis* e *L. amazonensis*. Os compostos modificados apenas em C-3 foram os mais ativos contra os três protozoários. O composto ácido 3 $\beta$ -acetil betulínico (100  $\mu$ M) reduziu a viabilidade de trofozoítos de *T. vaginalis* em cerca de 74%, e o ácido 3 $\beta$ -isobutíril ursólico (100  $\mu$ M) inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* em cerca de 55%. De forma mais significativa, o ácido 3 $\beta$ -butiril betulínico apresentou relevante atividade antimalárica, IC<sub>50</sub>=3,4  $\mu$ M. Além disso, os compostos não apresentaram significativa citotoxicidade frente a células de mamíferos (VERO) e células de hepatoma humano (HepG2), apresentando alto índice de seletividade aos parasitos. Nanoemulsões e nanocápsulas de núcleo lipídico do composto 3 $\beta$ -butanoil betulínico foram desenvolvidas com sucesso através do método de nanoemulsificação espontânea e nanoprecipitação, respectivamente, e o método CLAE-UV se mostrou adequado para a quantificação do derivado triterpênico nas nanoestruturas. Apesar de apresentar atividade antimalárica *in vitro*, o composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico livre e incorporado na nanoemulsão não apresentou atividade no modelo *in vivo*, não apresentando, portanto, correlação *in vitro* - *in vivo*. Isto ocorreu, provavelmente, devido à baixa solubilidade do composto, que não alcançou o sítio ativo em uma concentração

satisfatória para sua ação. De forma geral, os dados obtidos neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de baixo custo, visto que o aproveitamento de resíduos, assim como a utilização de produtos naturais e de processos de semissíntese são estratégias pouco onerosas. Ainda, mostramos de forma inédita a viabilidade da incorporação de compostos triterpênicos em sistemas nanocarreadores biodegradáveis (nanoemulsões e em nanocápsulas de núcleo lipídico), utilizando nanoprecipitação, uma metodologia simples, eficaz e reprodutível.

**Palavras-chaves:** Ácido ursólico. Ácido betulínico. Relação estrutura-atividade. Antiprotozoários. Antimalárico. Nanotecnologia.



## ABSTRACT

The protozoans *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania amazonensis* and *Plasmodium falciparum* are responsible for a large number of parasitic infections worldwide, especially malaria, with 438,000 deaths annually. The main problems involved in the combat of these infections involve the treatment, especially by the resistance of parasites to commonly used drugs. Therefore, considering the need for new therapeutic alternatives, this work, through the recovery of waste, the use of natural products as a source of bioactive molecules and the use of semisynthesis tool, aimed to obtain compounds with antiprotozoal activity, particularly antimalarial activity. The ursolic acid (UA) was isolated from apple pomace (*Malus domestica*) obtained from a local juice manufacture, and betulinic acid (BA) from barks of *Platanus acerifolia*, and these compounds were modified at C-3 and C-28 positions. Two series of UA and BA derivatives were prepared and identified, totaling 24 compounds, which were tested against the *P. falciparum* chloroquine resistant strain (W2), *T. vaginalis* and *L. amazonensis*. Against all protozoans, compounds only modified at C-3 were the most active. The compound 3 $\beta$ -acetyl betulinic acid (100  $\mu$ M) reduced the trophozoites viability of *T. vaginalis* nearly 74% and 3 $\beta$ -isobutyryl ursolic acid (100  $\mu$ M) inhibited the growth promastigotes of *L. amazonensis* by 55%. More significantly, the 3 $\beta$ -butyryl betulinic acid showed significant antimalarial activity,  $IC_{50} = 3.4 \mu$ M. Moreover, the compounds did not show significant toxicity against mammalian cells (VERO) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells, demonstrating high selectivity index towards parasites. Nanoemulsions and lipid-core nanocapsules of the compound 3 $\beta$ -butanoyl betulinic were successfully developed by spontaneous nanoemulsification and nanoprecipitation method, respectively, and HPLC-UV method was adequate for the quantification of the triterpene derivative in the nanostructures. In spite of the *in vitro* antimalarial activity, the compound 3 $\beta$ -butanoyl betulinic acid free and incorporated in the nanoemulsion showed no activity in the *in vivo* model, not presenting *in vitro* - *in vivo* correlation. This was probably due to the low solubility of the compound, which not reached the active site in a concentration satisfactory for its action. Overall, the data obtained in this study contribute to the development of new and low cost therapeutic alternatives, since the utilization of wastes, as well as the use of natural products and semisynthesis process are inexpensive strategies. In addition, it was demonstrated in an

unprecedented way the feasibility of the incorporation of triterpenic compounds in biodegradable nanocarrier systems (nanoemulsions and lipid-core nanocapsules) using nanoprecipitation, a simple, effective and reproducible methodology.

**Keywords:** Ursolic acid. Betulinic acid. Structure-activity relationship. Antiprotozoal. Antimalarial. Nanotechnology.

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>II. OBJETIVOS</b>	
II.1. OBJETIVO GERAL .....	19
II. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>III. REVISÃO DA LITERATURA</b>	
III. 1. Doenças parasitárias .....	23
III. 1.1. Malária .....	23
III. 1.2. Leishmaniose .....	26
III. 1.3. Tricomoníase .....	29
III. 2. Produtos naturais como fonte de novos antiparasitário.....	32
III. 3. Triterpenos pentacíclicos: aspectos gerais .....	33
III. 4. Nanotecnologia: aplicação em triterpenos pentacíclicos.....	35
<b>IV. CAPÍTULOS</b>	
IV. Capítulo 1. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties .....	45
IV. Capítulo 2. Semisynthesis, cytotoxicity, antimalarial evaluation and structure-activity relationship of two series of triterpene derivatives .....	61
IV. Capítulo 3 – Evaluation of triterpenes derivatives in the viability of <i>Leishmania amazonensis</i> and <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	95
IV. Capítulo 4 – Development and validation of HPLC-UV method for quantification of betulinic acid derivative-loaded nanocarriers and antimalarial evaluation .....	109
IV. Capítulo 5 – Effective Approach to Semi-Synthesis of Lupane and Ursane Brominated Derivatives and its Effects on Viability of <i>Leishmania amazonensis</i> ....	133
<b>V. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	153
<b>VI. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	163
<b>VII. REFERÊNCIAS</b> .....	167
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	175





## **I. INTRODUÇÃO**



Doenças infecciosas são causadas por diversos microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos, vírus e parasitos, e representam um grande problema de saúde pública mundial, provocando altas taxas de morbi-mortalidade e um grande impacto econômico. Cerca de 9 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência destas infecções, muitas delas crianças menores de 5 anos. Além disso, milhões de pessoas acometidas sofrem prejuízos na qualidade de vida (DALYs, do inglês *disability-adjusted life year*), com índice de 6.111,9 DALYs (tempo de vida perdido pela população, seja com morte prematura, seja com doença debilitante (CDC, 2015; WHO, 2015).

Dentre as doenças parasitárias, os protozoários são responsáveis por diversas infecções humanas, como tricomoníase, malária e leishmaniose. A nível mundial, essas infecções acometem um grande número de pessoas, com maior destaque está a malária, com 438,000 mortes anuais (WHO, 2015). Embora pertencentes ao reino Protista, esses parasitos apresentam diferentes classificações taxonômicas. Desta forma, apresentam distintos perfis fisiológicos e bioquímicos, assim como diferentes ciclos de vida, provocando infecção em diferentes partes do organismo do hospedeiro. O flagelado *Trichomonas vaginalis* infecta epitélio do trato geniturinário, *Leishmania* infecta macrófagos, causando lesões na pele, mucosas ou vísceras, e *Plasmodium*, causador da malária, tem como alvo principal as hemácias humanas. Essa diversidade também se reflete no tratamento dessas infecções, visto que os fármacos utilizados no combate às infecções são diferentes, atuando em alvos distintos dos parasitos. Todos os fármacos utilizados no tratamento destas infecções apresentam contraindicações, efeitos adversos e, de forma mais problemática, todos apresentam casos de resistência reportados (KULDA, 1999; RANG e DALE, 2011; ARIEY et al., 2014; RAJASEKARAN e CHEN, 2015). Frente as dificuldades encontradas diante das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento dessas parasitoses, pesquisas de novos compostos ativos, principalmente contra isolados resistentes, sem apresentar toxicidade a células humanas, são de grande relevância.

A natureza apresenta uma diversidade de moléculas bioativas, com estruturas químicas originais que podem ser promissoras não só como fármacos, mas também como fonte de agentes terapêuticos inovadores após manipulação química (DECORTE, 2016). Considerando o potencial dos produtos naturais (PN) e a necessidade de alternativas terapêuticas antiparasitárias eficientes e de baixo custo, houve um aumento importante no número de publicações científicas abrangendo esses tópicos nas últimas décadas (WEB OF SCIENCE, 2016).

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado a estratégia do uso de PN na busca de novos agentes terapêuticos. Focamos na obtenção de dois compostos triterpênicos, o ácido betulínico (AB) e o ácido ursólico (AU). O AB é obtido a partir das cascas do *Platanus acerifolia*, o popular Plátano, árvore utilizada como suporte para videiras, encontrada de forma abundante na região do Vale dos Vinhedos (RS). O plátano é uma grande e viável fonte de matéria-prima, visto que suas cascas caem de forma espontânea. O AU está presente em grande quantidade nas cascas da maçã Gala (*Malus domestica*). A maior parte da produção brasileira de maçã se concentra na região sul do Brasil, sendo o RS responsável por 47,4% da produção brasileira (IBGE, 2015). Uma parte dessas maçãs é utilizada para produção de suco, gerando grande volume de resíduo. Pensando na biovalorização deste resíduo, rico em AU, nosso grupo estabeleceu uma metodologia de extração deste composto a partir do resíduo gerado em uma indústria de sucos da região (Tecnovin Ltda). Este tópico foi abordado em uma revisão da literatura (apresentada no Capítulo 1), onde também discutimos as atividades biológicas mais relevantes reportadas para o AU nos últimos 5 anos, destacando assim, seu potencial terapêutico.

AU e AB têm sido submetidos à modificação química (semissíntese), em dois sítios principais de suas estruturas, nas posições C-3 e C-28. Como resultado, já foram obtidos diversos derivados através de modificações apenas em C-3, e alguns derivados piperazínicos, modificados em C-3 e em C-28. Estes compostos apresentaram promissora atividade antimalárica frente à cepa de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina (CQ) (3D7) (INNOCENTE et al., 2012; SILVA et al., 2013, 2014) e frente à cepa CQ-resistente (FcB1) (GNOATTO et al., 2008a). Ainda, um derivado piperazínico também apresentou interessante atividade tricomonocida frente isolados clínicos e cepa ATCC de *Trichomonas vaginalis* (INNOCENTE et al., 2014b).



A baixa solubilidade em água de triterpenos pentacíclicos (menor que 0,10 µg/mL), e conseqüentemente, sua baixa biodisponibilidade tanto na administração oral como na distribuição sistêmica, é o principal obstáculo de seu uso na terapêutica (JÄGER; LASZCZYK; SCHEFFLER, 2008). O desenvolvimento de sistemas de carreadores de fármacos, como sistemas micro e nanoestruturados, visando melhorar parâmetros farmacocinéticos e resultados terapêuticos desses triterpenos tem sido o foco de algumas pesquisas. Os resultados obtidos são promissores, embora mais estudos sejam necessários para fazer a transposição dos achados para o uso clínico (SOICA et al., 2014).

