

Sara Alexandra Craveiro Oliveira

# **Novos Sistemas Terapêuticos para o tratamento de doenças negligenciadas provocadas por protozoários**

**- Especial ênfase para Leishmaniose e Doença de  
Chagas -**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2015

Novos Sistemas Terapêuticos para o tratamento de doenças negligenciadas provocadas por protozoários  
- Especial ênfase para Leishmaniose e Doença de Chagas -

Sara Alexandra Craveiro Oliveira

# **Novos Sistemas Terapêuticos para o tratamento de doenças negligenciadas provocadas por protozoários**

**- Especial ênfase para Leishmaniose e Doença de  
Chagas -**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2015

Autora:

Sara Alexandra Craveiro Oliveira

**Novos Sistemas Terapêuticos para o tratamento de  
doenças negligenciadas provocadas por protozoários**

**- Especial ênfase para Leishmaniose e Doença de Chagas -**

---

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

## **Resumo da Monografia**

As Doenças Negligenciadas ou doenças tropicais, advêm de um conjunto de factores biológicos, ecológicos e evolutivos, com uma elevada incidência nos países de clima tropical. A situação económica desfavorável e o baixo desenvolvimento, estão também directamente relacionados com a sua ocorrência. Estas doenças representam um encargo significativo para a saúde em certas partes do mundo. Os medicamentos disponíveis no tratamento das mesmas não são capazes de atender às suas necessidades clínicas. Como tal, tem havido um esforço significativo para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos ao longo dos últimos anos. Estes desenvolvimentos têm sido liderados por várias instituições ou agências governamentais com o intuito de obter progressos a concepção de novos fármacos contra estas afecções.

Os temas abordados neste estudo incidirão essencialmente sobre a Leishmaniose e a Doença de Chagas. Ambas são causadas por diferentes protozoários, desenvolvendo diferentes manifestações e sintomatologia, dependendo da espécie.

Os sistemas terapêuticos (ST) convencionais apresentam inúmeras resistências, pelo que este estudo visa a descrição de novos sistemas terapêuticos (NST) com o intuito de melhorar a biodisponibilidade dos fármacos no respectivo local de acção. Entre eles distinguem-se os lipossomas, niossomas, nanopartículas de lípidos sólidos, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, micelas, entre outros que serão abordados ao longo deste trabalho.

**Palavras-chave:** novos sistemas terapêuticos, doenças negligenciadas, novas abordagens terapêuticas, nanopartículas, nanotransportadores, novos tratamentos, doença de Chagas, Leishmaniose, Tripanossomíase americana, combinações de fármacos, nanotecnologia, Leishmania, terapia medicamentosa, agentes antiparasitários

### **Abstract**

Neglected diseases or tropical disorders, come from a number of biological, ecological and evolutionary factors, with high incidence in tropical countries. The unfavorable economic situation and the low development, are also directly related to its occurrence. These diseases represent a significant burden to health in certain parts of the world. The drugs available for treating these diseases are not able to satisfy their clinical needs. However, over the last years, there has been a significant effort at developing DDS. Several institutions or governmental agencies have been leading these developments in order to obtain progress when developing new drugs against these diseases.

The discussed themes in this study will coincide essentially on leishmaniasis and Chagas disease. Both are caused by different protozoa, and develop different manifestations and symptoms, according to the specific species.

The conventional therapeutic systems already present a lot of resistances, and the intent of this study is the discovery of DDS looking to improve the drugs bioavailability in the respective place of action. These include liposomes, niosomes, solid lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, nanoemulsions, micelles, among others that will be addressed throughout this work.

**Keywords:** drug delivery systems, neglected diseases, new approaches, nanoparticles, nanocarriers, new treatments, Chagas diseases, Leishmaniasis, American Tripanosomiasis, drug combinations, nanotechnology, Leishmania, drug therapy, antiprotozoal agents

### **Agradecimentos**

No final deste percurso acadêmico quero agradecer a todos os que me apoiaram e contribuíram para a conclusão de mais esta etapa.

Agradeço de um modo especial à minha orientadora, a Prof. Dra. Eliana Souto por toda a simpatia, cuidado, disponibilidade e atenção prestadas durante a realização deste trabalho de pesquisa.