Considerando o exposto, neste trabalho, objetivou-se o desenvolvimento de novos compostos derivados do AU e do AB através de modificações em C-3 e C-28, visando à atividade antiprotozoária, em especial, à atividade antimalárica frente cepa resistente, visto que nosso grupo obteve resultados promissores e por ser uma doença com alta morbi-mortalidade. Na posição C-3, uma cetona e alguns ésteres foram inseridos, e em C-28, grupos metila e imidazol foram incorporados. Os compostos foram avaliados quanto sua ação frente os parasitos patogênicos *Plasmodium falciparum* resistente à CQ (Capítulo 2), *Leishmania amazonensis* e *Trichomonas vaginalis* (Capítulo 3). Para o composto com relevante atividade antimalárica *in vitro*, foram desenvolvidos sistemas nanoestruturados (nanopartículas lipídicas e poliméricas) visando melhorar seu perfil farmacocinético e atividade biológica *in vivo* (Capítulo 4). Além disso, nas posições C-12 do AU e C-30 do AB foi inserido um átomo bromo, e sua semissíntese, elucidação estrutural e atividade leishmanicida foi sucintamente discutida (Capítulo 5).



---

---

## **II. OBJETIVOS**



## II. 1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como principal proposta o desenvolvimento de moléculas com relevante atividade antiprotozoária, em especial, frente o protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária.

## II. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Semissintetizar duas séries de derivados, do AU e do AB, com diferentes modificações em C-3 e em C-3 e C-28;
- Semissintetizar derivados bromados do AU e do AB;
- Avaliar o efeito antiprotozoário *in vitro* de compostos modificados apenas em C-3; e de compostos modificados em C-28, quando diferentes substituintes estão presentes em C-3;
- Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* de derivados bromados;
- Avaliar a citotoxicidade de todos os compostos semissintetizados e estabelecer o índice de seletividade dos compostos ativos;
- Avaliar o efeito de um derivado do AU e de um derivado do AB *in vitro* frente *Plasmodium falciparum* (W2) quando associados a artemisinina;
- Avaliar a ação do composto antimalárico mais promissor sobre as diferentes formas parasitárias do ciclo de vida do *Plasmodium* e, através de docking molecular, avaliar a sua interação como a enzima PfSBU1 do *P. falciparum*;
- Desenvolver sistemas nanoestruturados para o derivado triterpênico semissintético mais promissor e avaliar a atividade antimalárica *in vitro* e em modelo murino - *Plasmodium berghei*, na sua forma livre e nanoestruturado.









### III. 1. Doenças parasitárias

Os protozoários, foco deste estudo, são microrganismos eucariontes e unicelulares, capazes de se multiplicar no hospedeiro humano, podendo ocasionar graves infecções. A sua transmissão pode ser via fecal-oral, sexual, ou através de um vetor, como por exemplo, um inseto (<https://www.cdc.gov/parasites/about.html>). Nesta tese, os protozoários que serão abordados são: *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis* e *Trichomonas vaginalis*.

#### 1.1 Malária

A malária é uma infecção parasitária endêmica em mais de 100 países onde vivem mais de 3,2 bilhões de pessoas. Estima-se que há cerca de 198 milhões de casos por ano e que 438 mil pessoas morrem anualmente em consequência da infecção. A maioria dos casos e mortes ocorre na região africana (88% e 90%, respectivamente), acometendo principalmente crianças com menos de 5 anos de idade. No Brasil, há cerca de 230 mil novos casos por ano, a maioria localizados na Amazônia legal (WHO, 2015).

Os agentes etiológicos da malária são protozoários da família Plasmodidae e do gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies que infectam seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* é a espécie com maior variabilidade genética e mais virulenta, provocando maior número de mortes. No Brasil, *P. vivax* é o responsável pelo maior número de doentes e *P. falciparum* é o que provoca o maior mortalidade ( OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; MANDAL, 2014; WHO, 2015).

A transmissão da malária se dá através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados com *Plasmodium*. O ciclo evolutivo do *Plasmodium* se realiza tanto no mosquito, quanto no homem. A fase humana (assexuada) do ciclo começa com a fase pré-eritrocitária, quando um mosquito infectado pica o humano e os esporozoítos presentes na saliva do mosquito entram na corrente sanguínea. Estas

formas do parasito vão para o fígado, onde invadem os hepatócitos e originam os esquizontes. Nesta forma, os parasitos começam a se dividir, resultando em um grande número de merozoítos, os quais são liberados na corrente sanguínea e invadem as hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico (esquizogonia). Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esquizontes podem permanecer dormentes no fígado (hipnozoítos) durante semanas ou até mesmo durante anos antes de causar novos surtos clínicos (Figura 1) (WHITE et al., 2014; CDC, 2015).

Dentro dos eritrócitos o trofozoíto amadurece, multiplicando-se e fazendo uso da hemoglobina que é degradada por proteases. Os aminoácidos gerados são utilizados para a sobrevivência do parasito, e o heme, que é letal para o parasito, é polimerizado em grânulos insolúveis e não tóxicos de hemozoína (pigmento malárico) (MILLER et al., 2013). Ainda nos eritrócitos, alguns merozoítos originam gametócitos, os quais ao serem ingeridos pelo mosquito iniciam a reprodução sexual (fase sexuada) dentro do intestino do mosquito, onde milhares de esporozoítos são produzidos, migram para as glândulas salivares do mosquito e iniciam um novo ciclo de vida (WHITE et al., 2014; CDC, 2015).

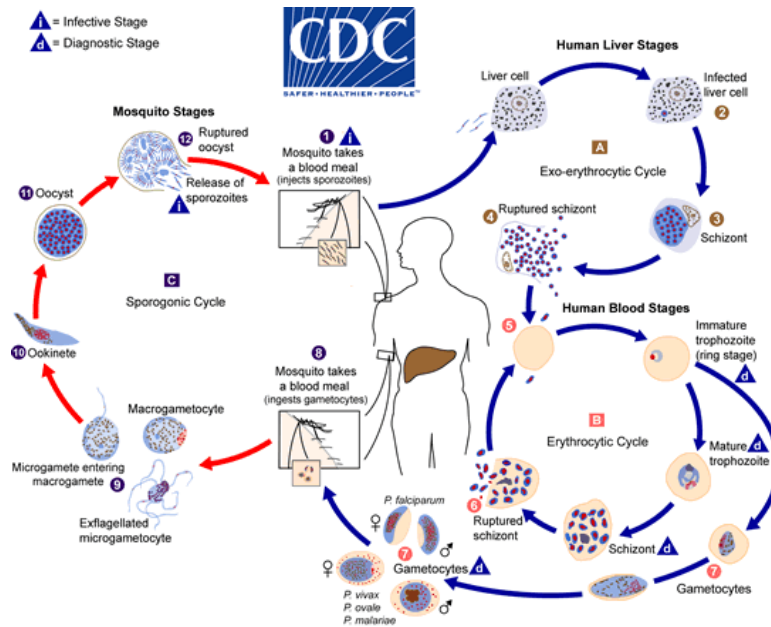
As principais manifestações clínicas da doença são febres recorrentes, cefaléia, mialgias, dores abdominais, vômitos, mal-estar, entre outros, e aparecem cerca de 9 a 14 dias após a picada do mosquito infectado. Se não houver correto diagnóstico e tratamento medicamentoso, ou se os parasitos forem pouco responsivos aos fármacos utilizados, a doença pode progredir rapidamente. Casos fatais podem ocorrer pelo fato dos protozoários destruírem eritrócitos, levando a anemia profunda, ou por causarem entupimento dos capilares que levam sangue para o cérebro e outros órgãos vitais (MANDAL, 2014).

O tratamento da malária é baseado principalmente na interrupção da esquizogonia, responsável pela patogênese e pelos sintomas clínicos da doença. O correto tratamento medicamentoso diminui a morbidade e mortalidade da doença, entretanto, em muitas regiões endêmicas, os doentes não possuem acesso ao diagnóstico e tratamento adequado. Diversos fármacos são utilizados no combate à malária, como artemisinina e seus derivados, cloroquina, sulfadoxina, perimetamina, amodiaquina, lumefantrina, mefloquina, atovaquona, primaquina, doxiciclina, tetraciclina, e clindamicina (MANDAL, 2014; WHO, 2015).

Os antimaláricos atuam em diferentes alvos bioquímicos do parasito. Por exemplo, cloroquina, quinina, lumefantrina e mefloquina inibem a detoxificação do heme; proguanil e sulfadoxina inibem a síntese de folatos; atovaquona atua na mitocôndria do parasito, inibindo a cadeia respiratória; e artemisinina, embora não tenha mecanismo de ação completamente esclarecido, parece gerar radicais livres que levam a morte do parasito por diversas ações, como dano a lipídeos celulares e a membranas do vacúolo digestivo, inativação de proteínas, alquilação do heme e interferência no seu sequestro em cristais (MILLER et al., 2013; GAMO, 2014). Atualmente, a principal estratégia farmacológica proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), envolve a utilização de um ou mais fármacos em conjunto com a artemisinina (ou seus derivados), como artemeter e lumefantrina, artesunato e amodiaquina, artesunato e mefloquina, artesunato e sulfadoxina-pirimetamina. Porém, todos os fármacos utilizados no tratamento da malária apresentam limitações e casos de resistência reportados (GAMO, 2014; WHO, 2015).

O surgimento e a disseminação de casos de resistência aos antimaláricos é um dos maiores obstáculos na erradicação da malária. Durante muito tempo a cloroquina foi utilizada no tratamento da doença, destacando-se pela sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo. No entanto, devido sua larga utilização, houve o surgimento de cepas resistentes. O fármaco de escolha na atualidade, artemisinina, de forma combinada, ainda é bastante eficaz nos casos de malária causada tanto pelo *P. falciparum*, quanto por *P. vivax*. Porém, como monoterapia, o fármaco não é mais indicado pela OMS, visto que há evidências de um considerável declínio na eficácia do medicamento, o que implica no emergente desenvolvimento de cepas resistentes (GAMO, 2014; WHO, 2015).

A terapia antimalárica atual baseia-se no uso de uma restrita variedade de fármacos, sendo o número de diferentes classes estruturais e a diversidade de mecanismos de ação muito limitados (GAMO, 2014). Assim, sabendo-se da limitação do arsenal terapêutico, torna-se de grande importância pesquisas de novas alternativas terapêuticas que suplantem os problemas dos fármacos atuais, atuando por mecanismos de ação alternativos aos usuais e principalmente, que sejam de baixo custo.



**Figura 1** – Ciclo biológico do protozoário *Plasmodium*.

(Fonte: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

## 1.2 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas que afetam principalmente regiões em desenvolvimento, como África, Ásia e América Latina, estando associada à desnutrição, moradia precária, sistema imunológico deficiente, falta de recursos e ainda a mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens e urbanização. Noventa e sete países são endêmicos para a leishmaniose, onde cerca de 900.000 a 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (WHO, 2012).