Quero também agradecer a todos os colegas de turma que me acompanharam ao longo dos anos e que de alguma forma contribuíram para a minha evolução, como também aos amigos mais próximos pela motivação nos momentos necessários.

Por fim, agradeço sobretudo à pessoa sem a qual nada teria sido possível, a minha mãe, que sempre me deu o seu apoio e todo o auxílio possível, bem como a toda a minha família.

## Índice geral

Resumo da Monografia .....	5
Abstract .....	6
Agradecimentos .....	7
Índice geral .....	8
Índice de Figuras .....	9
Índice de Tabelas.....	10
Índice de Abreviaturas.....	11
Objectivos do Trabalho.....	12
<b>Capítulo I</b> .....	13
Introdução.....	14
1.1. Definição de doenças negligenciadas.....	14
1.2.Aspectos gerais da Leishmaniose e Doença de Chagas .....	17
<b>Capítulo II</b> .....	22
2.1. Tratamentos tradicionais e suas limitações.....	23
2.2. Combinações de fármacos existentes .....	27
2.3. Novos fármacos.....	29
2.4. Tratamentos naturais à base de plantas.....	31
<b>Capítulo III</b> .....	34
3.1. Novos sistemas terapêuticos.....	35
<b>Capítulo IV</b> .....	45
Conclusão.....	46
<b>Capítulo V</b> .....	48
Bibliografia.....	49

## Índice de Figuras

### Capítulo I

**Figura 1.** Mapa da sobreposição geográfica das DTN (abordadas na Tabela 1)

**Figura 2.** Ciclo de vida da Leishmaniose

**Figura 3.** Lesão cutânea da Leishmaniose

**Figura 4.** Ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*

## Índice de Tabelas

### Capítulo I

**Tabela 1.** Lista das 13 DTN classificadas segundo a sua prevalência

### Capítulo II

**Tabela 2.** Plantas e algumas substâncias activas isoladas com acção contra *Leishmania*

### **Lista de Abreviaturas**

- DC** – Doença de Chagas  
**DTN** – Doenças Tropicais Negligenciadas  
**LV** – Leishmaniose Visceral  
**LC** – Leishmaniose Cutânea  
**LT** – Leishmaniose Tegumentar  
**LCD** – Leishmaniose cutânea difusa  
**LMC** – Leishmaniose mucocutânea  
**DN** – Doenças Negligenciadas  
**SDN** – Sociedade das Nações  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**BNZ** – benzonidazol  
**ITZ** – itraconazol  
**ETZ** - etanizole  
**NF** - nifurtimox  
**AmB** – anfotericina B  
**SDF** – sistemas de distribuição de fármacos  
**NST** – novos sistemas terapêuticos  
**ST** – sistemas terapêuticos  
**SNC** – sistema nervoso central  
**GI** – gastrointestinal  
**Vd** – volume de distribuição  
**PEG** – polietilenoglicol  
**PLGA** – ácido poli-láctico-co-glicólico  
**DDS** – *Drug Delivery Systems*  
**PCR** – reacção em cadeia da polimerase  
**p.e.** – por exemplo  
**CI** – contra-indicado  
**NLS** – nanopartículas de lípidos sólidos  
**IV** – intra-venosa  
**MPS** – sistema fagocítico mononuclear  
**VIH** – Vírus Imunodeficiência Humana

### **Objectivos do Trabalho**

Esta revisão bibliográfica teve como principais objectivos:

- a análise do estado da arte das doenças tropicais negligenciadas, com especial ênfase para Leishmaniose e a Doença de Chagas;
- apresentar uma breve revisão dos tratamentos farmacológicos clássicos, bem como as suas limitações e potenciais resistências;
- avaliar as novas abordagens terapêuticas, incluindo produtos à base de plantas;
- apresentar novos sistemas terapêuticos em estudo ou desenvolvimento para o tratamento destas patologias.



## INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição de doenças negligenciadas

Num período assinalado pelas variadas alterações tecnológicas, parece incoerente abordar uma questão que expõe a falta das mesmas, bem como investigação e concepção no âmbito da saúde. O capítulo das Doenças Negligenciadas (DN), trata de um conjunto de patologias propagáveis, em grande parte provocadas por protozoários, cuja transmissão é efectuada por meio de vectores, sendo a terapêutica diminuta, instável ou ultrapassada (Santos, 2013).