A leishmaniose é causada por protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, e subgêneros *Sauroleishmania*, *Leishmania* e *Viannia*. A infecção no homem ocorre quando a fêmea de flebotomíneo infectada com formas promastigotas metacíclicas pica o homem. Após a inoculação, as formas promastigotas, que precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro e invadir a célula alvo, são fagocitadas por macrófagos teciduais do hospedeiro e no interior do vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em formas amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Estas amastigotas podem ser liberadas após o rompimento do macrófago e são

capazes de infectar novas células, causando a disseminação do parasito e o desenvolvimento das lesões características das leishmanioses. Quando formas amastigotas são ingeridas pelo flebotomíneo, transformam-se em promastigotas procíclicas e migram para a probócide do inseto, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (Figura 2) (BATES; ROGERS, 2004; CDC, 2015). Cabe destacar que em alguns locais onde a leishmaniose é encontrada em humanos, o ciclo se mantém pela transmissão do parasito para animais, como roedores e cães, que são então considerados reservatórios da doença.

Existem três formas principais de leishmanioses humanas: visceral, cutânea e mucocutânea. Estima-se que o número de novos casos por ano para leishmaniose cutânea varia de aproximadamente 0,7 a 1,2 milhões. Para a leishmaniose visceral, as estimativas do número de casos variam de aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões (CDC, 2016).

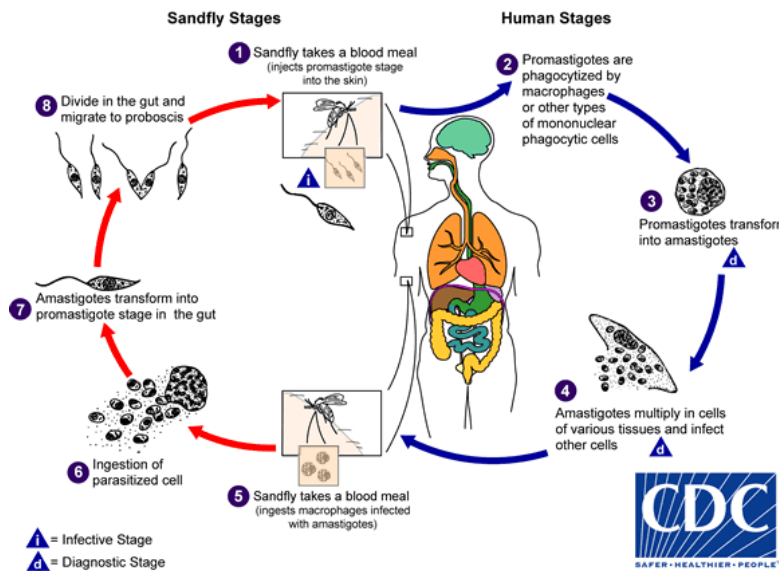
Dependendo do subgênero, espécie e cepa de *Leishmania*, assim como a dose e a qualidade da resposta imune do hospedeiro, a infecção pode permanecer assintomática ou se manifestar como leishmaniose cutânea, difusa, mucocutânea ou visceral. A leishmaniose visceral americana (LVA), também conhecida como Calazar, acomete o sistema linfomonocitário de forma sistêmica grave; e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode apresentar desde um envolvimento cutâneo localizado (leishmaniose cutânea) até uma destruição de grandes extensões das mucosas (leishmaniose mucosa). A forma mucosa é caracterizada pela disseminação do parasito para as áreas da nasofaringe, acompanhada por infecções secundárias, resposta imune hiper-inflamatória e possível deformação da face. Também são encontradas formas disseminadas cutâneas, infiltrativas e não-ulcerosas com caráter evolutivo crônico (leishmaniose cutâneo difusa) que se apresentam em indivíduos anérgicos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Mais de 20 espécies de *Leishmania* podem causar doença em humanos. No Brasil, *L. (Le.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* são as espécies mais amplamente distribuídas, principalmente na região Amazônica, responsáveis pelo desenvolvimento de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (LAINSON; CORBETT, 2004). O conhecimento das espécies infectantes e dados epidemiológicos da doença podem auxiliar no diagnóstico, corroborando com achados laboratoriais. O

correto diagnóstico é importante para o correto tratamento da infecção, que deve ser conduzido de forma individualizada. Se não forem tratados, casos graves (avançados) de leishmaniose podem ser fatais (CDC, 2016).

O tratamento convencional baseia-se no uso de sais antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina. Os principais fármacos utilizados no tratamento são os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metilglucamina. No entanto, além de possuírem alta cardiotoxicidade, o regime de tratamento com estes fármacos é bastante prolongado (injeções diárias por 20-30 dias) e nem sempre efetivo. Como segunda escolha, estão a pentamidina e a anfotericina B, que também apresentam problemas quanto a toxicidade e administração. A anfotericina B lipossomal intravenosa é uma alternativa nos casos de LVA, sendo menos tóxica que a na forma livre, porém muito mais onerosa. Apesar de sua grande prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses ao longo das últimas décadas. Como novidade, em 2014, foi aprovado o uso da miltefosina para LVA por *L. donovani*, e embora existam estudos que mostrem sua eficácia na LTA, no Brasil, ainda não possui registro para uso em humanos (SINGH et al., 2014; CDC, 2016).

A problemática com os fármacos disponíveis abrange o preço, a viabilidade, a segurança, as vias de administração, a eficácia, a toxicidade, os efeitos secundários e ainda, a crescente resistência dos parasitos, particularmente aos antimoniais. Soma-se a estes fatores o fato de pacientes imunodeprimidos não responderem bem ao tratamento, evidenciando assim a necessidade da busca de novas alternativas terapêuticas. Até o momento, não há em estudo um fármaco leishmácida ideal, que apresente um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade, fácil via de administração e que atue por mecanismo de ação alternativo aos usuais. Desta forma, a pesquisa de novas alternativas terapêuticas torna-se fundamental (SINGH et al., 2014).



**Figura 2** – Ciclo biológico do protozoário *Leishmania*.

(Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

### 1.3 Tricomoníase

A tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível de alta prevalência mundial. A infecção é mais comum em mulheres do que em homens, sendo que mulheres mais velhas têm mais probabilidade de adquirir a infecção (CDC, 2016). Estima-se a ocorrência de 276,4 milhões de novos casos por ano, valores superiores à prevalência de outros microrganismos de transmissão sexual, como por exemplo, *Chlamydia trachomatis* (105,7 milhões), *Neisseria gonorrhoeae* (106,1 milhões) e sífilis (10,6 milhões) (WHO, 2012). Além disso, acomete desproporcionalmente populações desfavorecidas e de baixa renda de países em desenvolvimento, fato que classifica a doença como uma infecção parasitária negligenciada, apesar da crescente consciência do seu impacto para a saúde pública (HIRT; SHERRARD, 2014; SECOR et al., 2014).

O agente etiológico da tricomoníase é o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Os tricomonádídeos pertencem a família Trichomonadidae, e são protozoários flagelados anaeróbios facultativos caracterizados pela presença de organelas produtoras de hidrogênio molecular, os hidrogenossomos, correspondentes às mitocôndrias dos organismos aeróbios (ADL, et al., 2012). A reprodução deste patógeno é assexuada

(fissão binária) e a transmissão ocorre na relação sexual, via secreções que contenham as formas trofozoítas do parasito, que residem no trato genital feminino, na uretra e na próstata masculina (CDC, 2016).

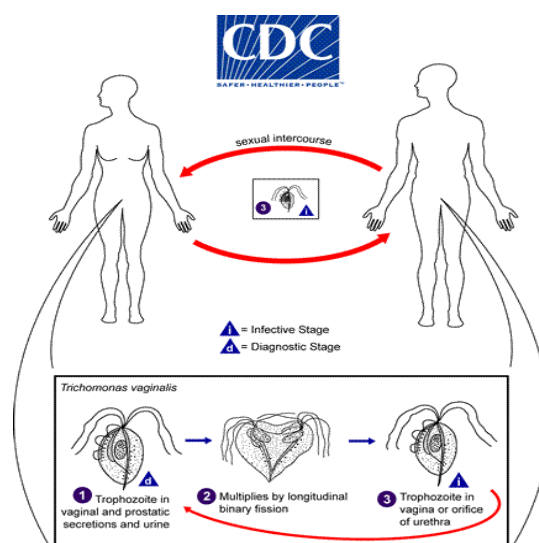
A doença causada pelo *T. vaginalis* apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas. Os sinais e sintomas dependem das condições de cada indivíduo, da agressividade e da carga parasitária infectante (ALDERETE, 2000; MACIEL et al., 2004). Atualmente, 80% dos casos (homens e mulheres) são assintomáticos. Em mulheres, embora ocorra em somente 10-20% das pacientes infectadas, o sintoma clássico é corrimento amarelo, abundante, espumoso e mucopurulento, além de odor vaginal anormal e prurido vulvar (LEHKER; ALDERETE, 2000). A vagina e a cérvix podem apresentar sintomas inflamatórios específicos para tricomoníase (2 a 5% dos casos), com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical, sinal conhecido como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (MILER et al., 2005).

Além das manifestações clínicas, a persistência e cronicidade da infecção acarretam sérias consequências para a saúde, tornando relevante seu correto diagnóstico e tratamento. As complicações causadas pela infecção pelo *T. vaginalis* incluem gestação com ruptura prematura de bolsa amniótica, trabalho de parto prematuro e baixo peso do recém-nascido (MINKOFF et al., 1984; COTCH et al., 1997), predisposição ao câncer cervical (VIAKKI et al., 2000) e de próstata (SUTCLIFFE et al., 2012) e doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006). Ainda mais relevante é a associação entre a presença do parasito e o aumento do risco a outras doenças sexualmente transmissíveis, especialmente na transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estudos demonstram que a infecção pelo *T. vaginalis* aumenta de 1,5 a 2,7 vezes o risco de aquisição e transmissão do vírus e até quatro vezes o risco de excreção do vírus das células hospedeiras para o ambiente vaginal (VAN DER POOL et al., 2008; WANG et al., 2008). Alguns mecanismos são considerados fatores facilitadores da transmissão do HIV, como os pontos hemorrágicos provocados pelo parasito no epitélio vaginal que se tornam porta de entrada para o vírus, a forte resposta imune desencadeada no hospedeiro que acaba por recrutar células suscetíveis à infecção pelo HIV, como os linfócitos CD4+, e a capacidade do *T. vaginalis* em degradar o inibidor de protease leucocitária secretória que normalmente bloqueia a adesão do vírus às células (GUENTHNER et al., 2005; SHAFIR et al., 2009).



Desde meados de 1954, utiliza-se o metronidazol como fármaco de escolha no tratamento da tricomoníase. O metronidazol é um derivado nitroimidazólico, que penetra na célula através de difusão e tem o grupamento nitro reduzido pela enzima piruvato ferredoxina óxido redutase (PFOR), que em *T. vaginalis* está localizada nos hidrogenossomos. Essa redução produz intermediários instáveis, quimicamente reativos, os quais quelam o DNA e provocam a morte seletiva das células anaeróbias (MENDZ; MÉGRAUD, 2002).

O largo emprego e, muitas vezes, o uso indiscriminado do metronidazol, têm levado a uma emergente seleção de isolados de *T. vaginalis* resistentes. Em 2004, foi aprovado pelo FDA/USA o uso de outro nitroimidazólico para o tratamento da tricomoníase, o tinidazol. Porém, existe a preocupação que ocorram isolados resistentes a este fármaco também, visto que o mesmo possui mecanismo de ação idêntico ao do metronidazol. Somado à problemática da resistência, existem relatos de pacientes que apresentam reação de hipersensibilidade aos nitroimidazóis, além daqueles que podem desenvolver efeitos adversos (náusea e tontura em até 12% dos pacientes) após o tratamento com essa classe de fármacos (CROWELL et al., 2003). Desta forma, surge a necessidade de pesquisas visando à obtenção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da tricomoníase, que preferencialmente atuem por mecanismos distintos aos dos nitroimidazólicos.



**Figura 3** – Ciclo biológico do protozoário *Trichomonas*.

(Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/>)

### III. 2. Produtos naturais como fonte de novos antiparasitários

Como já exposto, dentre as doenças parasitárias, os protozoários são responsáveis por diversas infecções humanas, como por exemplo, malária, leishmaniose e tricomoníase. Um dos obstáculos no combate a essas infecções está no tratamento, sendo imperativo a busca de novas moléculas ativas.

Historicamente, o investimento na pesquisa de novos fármacos antiparasitários tem sido extremamente baixo, porque estas doenças afetam principalmente países subdesenvolvidos, onde a falta de recursos é uma realidade. A descoberta de medicamentos para este fim tem sido conduzida utilizando pouco financiamento e estratégias de baixo risco por parte das indústrias farmacêuticas (FREARSON et al., 2007). Neste sentido, os produtos naturais (PNs) surgem como uma alternativa de baixo custo e facilmente disponível.

Os PNs têm sido utilizados no tratamento e alívio de doenças desde o início da história humana. Baseados no conhecimento popular, estudos científicos na área vêm sendo desenvolvidos há séculos, e ao longo destes anos, têm sido uma fonte importante no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (HARVEY, 2008). Em uma extensa revisão de novos fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2014, verificou-se que, ao longo de mais de 30 anos, os PN têm desempenhado um papel de grande destaque na descoberta de novos fármacos, visto que 30% dos novos fármacos eram PN ou seus derivados, e outros 14% foram sintetizados a partir de um farmacóforo de origem natural. Cerca de 20% das 1562 novas entidades químicas são antibacterianos, antifúngicos, antivirais ou antiparasitários. Dentre eles, em menor proporção (5%), encontram-se os antiparasitários, nos quais apenas 16 novos medicamentos foram introduzidos no mercado. Destes, cabe destacar que mais de 60% são produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A quinina e a artemisinina, isolados da *Cinchona* spp. e *Artemisia annua* respectivamente, são exemplos de princípios ativos obtidos de PN, que em conjunto com outras moléculas, desempenharam um papel crucial no tratamento de pacientes em áreas malarígenas (WELLS, 2011). Dentre as classes de metabólitos secundários vegetais que apresentam atividade antiprotozoária, as principais são compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (atividade anti-*T. vaginalis*) (VIEIRA et al., 2015),

somados a chalconas, saponinas e quinonas (atividade antimalárica e leishmanicida) (SEN; CHATTERJEE, 2011; WINK, 2012). Os terpenos, em especial, são uma classe de metabólitos passíveis de modificação química e que possuem um grande espectro de atividades biológicas (REDDY; COUVREUR, 2009), sendo promissores principalmente como antimaláricos (SILVA et al., 2015).

Sabendo-se do potencial dos PNs e da necessidade de alternativas terapêuticas antiparasitárias eficientes e de baixo custo, houve um aumento expressivo no número de publicações científicas abrangendo esses tópicos nas últimas décadas. Destacam-se os últimos 10 anos, visto que o número de citações aumentou em mais de seis vezes. Neste período, o Brasil, país de rica biodiversidade, contabilizou o maior número de publicações (21% do total de publicações). O interesse em pesquisas especificamente com triterpenos como antiparasitários, neste mesmo período, também tem aumentado, com o Brasil ocupando o segundo lugar no número de publicações (WEB OF SCIENCE, 2016). Pelas propriedades já descritas e por ser abundante em fontes naturais encontradas no sul do Brasil, nosso grupo de pesquisa selecionou os fitocompostos da classe triterpenos para estudo de atividades antiparasitárias.

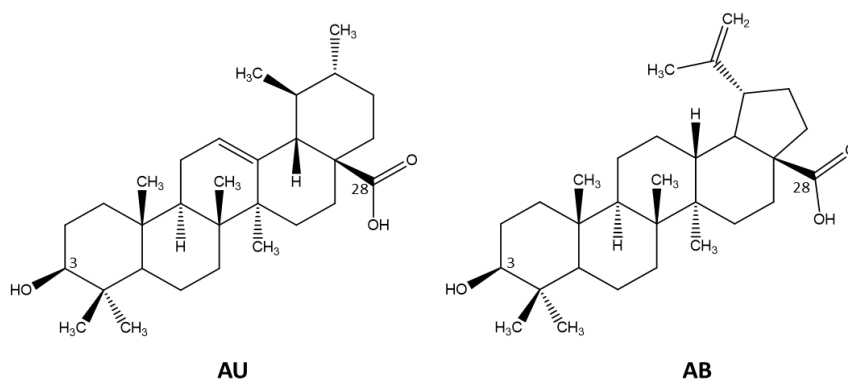
### **III. 3. Triterpenos pentacíclicos: aspectos gerais**

Em plantas, os terpenos (também conhecidos como terpenóides ou isoprenóides) constituem um conjunto de metabólitos quimicamente diversos, de ocorrência natural, associado ao desenvolvimento fisiológico e com interações mutualistas e antagônicas planta-herbívoros e planta-ambiente. Até o momento, mais de 30.000 compostos terpênicos foram caracterizados, constituindo o maior grupo de produtos naturais. Os compostos podem ser lipofílicos ou hidrofílicos, cíclicos ou acíclicos e voláteis ou não-voláteis, e são classificados pelo número de unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) e de átomos de carbono, por exemplo, mono-, sesqui-, di- e triterpenos (2:10, 3:15, 4:20 e 5:30, respectivamente). Nas plantas, mono- e sesquiterpenos são predominantemente encontrados em óleos essenciais, e terpenos superiores, como triterpenos, principalmente em bálsamos e resinas (MUFFLER et al., 2011; MEWALAL et al., 2016;).

Os triterpenos são normalmente sintetizados em tecidos vegetais específicos e/ou em determinadas fases de desenvolvimento das plantas. A produção também pode ser induzida em resposta ao estresse biótico ou abiótico, ou a elicitores bióticos (THIMMAPPA et al., 2014). Os triterpenos pentacíclicos são os mais abundantes, podendo ser divididos em três principais grupos: oleano, ursano e lupano, os quais possuem como principais representantes os ácidos oleanólico, ursólico e betulínico, respectivamente. Estes compostos são encontrados em diversas espécies vegetais, sendo que as folhas de oliveiras são a principal fonte de ácido oleanólico, o bagaço de maçã Gala de ácido ursólico e as cascas do *Platanus* a principal fonte de ácido betulínico (JÄGER et al., 2009).

Dentre esses triterpenos pentacíclicos, o ácido ursólico (AU) e o ácido betulínico (AB) possuem relevantes atividades biológicas (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005; WOZNIAK; SKAPSKA; MARSZALEK, 2015), e possuem dois locais em suas estruturas que são de fácil acesso para modificações químicas, o carbono 3 (C-3) e o carbono 28 (C-28) (Figura 4). Assim, utilizando ferramentas de semissíntese, modificações estruturais podem ser realizadas a fim de potencializar seus efeitos biológicos.

De posse destas informações, somando-se o fato de estes compostos serem encontrados em espécies vegetais facilmente disponíveis e economicamente viáveis no estado do Rio Grande do Sul (RS), o AU e o AB foram selecionados para estudo pelo nosso grupo de pesquisa. O AU foi extraído do resíduo de uma indústria de sucos de maçã, e o AB das cascas de *Platanus acerifolia*, ambos obtidos de forma abundante e não onerosa na região do Vale dos Vinhedos, cidade de Bento Gonçalves, RS.



**Figura 4** – Estrutura química do ácido ursólico (AU) e do ácido betulínico (AB).

(Fonte: ChemDraw Ultra)

### **III. 4. Nanotecnologia: aplicação em triterpenos pentacíclicos**

A nanotecnologia é a ciência que estuda e manipula a matéria numa escala molecular e atômica. Nessa tecnologia, trabalha-se com pequenas estruturas (< 1.000 nanômetros de diâmetro) projetadas para apresentar propriedades específicas. Na área da saúde, pode ser aplicada para veiculação de fármacos, visto as vantagens apresentadas frente os fármacos em sua forma livre, como maior comodidade, eficiência e redução de efeitos adversos (DIMER et al., 2013; SHI et al., 2010).

A fim de suplantar algumas limitações de produtos naturais em aplicações clínicas, especialmente quanto à biodisponibilidade e bioatividade, os nanocarreadores surgem como uma ferramenta bastante eficaz. Além disso, podem proteger o fármaco frente a degradação, aumentar a permeação, aumentar e controlar o tempo de permanência na circulação sistêmica, e ainda, promover seletividade e diminuir a toxicidade (LIU; FENG, 2015; ZORZI et al., 2015).

A seleção do nanocarreador se dá de acordo com suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento. Na terapêutica, os principais nanocarreadores podem ser divididos em dois grandes grupos, as nanopartículas lipídicas, englobando lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas; e as nanopartículas poliméricas, envolvendo nanocápsulas e nanoesferas (Figura 5) (DIMER et al., 2013; LIU; FENG, 2015; ZORZI et al., 2015).

As nanoemulsões (O/A) são dispersões estáveis de reduzido tamanho de gota (tamanho nanométrico), compostas por óleo, água, e um ou mais agentes emulsionantes. A fase oleosa (orgânica) normalmente é selecionada com base na solubilidade do fármaco a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida. Diversos óleos podem ser utilizados, como triglicerídeos de cadeia longa (TCL) - óleos de rícino, soja e oliva, e triglicerídeos de cadeia média (TCM) - triglicérides do ácido cáprico e caprílico. Na interface, como agentes emulsificantes, podem ser utilizados fosfolipídeos, polissorbatos e monooleato de sorbitano (BRUXEL et al., 2012).