Estas patologias são igualmente denominadas de doenças tropicais, já que surgem por associação de condições ambientais, financeiras e evolutivas, o que justifica a sua elevada ocorrência nas regiões de clima tropical. Contudo, este incidente, apresenta também ligação com condições socio-económicas adversas e com reduzido crescimento, atingindo mundialmente um elevado número de pessoas (Silva, 2013).

As afecções parasitárias sendo doenças provocadas por protozoários e helmintos, são fonte de várias complicações que conduzem anualmente a um elevado número de óbitos. O peso universal destas patologias é acentuado pela privação de vacinas autorizadas, o que implica a criação de fármacos fiáveis e infalíveis destinados à sua prevenção e tratamento. Lamentavelmente, onde há acesso aos medicamentos, o seu uso está a tornar-se mais restrito devido às resistências dos parasitas a esses fármacos (Katherine, 2014).

Os tratamentos destinados ao combate destas doenças dificilmente retractam a necessidade clínica. Contudo, no decorrer dos últimos tempos, tem-se verificado um considerável empenho para o desenvolvimento de novas terapias para estas patologias (Gilbert, 2013).

Há programas governamentais que visam a luta contra estas patologias, no entanto, planos para lutar contra as doenças tropicais propriamente ditas, até agora não alcançaram semelhante contributo financeiro.

Na Tabela 1 estão registadas as treze afecções mais vulgarmente descritas como doenças tropicais negligenciadas bem como a sua extensão mundial que se encontra expressa na Figura 1. Estas patologias atingem, maioritariamente, pessoas com condições económicas precárias podendo originar mais tarde inaptidão física.

Da análise da Tabela e da Figura 1 podem retirar-se algumas conclusões pertinentes, designadamente:

- a) verificam-se demasiadas sobreposições geográficas nessas afecções;
- b) os habitantes de cada área são afectados por distintos parasitas ou exibem concomitantemente variadas doenças negligenciadas.

Apenas por si, este segundo aspecto poderia justificar a procura de fármacos mais abrangentes na luta contra este tipo de doenças. Porém determinados parâmetros favorecem o surgimento de obstáculos a esta procura, como, por exemplo, o desgaste socioeconómico dessas populações, e a reduzida expectativa de retorno económico às indústrias farmacêuticas.

Tendo em conta os factores acima enunciados, verifica-se que menos de 1% de todos os novos fármacos em concepção nos últimos 30 anos se destinam ao tratamento das doenças tropicais.

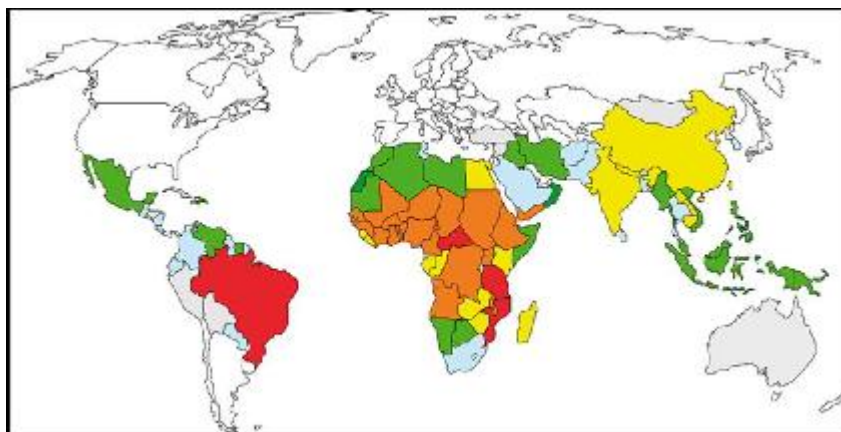
Essas décadas de reduzido progresso terapêutico, juntamente com o dilema de saúde que estas patologias acarretam, têm conduzido tentativas contínuas no sentido de criar novos fármacos. Tendo em conta o facto de não se tratarem de prioridades terapêuticas, o investimento no tratamento de DN tem sido aplicado a outras patologias de incidência inferior, contudo com impacto directo na América do Norte e Europa.