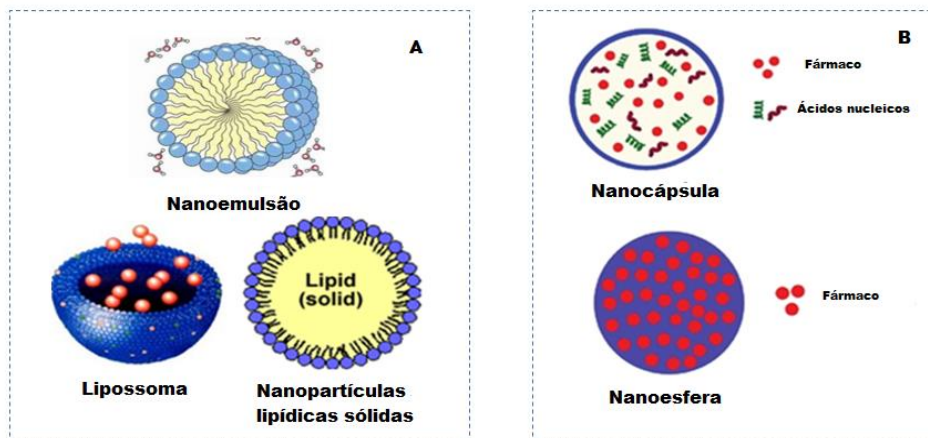
As nanocápsulas de núcleo lipídico são constituídas por um invólucro polimérico disposto envolvendo um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. A escolha de óleos e emulsificantes seguem os mesmos critérios usados no desenvolvimento das nanoemulsões. Diversos polímeros podem ser utilizados, desde polímeros naturais como gelatina, até polímeros sintéticos, como poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácido polilático, poli (ácido glicólico) e poli (ácido glicólico-co-ácido lático), sendo importante que o polímero selecionado seja biocompatível e biodegradável. A poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), por exemplo, é um poliéster alifático sintético, semicristalino, hidrofóbico, biodegradável, biocompatível, atóxico e de baixo custo, e pode ser administrado pela via endovenosa (DASH; KONKIMALLA, 2012; SCHAFFAZICK et al., 2006).

Existem diversas técnicas de obtenção das nanoestruturas. A metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa coordenado pela professora Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres (Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS) é simples e a formação de nanoemulsões ou nanocápsulas de núcleo lipídico ocorre instantaneamente no momento em que a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa. Há anos, esta metodologia tem sido empregada com sucesso no desenvolvimento de diversas nanoestruturas, sendo, portanto, uma metodologia já validada, com formulações bem caracterizadas (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; VENTURINI et al., 2011).

Sabe-se que a principal desvantagem no uso terapêutico de triterpenos pentacíclicos é a sua baixa solubilidade aquosa, o que pode limitar a biodisponibilidade e a farmacocinética *in vivo*, reduzindo a eficácia. O uso de micro e nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas e poliméricas constituem estratégias utilizadas para obter um aumento da biodisponibilidade de triterpenóides. Para o ácido ursólico e para o ácido betulínico, lipossomas e nanopartículas poliméricas utilizando como polímeros metóxi-polietileno glicol e poli (ácido lático-co-ácido glicólico), e sistemas de complexação com ciclodextrinas já foram desenvolvidos, apresentando melhora nas suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (SOICA et al., 2014).

Com o processo de obtenção de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico utilizando PCL já bem delineado e caracterizado por Guterres e colaboradores, o desenvolvimento de sistemas nanométricos inovadores para derivados

triterpênicos de alta lipofília parece uma estratégia bastante promissora a fim de melhorar a biodisponibilidade e a farmacocinética *in vivo* de triterpenos pentacíclicos.



**Figura 5** – (A) Nanopartículas lipídicas; (B) Nanopartículas poliméricas.





Para melhor entendimento, os resultados dessa tese estão apresentados na forma de manuscritos, organizados de acordo com as instruções dos respectivos periódicos. No CAPÍTULO 1 é apresentado o manuscrito de revisão da literatura “**Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties**”, publicado no periódico Food Chemistry (JCR: 4,052). No CAPÍTULO 2 é apresentado o manuscrito “**Semisynthesis, cytotoxicity, antimalarial evaluation and structure-activity relationship of two series of triterpene derivatives**”, a ser submetido à publicação no periódico Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (JCR: 2,486). No CAPÍTULO 3 é apresentado o manuscrito “**Evaluation of triterpenes derivatives in the viability of *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis***”, submetido à publicação na revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (JCR: 0,24). No CAPÍTULO 4, é apresentado o manuscrito “**Development and validation of HPLC-UV method for quantification of betulinic acid derivative-loaded nanocarriers and antimalarial evaluation**” a ser submetido à publicação no periódico Chemistry Central Journal (JCR: 2,55). No CAPÍTULO 5, é apresentado o manuscrito “**Effective approach to semi-synthesis of lupane and ursane brominated derivatives and its effects on viability of *Leishmania amazonensis***”, submetido à publicação no periódico Letters in Organic Chemistry (JCR: 0,756).







**IV. CAPÍTULO 1** – O presente Capítulo é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 44-57.

Simone Tasca Carginin, Simone Baggio Gnoatto. **Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties.** Food Chemistry 220 (2017) 477–489 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.029>).

#### **RESUMO DOS RESULTADOS:**

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), grandes quantidades de maçã são produzidos anualmente em todo mundo. Uma parte dessas maçãs se destina a produção de suco, gerando, diariamente, uma grande quantidade de resíduo. Embora este resíduo apresente uma grande diversidade de fitocompostos, ele tem sido muito pouco explorado. Neste capítulo, demonstramos o potencial do resíduo da indústria de suco de maçã como fonte economicamente viável de moléculas bioativas, em especial, do triterpeno pentacíclico ácido ursólico (AU). Destacamos a biovalorização deste resíduo, apresentando uma metodologia de extração do AU e discorremos sobre publicações dos últimos 5 anos a respeito das principais propriedades farmacológicas do AU.



**IV- CAPÍTULO 2** – O presente Capítulo é constituído por artigo científico a ser submetido ao periódico *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 60-91.

Simone Tasca Cargnin, Andressa Finkler Staudt, Daniel de Medeiros Sol Sol, Ana Paula de Azevedo dos Santos, Patrícia Soares de Maria de Medeiros, Fernando Berton Zanchi, Grace Gosmann, Antonio Puyet, Carolina Bioni Garcia Teles, Simone Baggio Gnoatto. **Semisynthesis, cytotoxicity, antimalarial evaluation and structure-activity relationship of two series of triterpene derivatives**

#### **RESUMO DOS RESULTADOS:**

Neste capítulo, duas séries de derivados triterpênicos foram obtidos através de substituições nas posições C-3 e C-28 da estrutura do ácido ursólico (AU) e do ácido betulínico (AB), totalizando 24 compostos. Na posição C-3, uma cetona e alguns ésteres foram inseridos, e partindo destes derivados, na posição C-28, o ácido carboxílico foi esterificado com grupos metila e imidazol. Os compostos foram identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, e foram submetidos a testes de citotoxicidade (células VERO e HepG2) e atividade antimalárica frente à cepa de *Plasmodium falciparum* CQ-resistente (W2), utilizando o método de HPRII. O composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico apresentou relevante atividade *in vitro* tanto em cepas de *P. falciparum* CQ- resistente (W2) e CQ- sensível (3D7) (previamente testado) apresentando baixo índice de resistência cruzada; não apresentou citotoxicidade frente células VERO e HepG2, obtendo assim o melhor índice de seletividade. Ainda, observamos que atua principalmente na fase do ciclo do parasito onde se encontra na forma de trofozoítos jovens (anel), e que atua de forma aditiva com a artemisinina, fármaco de referência no tratamento da malária. Através do *docking* molecular, verificamos que possui ótima energia de ligação com a enzima PfSUB1, e em ensaio *in vitro* com a enzima SUB1, apresentou modesta atividade. Concluimos, portanto, que o composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico é um triterpeno que possui potencial como protótipo antimalárico.

**IV - CAPÍTULO 3** – O presente Capítulo é constituído por artigo científico submetido à publicação no periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 94-106.

Simone Tasca Cargnin; Andressa Finkler Staudt; Camila Menezes; Ana Paula de Azevedo; Saara Neri Fialho; Tiana Tasca; Carolina Bioni Garcia Teles; Simone Baggio Gnoatto. **Evaluation of triterpenes derivatives in the viability of *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*.**

#### **RESUMO DOS RESULTADOS:**

Considerando o potencial dos produtos naturais e a necessidade de alternativas mais eficazes e seguras para o tratamento da tricomoníase e a da leishmaniose, neste capítulo, avaliamos a ação de duas séries de derivados triterpênicos com diferentes modificações nas posições C-3 e C-28 do ácido ursólico (AU) e ácido betulínico (AB) na viabilidade de *Trichomonas vaginalis* (ATCC 30236) e *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/67/BR/PH8). Os compostos modificados apenas em C-3 foram os mais ativos. O composto AB acetilado em C-3 reduziu a viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* em cerca de 74%, seguido pelos compostos oxidados em C-3 (55% de redução). O composto 3 $\beta$ -isobutil ácido ursólico inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* em 55%, e a betulina, triterpeno de núcleo lupano precursor biossintético do AB, apresentou inibição de 68,5%. Baseados nos dados de relação estrutura-atividade dos compostos obtidos neste estudo e dados obtidos na literatura, outros triterpenos com propriedades trichomonicida e leishmanicidas mais eficazes poderão ser desenvolvidos.



**IV - CAPÍTULO 4** – O presente Capítulo é constituído por artigo científico a ser submetido a publicação no periódico Chemistry Central Journal, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 108-129.

Simone Tasca Cargnin, Stela Regina Ferrarini, Jacqueline Kerkhoff, Andressa Finkler Staudt, Suellen Alves Costa, Marcinete Latore Almeida, Daniel Sol Sol de Medeiros, Adilson Sinhorin, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Adriana Pohlmann, Carolina Bioni Garcia Teles, Simone Baggio Gnoatto. **Development and validation of HPLC-UV method for quantification of betulinic acid derivative-loaded nanocarriers and antimalarial evaluation.**

#### **RESUMO DOS RESULTADOS:**

Neste capítulo, apresentamos o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados do ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico (AB-B), nanoemulsão e nanocápsula de núcleo lipídico, através do método de emulsificação espontânea e nanoprecipitação. Validamos um método para identificação e quantificação do composto nas nanoestruturas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), o qual apresentou-se específico, preciso, linear, reprodutível e adequado para mensurar o teor e a eficiência de encapsulação do composto. Ainda, avaliamos a atividade antimalárica do composto livre e na nanoemulsão. O composto AB-B livre e nanoestruturado apresentou promissora atividade frente *P. falciparum in vitro*, e embora não tenha apresentado toxicidade, não conseguiu reduzir a parasitemia de animais infectados com *P. berghei* (ANKA) quando administrado pela via intraperitoneal. A ação dos fármacos depende da concentração que chega ao sítio ativo, AB-B apresenta baixa solubilidade em pH fisiológico (7,4-7,5), evidenciado no ensaio de solubilidade do composto em diferentes pHs, sugerindo baixa biodisponibilidade, o que poderia justificar a ausência de atividade *in vivo*. Assim, inovadores sistemas nanoestruturados para derivados triterpênicos foram obtidos através de um método simples, rápido e reprodutível, e pode ser utilizado para incorporar outros derivados pertencentes a classe dos triterpenos.



**IV - CAPÍTULO 5** – O presente Capítulo é constituído por artigo científico submetido a publicação no periódico Letters in Organic Chemistry, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 132-149.

Simone Tasca Cargini; Andressa Finkler Staudt; Ana Paula de Azevedo dos Santos, Grace Gosmann, Carolina Bioni Garcia Teles, Simone Baggio Gnoatto. **Effective Approach to Semi-Synthesis of Lupane and Ursane Brominated Derivatives and its Effects on Viability of *Leishmania amazonensis*.**

#### **RESUMO DOS RESULTADOS:**

Neste artigo apresentamos reações de bromação utilizando N-Bromo-Succinamida (NBS) dos triterpenos ácido ursólico (AU) e ácido betulínico (AB) a fim de produzir novas modificações estruturais nestes compostos. Isolamos por cromatografia em coluna e identificamos por técnicas espectroscópicas e espectrométricas 2 compostos, AU-bromolactona (A) e AB bromado na posição C-30 (B). A atividade leishmanicida *in vitro* destes compostos bromados foi avaliada. Na concentração de 100 µM, A e B inibiram a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/67/BR/PH8) em 28,66% e 47,41%, respectivamente. A bromação dos triterpenos levou a um incremento de atividade leishmanicida, visto que os precursores AU e AB, mostraram-se inativos na mesma concentração e condições testadas. Embora não apresentem relevante atividade leishmanicida frente à cepa testada, pode-se concluir que as alterações conformacionais induzidas pela bromolactonização em derivados de AU favoreceram a atividade anti-*L. amazonensis*.







O presente trabalho, através da abordagem do uso de produtos naturais como fonte de moléculas bioativas e também da biovalorização de resíduos, visou à obtenção de compostos com promissora atividade antiprotozoária, especialmente atividade antimalárica. Os compostos ácido ursólico (AU) e ácido betulínico (AB) foram extraídos de fontes naturais, que regionalmente não possuem aproveitamento. Por esta razão, colocamos em discussão a valorização do resíduo gerado pela indústria local produtora de suco de maçã (*Malus domestica*), o qual não tem correto descarte, nem aproveitamento por parte da iniciativa privada, mas que possui interessantes fitocompostos, como por exemplo, o AU (capítulo 1).

Nosso grupo de pesquisa estabeleceu protocolos de extração do AU e do AB a partir destas fontes naturais, e tem extraído os compostos com bons rendimentos (3,5 e 1,5%, respectivamente). Uma estratégia que pode ser utilizada na área da química medicinal é realizar modificações estruturais de compostos ativos. Utilizando a semissíntese, podem-se desenvolver moléculas ativas de baixo custo, menos tóxicas e mais ativas que os compostos de partida (OLIVEIRA et al., 2012). Assim, a partir dos triterpenos AU e do AB purificados, realizamos modificações estruturais nos compostos através da farmacomodulação em dois sítios principais, C-3 e C-28.

Primeiramente, ao AU e AB foi introduzido o grupo funcional acetila em C-3. Para isso, foi feita uma reação de acetilação clássica, utilizando anidrido acético e piridina, sob agitação, por 24 hs. Após esse período, adicionou-se HCl (30%), em banho de gelo, a fim de precipitar os produtos de interesse. A purificação dos derivados acetilados de AU e AB (compostos 1a e 1b do capítulo 2) foi realizada através de cromatografia em coluna, utilizando como eluente ciclohexano e diclorometano em sistema gradiente. Posteriormente AU e AB foram submetidos à reação utilizando anidrido butírico/isobutírico e DMAP em diclorometano, à temperatura ambiente, por 24 hs. A purificação dos quatro compostos também foi realizada através de cromatografia em coluna, utilizando como eluente ciclohexano e diclorometano em sistema gradiente (compostos 7a, 10a e 7b e 10b do capítulo 2). O grupamento hidroxila (C-3) foi submetido à oxidação para a substituição de um grupamento doador por um acceptor de ligação de hidrogênio nesta posição. Para isso, utilizou-se o reagente de Jones, acetona, sob agitação, por 3 hs (compostos 4a e 4b do capítulo 2). Assim, através

de modificação em C-3 foram obtidas duas séries de derivados (série AB e série AU), totalizando 8 compostos com diferentes substituintes em C-3 (2 compostos oxidados e 6 compostos que possuem em C-3 substituintes éster com variações no tamanho da cadeia de carbonos). Estes compostos foram previamente semissintetizados e testados frente à cepa de *P. falciparum* CQ-sensível (3D7) (SILVA et al., 2013; INNOCENTE et al., 2012). Neste trabalho, objetivamos obtê-los para testá-los em cepa CQ-resistente (W2), avaliando além da atividade, o índice de resistência dos compostos.

Posteriormente, utilizando os 8 derivados já descritos (modificados em C-3), procedeu-se à modificação estrutural em C-28. O grupo metila foi inserido utilizando iodometano e  $K_2CO_3$ , em diclorometano, a 55 °C, atmosfera inerte, por 48 hs. Com isso, obtiveram-se mais 8 novos compostos modificados (compostos 2a, 5a, 8a, 11a e 2b, 5b, 8b, 11b do capítulo 2). Paralelamente, procedeu-se o acoplamento do ácido carboxílico com o imidazol dos 8 compostos modificados em C-3 utilizando, cloreto de oxalila em diclorometano, sob agitação, em atmosfera inerte, por 24 hs. Com o uso desta metodologia, 8 novas moléculas com grupamento imidazólico em C-28 foram obtidas (compostos 3a, 6a, 9a, 12a e 3b, 6b, 9b, 12b do capítulo 2). Estes substituintes foram escolhidos para a posição C-28 visto que estes grupamentos já foram inseridos para avaliação frente a células tumorais (MA et al., 2005; SANTOS et al., 2009), e ainda, porque a adição do núcleo imidazólico, em especial, é uma importante estratégia na descoberta de fármacos, pois está presente em diversos compostos que apresentam atividades biológicas, tais como antimicrobianos, anticancerígenos, analgésicos, anti-inflamatórios, antivirais, anti-helmínticos e anticonvulsivantes (GUPTA; GUPTA, 2016). Além disso, objetivamos verificar a importância do ácido carboxílico para a atividade biológica dos compostos.

As reações de semissíntese foram realizadas com sucesso, com rendimentos variados (entre 5 e 85%), totalizando 24 moléculas modificadas. Cabe ressaltar, que este trabalho foi conduzido de modo a obter as moléculas para verificar atividade, a otimização dos rendimentos de obtenção poderá ser realizada futuramente. Os compostos foram identificados utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}C$  e  $^1H$ , e estão sendo analisados por Espectrometria de Massas (EM).



Os 24 compostos, juntamente com AU e o AB, foram submetidos a ensaios de citotoxicidade frente a duas linhagens celulares, células de mamíferos (Células VERO) e células de hepatoma humano (Células HepG2). O uso destas duas linhagens é bastante importante, pois além de verificar toxicidade em células de mamíferos em geral (VERO), o uso da linhagem HepG2 pode prever uma possível toxicidade em células hepáticas e um efeito citotóxico dos metabólitos dos compostos analisados. Esta última predição é possível pelo fato deste modelo celular possuir preservado o sistema enzimático citocromo P450 (CYP 450), responsável pela metabolização dos fármacos no organismo (fase de biotransformação) (CHOI et al., 2015). O ácido ursólico apresentou citotoxicidade em todos os tempos testados (24, 48 e 72 horas) frente as duas linhagens celulares, com uma média de concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) de  $100,86 \pm 3,11 \mu\text{M}$ . O composto 3-oxo betulínico (4b, capítulo 2) apresentou citotoxicidade apenas após 72 horas, e somente frente a linhagem celular HepG2 (CC<sub>50</sub> =  $150,5 \pm 2,78 \mu\text{M}$ ), indicando que a citotoxicidade poderia ser atribuída ao seu metabólito. Os demais compostos não apresentaram citotoxicidade em ambas linhagens celulares, visto que a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi maior que  $400 \mu\text{M}$  (Tabela 1, capítulo 2).

A nível mundial, os protozoários *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, são responsáveis por um grande número de infecções parasitárias, apresentando problemáticas envolvidas no seu tratamento, especialmente pela resistência dos parasitos aos fármacos comumente utilizados (WHO, 2015). Portanto, visto a necessidade de novas alternativas terapêuticas, a atividade antiprotozoária dos compostos semissintetizados vem sendo avaliada.

Frente *T. vaginalis* (ATCC 30236) e frente *L. amazonensis* (IFLA/67/BR/PH8), na concentração de  $100 \mu\text{M}$ , os compostos testados apresentaram modesta atividade antiprotozoária. Os compostos modificados apenas em C-3 foram os mais ativos. O composto ácido 3 $\beta$ -acetil betulínico (1b, capítulo 3) reduziu a viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* em 74%, seguido pelos compostos oxidados em C-3 (3a e 3b, capítulo 3) (55% de redução). O composto ácido 3 $\beta$ -isobutil ursólico (7a, capítulo 3) inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* em 55%. As modificações realizadas em C-28 não foram favoráveis à atividade. Analisando os resultados obtidos com os dados da literatura disponíveis, pode-se planejar o desenvolvimento de derivados triterpênicos com atividades tricomonocida e leishmanicida mais potentes.

Frente o protozoário sanguíneo *P. falciparum* (W2), os compostos semissintetizados apresentaram atividades bastante promissoras. Segundo Cos e colaboradores (2006), para composto isolado, considera-se atividade relevante valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 25 µM (COS et al., 2006). Baseado neste dado, 12 compostos apresentaram importante atividade frente trofozoítos de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (CQ) (Tabela 1, capítulo 2). O composto ácido 3β-butanoil betulínico (7b) apresentou maior atividade, com concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) do crescimento dos parasitos igual a 3,4 µM, seguido pelo composto 3β-oxobetulínil imidazólico (6b) (IC<sub>50</sub> = 7,87 µM).

Dos 12 compostos considerados ativos, metade são compostos modificados apenas em C-3. A inserção do anel imidazólico em C-28 não favorece a atividade antimalárica de todos os modificados em C-3. Para alguns derivados a sua inserção melhorou a atividade, em outros se mostrou indiferente e em outros diminui a atividade. Já a inserção do substituinte metila em C-28 mostrou-se prejudicial à atividade, anulando totalmente a ação antimalárica dos compostos. Desta forma, após análise dos grupos investigados em C-28, podemos inferir que o ácido carboxílico é o grupamento com maior atividade antiplasmodial, sendo, portanto, importante para atividade antimalárica.

Como já mencionado, o composto 7b (capítulo 2) não apresentou citotoxicidade frente às duas linhagens celulares avaliadas com maior índice de seletividade (IS > 117,47), demonstrando alta seletividade para os parasitos. Esses achados corroboram com os dados obtidos por Silva et al. 2013, onde a atividade deste composto frente à cepa de *P. falciparum* CQ-sensível (3D7) foi similar (IC<sub>50</sub> = 5,0 µM), assim como a citotoxicidade em células de mamíferos (CC<sub>50</sub> > 100 µM). Estes resultados evidenciam sua eficácia como composto antimalárico e sugerem baixos níveis de resistência cruzada à cloroquina. Calculando-se o índice de resistência a partir da razão entre o IC<sub>50</sub> das cepas resistentes e sensíveis (W2/3D7), a razão encontrada para o composto 7b foi de 0,68, enquanto que o índice encontrado para CQ foi de 4,01. O baixo índice do composto 7b lança ainda a hipótese de que o composto possa apresentar um mecanismo de ação diferente ao apresentado pela CQ. Assim, com os resultados obtidos *in vitro*, inferimos que o ácido 3β-butanoil betulínico (7b) é o composto mais ativo e seletivo, sendo um promissor composto antimalárico.