**Tabela 1.** Lista das 13 DTN classificadas segundo a sua prevalência, [adaptada de Pita et al., 2011]

Doença	Prevalência Global (milhões)	População em risco	Regiões de Prevalência
Ascaridíase	807	4,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, China, América Latina e Caribe
Tricuríase	604	3,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Ancilostomose	576	3,2 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Esquistossomíase	207	779 milhões	África subsaariana, América Latina e Caribe
Filariose Linfática	120	1,3 bilhões	Sul e Leste Asiático, Ilhas do Pacífico, África Subsaariana
Tracoma	84	590 milhões	Meio-Leste e Norte Africano, África Subsaariana
Oncocercose	37	90 milhões	África subsaariana, América Latina e Caribe
<b>Leishmaniose</b>	<b>12</b>	<b>350 milhões</b>	<b>Sul Asiático, África Subsaariana, Índia, América Latina e Caribe</b>
<b>Doença de Chagas</b>	<b>8 a 9</b>	<b>25 milhões</b>	<b>América Latina e Caribe</b>
Hanseníase	0,4	Não Determinada	África subsaariana, Índia, América Latina e Caribe
Tripanossomíase Africana	0,3	60 milhões	África Subsaariana
Dracunculíase	0,01	Não Determinada	África Subsaariana
Úlcera de Buruli	Não Determinada	Não Determinada	África Subsaariana

**Figura 1.** Mapa da sobreposição geográfica das DTN (abordadas na Tabela 1), [adaptada de Pita et al., 2011]

- 1 Tipo de doença
- 2 Tipos de doenças
- 3 Tipos de doenças
- 4 Tipos de doenças
- 5 Tipos de doenças
- 6 Tipos de doenças



Como resultado desse cenário, há certas empresas que se têm encarregado exclusivamente pela concepção de fármacos para este tipo de doenças. Contudo, há particularidades especiais no decurso da gênese de fármacos para estas doenças, tais como (Pita, 2011):

- Reduzido preço de fabrico
- Elevada biodisponibilidade via oral
- Tolerabilidade dos efeitos adversos
- Eventualidade para co-administração com outros fármacos
- Eficácia em doses menores
- Possibilidade de restabelecimento tanto em fase aguda como crónica
- Ausência de obrigatoriedade de internamento para a sua ministração.

DN são doenças que para além de predominarem em contextos de pobreza, ainda cooperam para a subsistência do panorama de disparidade, uma vez que revelam vigoroso obstáculo à evolução dos países. Esta designação, conforme mencionado anteriormente, alude a um grupo de doenças provocadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) que são endémicos em áreas de rendimento limitado (Campos, 2010).

Estas patologias têm grande incidência em países emergentes nos quais as condições higiénicas e de saúde são débeis, colaborando deste modo, para o incremento das taxas de morbi-mortalidade acoplados a esse conjunto de patologias. Devido aos efeitos adversos (p.e. reduzida eficácia, quantia acentuada e elevada toxicidade, entre outros) das terapêuticas disponíveis, verifica-se um impedimento no tratamento dessas doenças, que afecta a sua adesão (Oliveira, 2014).

## **1.2 Aspectos gerais da Leishmaniose e Doença das Chagas**

A **Leishmaniose** é uma patologia crónica provocada por um protozoário intracelular pertencente à família *Leishmania*. Atinge elevado número de indivíduos mundialmente, e é endémica em diversos países. Para certos países em evolução, a leishmaniose é uma crítica questão de saúde colectiva. Tendo em conta que a afecção é