Além disso, conclui-se que todos compostos semissintetizados apresentam baixa citotoxicidade frente células de mamíferos e células hepáticas, informação importante para futuras modificações estruturais ou testes de atividade biológica.

Objetivando verificar em que estágio do ciclo de vida do parasito o composto 7b atua, a partir das formas de trofozoíto jovem, a sua ação foi avaliada a cada 12 horas, durante 72 horas do ciclo de vida do *Plasmodium*. Observou-se que o composto levou a uma acumulação das formas jovens do parasito, e um atraso no aparecimento de trofozoítos maduros (Figura 3, capítulo 2). No entanto, assim como outros terpenos, o composto 7b pode atuar em diversos alvos celulares, afetando o parasito também em outras fases do ciclo. Assim, através do uso da bioinformática, foi realizado o *docking* molecular dos compostos ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico (7b) e éster 3 $\beta$ -butanoil betulínilimidazólico (9b) no alvo serina protease subtilisina like-1 do *Plasmodium falciparum* (PfSUB1).

A enzima PfSUB1, dependente de cálcio, tem emergido como um alvo antimalárico importante, visto que é a enzima central nos processos de replicação do parasito nas hemácias humanas (FULLE et al., 2013). A escolha deste alvo foi baseada em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, nos quais se identificou que os compostos triterpênicos atuam na via de sinalização do cálcio, levando a sua depleção, e consequentemente, à morte do parasito (SILVA et al., 2013; SILVA et al. 2014), e em dados da literatura com compostos similares. MONERIZ et al., 2011, analisaram experimentalmente o mecanismo de ação do triterpeno pentacíclico ácido maslínico, o qual apresentou relevante atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* e demonstraram que o composto possui atividade por atuar em diversos alvos, em especial inibindo a PfSUB1. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o composto 7b possui resposta de ligação a PfSUB1 de -7,02 kcal/mol, semelhante a resposta encontrada para o seu ligante natural (MRT12113: -6,32 kcal/mol) (Figura 4, capítulo 2). Já o composto 9b, que possui atividade antimalárica 17 vezes menor que o composto 7b, apresentou uma interação enzimática também menor (-5,87 kcal/mol), sendo, portanto, menos ativo neste alvo molecular.

O tratamento da malária recomendado pela Organização Mundial da Saúde é baseado na terapia combinada com a artemisinina (WHO, 2015), portanto, torna-se relevante avaliar o efeito de alguns derivados em combinação com o este fármaco.

Utilizando a metodologia de “um ponto de Chou – Talalay”, os compostos 7a e 7b foram analisados em combinação com artemisinina. O composto 7a apresentou um índice de combinação (CI) de 1,05 e o composto 7b CI de 1,34. Sendo valores maiores que 1,0, o efeito, para ambos os compostos, foi de aditividade (Figura 2, capítulo 2). Estes resultados mostram que, embora não tenham efeito sinérgico, os derivados triterpênicos podem ser utilizados de forma combinada com a artemisinina.

A eficácia antimalárica de um composto *in vitro* pode não refletir a sua eficácia *in vivo*, visto que no modelo *in vivo* parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos são importantes e determinantes para a atividade. Além disso, sabe-se que a alta lipofilia e a baixa solubilidade aquosa de triterpenos pentacíclicos pode limitar a sua biodisponibilidade e a farmacocinética *in vivo*, reduzindo a sua eficácia (SOICA et al., 2014). Neste contexto, os nanossistemas, muito utilizados para a veiculação de fármacos, surgem como uma alternativa promissora para melhorar a biodisponibilidade e a farmacocinética *in vivo* de triterpenos pentacíclicos.

Assim, neste trabalho, objetivando melhorar os parâmetros físico-químicos do composto antimalárico mais promissor *in vitro*, o derivado ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico (composto 7b, capítulo 2), desenvolvemos inovadores sistemas nanoestruturados (nanoemulsões (NE) e nanocápsulas de núcleo lipídico (LCN) utilizando poli- $\epsilon$ -caprolactona) através do método de nanoprecipitação (ALVES et al., 2005). Vale destacar que, até o momento, não encontramos relatos na literatura abrangendo nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando poli- $\epsilon$ -caprolactona e triterpenos pentacíclicos, sendo, portanto, um sistema inédito. Foram desenvolvidas NE e LNC nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL e suas respectivas formulações sem o ativo, as quais se apresentaram macroscopicamente leitosas, brancas e homogêneas. Os diâmetros das nanoestruturas variaram entre 173 a 342 nm, mantendo-se estáveis por 30 dias. Para avaliação do teor do composto incorporado na nanoestrutura, desenvolvemos e validamos um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV), que se mostrou capaz de identificar e quantificar de forma seletiva e específica o composto 7b (capítulo 4).

Nos ensaios *in vivo*, inicialmente, realizou-se um ensaio para verificação da toxicidade aguda do composto 7b livre, seguindo a diretriz 423 da OECD (2001). O composto foi administrado em camundongos fêmeas (n = 5), por via intraperitoneal

(i.p.), e os mesmos foram acompanhados por 14 dias. O composto 7b se mostrou atóxico na dose de 300 mg/kg, não sendo observadas, no período analisado, alterações comportamentais e visuais, e nem em parâmetros bioquímicos e hematológicos (Tabela 3 e 4, capítulo 4). Visto a inexistência de toxicidade, esta concentração foi selecionada para o ensaio farmacológico do composto 7b livre.

Utilizando o modelo murino *P. berghei* (ANKA) e a metodologia de ensaio supressivo de 4 dias, o composto 7b de forma livre (300 mg/kg) e incorporado à nanoemulsão (valor teórico de 1.0 mg mL<sup>-1</sup>) (Dose calculada: 39,3 mg/kg) foi administrado via i.p., e a atividade antimalárica foi avaliada por comparação com o grupo não tratado (controle). A dose do composto nanoestruturado foi definida com o máximo de volume administrado na via i.p. do camundongo (2-3 mL). A escolha do sistema carreador foi baseada nos ensaios *in vitro* frente a *P. falciparum*, onde apenas as nanoemulsões se apresentaram ativas (IC<sub>50</sub> = 4,46 e 6,22 µg/mL). A parasitemia dos diversos grupos, determinada através da contagem de hemácias parasitadas em esfregaços sanguíneos obtidos de coleta de sangue dos animais a partir do 5º dia de experimento e estendendo-se até o 12º dia, revelou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o composto 7b livre ou incorporado a nanoemulsão, e o grupo controle (Figura 4, capítulo 4).

A capacidade do fármaco para exercer ações farmacológicas depende da biodisponibilidade do fármaco no local de ação, e a ação biológica desejada só pode ser alcançada se houver adequada quantidade de fármaco nos tecidos afetados. No ensaio antimalárico *in vivo*, a via de administração escolhida foi intraperitoneal, via que possui pH semelhante ao pH fisiológico humano (cerca de 7,4). De acordo com o teste de estabilidade do fármaco em diferentes pHs, neste pH, embora não tenha sofrido degradação, o composto BA-B apresentou uma pobre solubilidade (variando entre 62,72% após 2 horas em solução, diminuindo para 39,55% após 24 horas) (Tabela 1, capítulo 4). Este resultado permite inferir que não se observou atividade antimalárica *in vivo* porque inadequada quantidade de composto estava disponível na circulação sanguínea dos camundongos (188,16 a 118,65 mg/kg para BA-B livre e de 24,65 a 15,54 mg/kg para BA-B-NE). Assim como foi verificado para o derivado de triterpeno BA-B, que a atividade *in vitro* não refletiu uma atividade *in vivo*, muitas moléculas na fase de descoberta e desenvolvimento são descontinuadas porque se observa uma má acumulação de moléculas no local de ação e uma ampla distribuição para outras partes

do corpo, levando à falta de eficácia (BASAVARAJ; BETAGERI, 2014). Além disso, esses resultados reiteram que a nanotecnologia pode auxiliar na melhora das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos, mas não altera as propriedades farmacológicas intrínsecas do fármaco (LIU; FENG, 2015).

Por fim, visando atingir a dupla ligação dos triterpenos AU e AB e produzir novas modificações estruturais nos compostos, reações de bromação utilizando N-Bromo-Succinamida (NBS) foram realizadas. Como resultado, isolamos e identificamos 2 compostos, AU-bromolactona e AB bromado na posição C-30 (compostos A e B, respectivamente, capítulo 5). As reações de bromação, ao alterarem a estrutura conformacional dos compostos, podem alterar sua atividade biológica. Poucos estudos disponíveis na literatura executaram estas reações com triterpenos, sendo que os dados encontrados são, em sua maioria, para outros triterpenos, como betulina e ácido oleanólico, e ainda, a atividade biológica dos compostos não foi avaliada (MARTINEZ et al., 2015; SUN et al., 1998). Neste estudo, após purificação e identificação dos compostos utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas, avaliou-se a atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos bromados. Os compostos A e B, em 100 µM, inibiram a viabilidade de 28,66% e 47,41%, respectivamente, de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/67/BR/PH8). A bromação dos triterpenos levou a um incremento de atividade leishmanicida, visto que os precursores AU e AB, mostraram-se inativos na mesma concentração e condições testadas. Embora não apresentem relevante atividade leishmanicida frente à cepa testada, pode-se concluir que as alterações conformacionais induzidas pela bromolactonização em derivados de AU favoreceram a atividade anti-*L. amazonensis*.

Finalmente, sendo as doenças parasitárias um problema de saúde mundial que merece atenção dos pesquisadores, os dados obtidos neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de baixo custo. O aproveitamento de resíduos, assim como a utilização de produtos naturais e de processos de semissíntese são estratégias economicamente viáveis. As observações de relação estrutura-química e atividade biológica *in vitro* e *in vivo* estabelecidas neste trabalho podem, futuramente, auxiliar no desenho de compostos mais ativos e livres de toxicidade. Ainda, mostramos de forma inédita a viabilidade da incorporação de compostos triterpênicos em sistemas nanocarreadores biodegradáveis (nanoemulsões e em nanocápsulas de núcleo lipídico), utilizando nanoprecipitação, uma metodologia simples, eficaz e reprodutível.







Em resumo, os resultados obtidos no desenvolvimento desta tese permitem as seguintes conclusões:

- A extração de ácido ursólico do resíduo da indústria de sucos é uma estratégia economicamente viável para obtenção do ácido ursólico, biovalorizando o resíduo;
- Vinte e quatro compostos foram semissintetizados com sucesso;
- Os compostos modificados não apresentaram significativa citotoxicidade frente células VERO e HepG2;
- Os compostos não apresentaram significativa atividade anti- *T. vaginalis* e *L. amazonensis*, mas é possível inferir uma relação estrutura-atividade;
- Os compostos modificados em C-3 foram mais ativos que os modificados em C-28, sugerindo que o ácido carboxílico no C-28 é importante para a atividade antimalárica dos compostos;
- Os compostos bromados não apresentaram relevante atividade leishmanicida, mas a modificação estrutural levou a um incremento de atividade, visto que os precursores se mostraram inativos;
- Doze compostos apresentaram significativa atividade frente *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2), sendo o composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico o que apresentou atividade mais promissora, melhor índice de seletividade para os parasitos;
- O composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico pode atuar em diferentes alvos do *Plasmodium*, visto que atua nos trofozoítos jovens e tem uma importante ligação *in silico* com a enzima PfSUB1, que possui um papel importante na replicação dos parasitos;
- Nanoemulsões e nanocápsulas de núcleo lipídico do composto 3 $\beta$ -butanoil betulínico foram desenvolvidas com sucesso;
- Desenvolveu-se um método CLAE-UV que se mostrou adequado para a quantificação do ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico nas nanoestruturas;
- Apesar de apresentar atividade antimalárica *in vitro*, o composto ácido 3 $\beta$ -butanoil betulínico livre e incorporado na nanoemulsão não apresentou atividade no modelo *in vivo*, devido, provavelmente, à baixa solubilidade do composto, que não alcançou o sítio ativo em uma concentração satisfatória para sua ação.







- ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: Development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900–904, 2005.
- ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 50–55, 2014.
- BASAVARAJ, S.; BETAGERI, G. V. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 3–17, 2014.
- BATES, P. A; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2004.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em <<http://www.cdc.gov/>>. Acessado em 27 de janeiro de 2017.
- CHOI, J. M. et al. HepG2 cells as an *in vitro* model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 691–704, 2015.
- COS, P. et al. 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.
- DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 2012.
- DECORTE, B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. acs.jmedchem.6b00473, 2016.
- DIMER, F. A. et al. Impact of nanotechnology on public health: production of medicines. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

- FREARSON, J. A. et al. Target assessment for antiparasitic drug discovery. v. 23, n. 12, 2007.
- FULLE, S. et al. Molecular determinants of binding to the *Plasmodium* subtilisin-like protease 1. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 3, p. 573–583, 2013.
- GAMO, F.-J. Antimalarial drug resistance: new treatments options for *Plasmodium*. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 81–88, 2014.
- GNOATTO, S. C. B. et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 771–782, 2008.
- GUPTA, S.; GUPTA, Y. K. Combination of *Zizyphus jujuba* and silymarin showed better neuroprotective effect as compared to single agent in MCAo-induced focal cerebral ischemia in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016.
- HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. In: **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE**. [s.l: s.n.]. v. 29p. 1–83.
- INNOCENTE, A. M. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12003–12014, 2012.
- INNOCENTE, A. M. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2933–2940, 2014.
- JÄGER, S. et al. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-potent Plant Extracts. **Molecules**, v. 14, p. 2016–2031, 2009.
- JÄGER, S.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). **Molecules**, v. 13, n. 12, p. 3224–3235, 2008.
- LIU, Y.; FENG, N. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions

extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM). **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 221, p. 60–76, 2015.

MA, C. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 582–589, 2005.

MANDAL, S. Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: Global spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. Suppl 1, p. S13–S26, 2014.

MARTINEZ, A. et al. Semi-synthesis of taraxerane triterpenoids from oleanolic acid. **Tetrahedron**, v. 71, n. 5, p. 792–800, 2015.

MEWALAL, R. et al. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. **Trends in Biotechnology**, v. xx, p. 1–14, 2016.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, 2013.

MONERIZ, C. et al. Multi-targeted activity of maslinic acid as an antimalarial natural compound. **FEBS**, v. 278, p. 2951–2961, 2011.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1–15, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.

OLIVEIRA, M. H. DE et al. Semi-Síntese: Uma Solução Para Problemas Farmacológicos De Produtos Naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 62–88, 2012.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 958–968, 2015.

REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease

management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 15, p. 1412–1426, 2009.

SANTOS, R. C. et al. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 6241–6250, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562–569, 2006.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.

SHI, J. et al. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano Lett.**, v. 10, n. 9, p. 3223–3230, 2010.

SILVA, G. N. S. et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malaria journal**, v. 12, p. 89, 2013.

SILVA, G. N. S. et al. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 20, n. 1, p. 29–39, 2014.

SILVA, G. N. S. et al. Natural and Semi synthetic Antimalarial Compounds: Emphasis on the Terpene Class. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 809–836, 2015.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 18–45, 2014.

SKINNER-ADAMS, T. S. et al. Defining the targets of antiparasitic compounds. **Drug Discovery Today**, v. 0, n. 0, 2016.

SOICA, C. et al. New Improved Drug Delivery Technologies for Pentacyclic Triterpenes : A Review. **Protein and Peptide Letters**, p. 1137–1145, 2014.

SUN, I. et al. Anti-AIDS Agents . 34 . † Synthesis and Structure - Activity



Relationships of Betulin Derivatives as Anti-HIV Agents. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 4648–4657, 1998.

SUTCLIFFE, S. et al. Trichomoniasis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis: A Proposed Molecular Mechanism. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. 2012.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene Biosynthesis in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 65, p. 225–257, 2014.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 200–208, 2011.

VIEIRA, P. DE B. et al. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p. 1249–1261, 2015.

WANG, H. et al. Prevalence and predictors of HIV infection among female sex workers in Kaiyuan City, Yunnan Province, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 162–169, 2009.

WEB OF SCIENCE <<http://apps.webofknowledge.com>>. Acessado em 20 de Janeiro de 2017.

WELLS, T. N. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**, v. 10, n. Suppl 1, p. S3, 2011.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771–12791, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em <<http://www.who.int/en/>>. Acessado em 21 de Janeiro de 2017.

WOZNIAK, L.; SKAPSKA, S.; MARSZALEK, K. Ursolic Acid-A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614–20641, 2015.

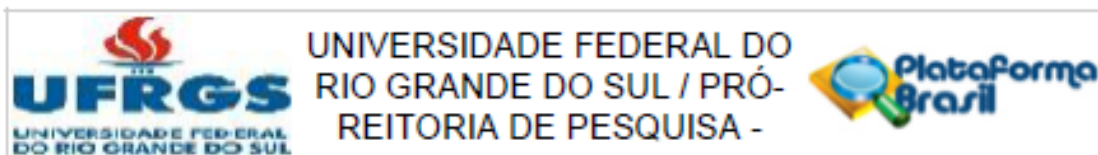
YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic Acid and Its Derivatives : A Review on their Biological Properties. **Current Medicinal chemistry**, v. 12, p. 657–666, 2005.

ZORZI, G. et al. On the use of nanotechnology based strategies for association of complexes matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 426–436, 2015.





## ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP).



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Semissíntese de triterpenos visando à atividade antimalárica.

**Pesquisador:** Simone Cristina Baggio Gnoatto

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46351915.5.0000.5347

**Instituição Proponente:** Faculdade de Farmácia

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.242.369

#### **Apresentação do Projeto:**

Adequadamente apresentado.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral do presente projeto é obter e avaliar a atividade *in vitro* de três séries de compostos triterpênicos semissintéticos frente à cepa resistente de *P. falciparum* (W2). Obter através de semissíntese derivados do ácido ursólico, derivados do ácido betulínico e derivados da betulina. Avaliar o efeito dos compostos obtidos através de processos de semissíntese sobre o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*, realizando uma triagem inicial (screening) dos compostos em duas concentrações ( $\mu\text{M}$ ) distintas; Determinar o Índice de Inibição de Crescimento de 50% (IC50) dos parasitos após o tratamento com os compostos que se apresentarem ativos no screening previamente realizado.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequadamente apresentado.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um projeto em parceria com a FIOCRUZ para desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da malária. A manutenção e sobrevivência do *P. falciparum* é de responsabilidade da Fiocruz/RO que tem projeto submetido a apreciação ética (CAAE: 44899715.2.0000.0011). Para realização do screening e para a determinação da IC50 de todos os

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: [etica@propesq.ufrgs.br](mailto:etica@propesq.ufrgs.br)

Continuação do Parecer: 1.242.369

compostos serão coletados 20 mL de sangue venoso periférico usando o sistema a vácuo e tubos heparinizados de 10 doadores voluntários sadios com idade acima de 18 anos do tipo sanguíneo O, Rh+, sem histórico de malária. O volume de sangue a ser coletado foi calculado considerando todo o experimento, repetições e replicatas.

Carta da pesquisadora esclarece e corrige termos do original previamente enviado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE: adequadamente apresentado;

Orçamento: adequado;

Cronograma: adequado;

Termo de acordo com a FIOCRUZ: anexado.

**Recomendações:**

Ausência de recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Em condições de aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP- Projeto Simone Individualizado 2015.docx	15/06/2015 11:50:26		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Simone Gnoatto.doc	15/06/2015 11:51:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Simone Assinada 2015.pdf	15/06/2015 11:55:39		Aceito
Outros	Termo de responsabilidade.jpg	15/06/2015 11:58:33		Aceito
Outros	Declaração Simone Gnoatto.jpg	15/06/2015 11:59:51		Aceito
Declaração de Instituição e	Carta Anuência Carolina Simone Maio 2015 (2).jpg	15/06/2015 12:01:04		Aceito

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 1.242.989

Infraestrutura	Carta Anuência Carolina Simone Maio 2015 (2).jpg	15/06/2015 12:01:04		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Parecer compesq.pdf	15/06/2015 12:02:00		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto Simone Gnoatto..pdf	19/08/2015 19:43:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Simone Gnoatto - Revisado.pdf	15/07/2015 19:12:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Simone Assinada Julho 2015.pdf	15/07/2015 19:13:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP- Projeto Simone Individualizado 2015.docx	15/07/2015 19:13:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSimoneRevisadoSetembro2015.doc	08/09/2015 11:31:26	Simone Cristina Baggio Gnoatto	Aceito
Outros	Carta.doc	08/09/2015 11:32:11	Simone Cristina Baggio Gnoatto	Aceito
Outros	CEPCarolinaBioni.pdf	08/09/2015 11:39:12	Simone Cristina Baggio Gnoatto	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_527622.pdf	08/09/2015 11:40:09		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Setembro de 2015

---

Assinado por:  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

**ANEXO 2 – Aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA).**



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA**

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto (protocolo 2015/14) intitulado “**Semissíntese de triterpenos visando à atividade antimalárica**”, sob a responsabilidade da **Dra. Carolina Bioni Garcia Teles** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), em 14 de outubro de 2015.

This is to certify that the work (protocol 2015/14) entitled “**Antiplasmodial activity of semisynthetics triterpenes**”, by Dr. Carolina Bioni Garcia Teles is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimental and was approved by Ethic Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Rondônia Foundation (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), October 14, 2015.

Porto Velho, 14 de outubro de 2015.

Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)  
Ms. André de Abreu Rangel Aguirre (Vice-Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)  
Ms. Luiz Herman Soares Gil  
Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer  
Dr. Roberto Nicoletti  
Dra. Carolina Bioni Garcia Teles  
Dra. Genimar Rebouças Julião  
Dra. Soraya dos Santos Pereira  
Felipe Stegun  
Emerson Monteiro Lins Leal (Secretário)