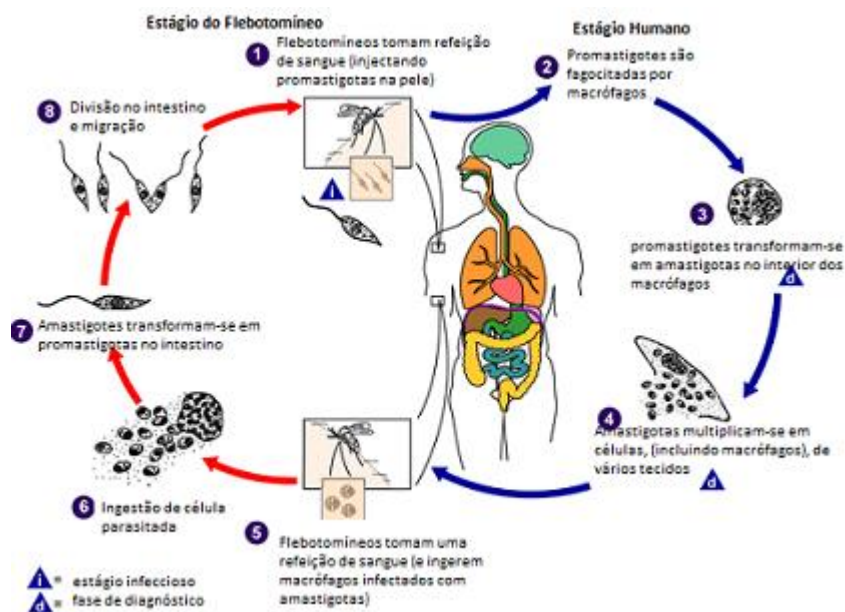
endêmica também no Sul da Europa, pessoas que se deslocam para esses locais possuem uma grande probabilidade de serem contagiadas. Devido a uma progressiva ocorrência desta patologia, a sua importância tem-se expandido grandemente. Este incremento está, de certa forma, associado aos emigrantes, deslocamentos, guerra, habitação de novas regiões, normas de vigilância inadequadas em determinados países, e outras situações que têm contribuído para um incremento dos casos de leishmaniose pelo mundo. São vários os tipos de *Leishmania* reconhecidos conforme as manifestações clínicas. A doença apresenta-se segundo quatro modelos: leishmaniose cutânea (LC), que atinge a superfície da pele; leishmaniose mucocutânea (LMC) que afecta a superfície da pele e das mucosas; leishmaniose cutânea difusa (LCD); leishmaniose visceral (LV), que afecta órgãos do sistema reticuloendotelial (Lupi, 2009).

A doença é transmitida pela picada de um insecto flebotomíneo, que funciona como vector (Figura 2). Durante a fase adulta, este insecto adequa-se naturalmente a diversos meios e quando se encontra na fase larvar cresce em ambientes terrestres húmidos, com reduzida claridade e com matéria orgânica em abundância.

Os reservatórios da doença podem ser o cão, os marsupiais e a raposa que operam como conservadores do período evolutivo da mesma. A possibilidade do homem ser uma fonte de infecção para LV é um assunto de discussão, no entanto, não se verifica transmissão de pessoa a pessoa, nem de animal a animal. (Silva, 2013)

Em Portugal, a leishmaniose é uma zoonose provocada pelo parasita *L.infantum*, no qual o cão é o principal hospedeiro e o reservatório primário para a infecção visceral humana. As espécies vectoriais são *Phlebotomus perniciosus* e *P.ariasi*. As mudanças de clima como o incremento da temperatura, poderão conduzir à exacerbação da propagação da doença tanto em animais como em humanos, aumentando a prevalência da mesma. No nosso país, a doença tem predomínio infantil, embora esta tendência tenha vinda a diminuir, com um aumento mais acentuado desta patologia em adultos, nomeadamente portadores de VIH/SIDA. Embora a LC tenha pouca incidência em Portugal, estima-se que sejam diagnosticados cerca de 10 novos casos por ano. Além disso, a leishmaniose canina tem aumentado cerca de 20% em localidades de áreas endémicas (nomeadamente Lisboa e Algarve) (Campino, 2010).

**Figura 2.** Ciclo de vida da Leishmaniose, [adaptada de CDC / DPDx]



A LC expressa-se como uma úlcera na zona da ferroadada e geralmente cura-se por si só, podendo originar uma pequena cicatriz (Figura 3). Já a LCD é mais complexa, produzindo lesões que se difundem ao longo da pele e com menor capacidade de recuperação. Com o tipo LMC surgem inicialmente feridas na pele, que podem disseminar para as membranas mucosas do rosto e caso ocorra inflamação pode conduzir especialmente à erosão das fossas nasais e da cavidade bucal. As lesões da pele pela LV, demoram cerca de 2 a 8 meses para se propagar em respostas inflamatórias graves que podem atacar o fígado e baço e até levar à morte se não forem tratadas (Barrett, 2012).

**Figura 3.** Exemplo de uma lesão cutânea (esquerda) provocada pelo vector da Leishmaniose (direita), [adaptada de *LookForDiagnosis.com*]

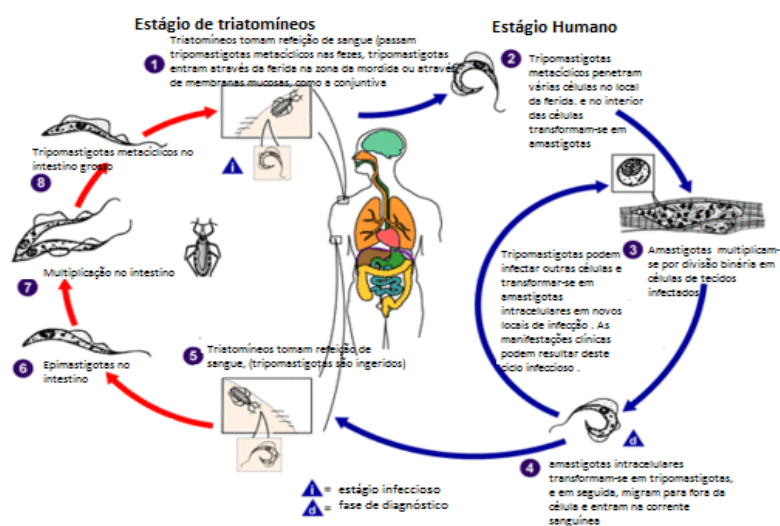


No que diz respeito ao diagnóstico é primordial a identificação microscópica de parasitas, particularmente, a detecção de amastigotas em amostras de tecido, reacção em cadeia da polimerase (PCR), testes serológicos, imunofluorescência, entre outros (Barrett, 2012).

A **Doença de Chagas** (DC), da qual o agente etiológico é o *Trypanossoma cruzi*, é uma das doenças negligenciadas mais relevantes que atinge variados países. O modo habitual de transmissão da DC dá-se por meio de vectores, consistindo em aproximadamente 80% dos eventos de contágio da patologia, e ocorre através do contacto do homem com os excrementos contaminados do insecto (do género *Triatoma*), que é o portador. Este por sua vez, infecta-se ao nutrir-se por intermédio de um dos incontáveis hospedeiros existentes no meio ambiente, possibilitando a propagação da afecção a outro mamífero, abrangendo o homem. A transfusão de sangue e seus hemoderivados é um outro modo de difusão da doença, ou por via transplacentária, em qualquer estágio da doença ao longo da gestação.

Contudo, a transmissão sanguínea não apresenta até agora predomínio. Presentemente, a ingestão de comidas infectadas com o *T.cruzi*, assenta na principal forma de disseminação da doença ao homem. A transmissão oral da DC tem despontado de forma inesperada, igualmente, em regiões não endémicas onde o vector parecia estar sob domínio, devido à exposição de alimentos às fezes do triatomíneo. As microepidemias concebidas segundo esse modo de propagação, levam a sérias circunstâncias fatídicas (Silva, 2013).

**Figura 4.** Ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*, [adaptada de CDC / DPDx]



Posteriormente à entrada no hospedeiro, os parasitas infectam as células deste e diversificam-se em formas amastigotas reprodutivas (Figura 4). A fase aguda de contágio engloba respostas inflamatórias e sintomas comuns como febre, mal-estar, e outros. É habitual a ocorrência de edema facial, particularmente em torno dos olhos. Pode seguir-se um período assintomático bastante extenso e impreciso, durante o qual, a descoberta de parasitas é bastante trabalhosa. Esta etapa pode prolongar-se por mais 10 anos. Em certas circunstâncias, pode verificar-se uma crescente lesão inflamatória como reacção aos parasitas residuais, por vezes fatal para o coração, esófago, cólon ou outros órgãos.

Além do diagnóstico sintomático e microscopia de fase aguda (enquanto se conseguem localizar tripomastigotas no sangue), é executado habitualmente o diagnóstico serológico do antígeno de *T.cruzi* para detecção de anticorpos. Podem também ser realizadas técnicas de PCR, ensaios clínicos, estudos de vigilância, xenodiagnóstico e hemocultura (Barrett, 2013).



## 2.1. Tratamentos tradicionais e suas limitações

Na realidade, Leishmaniose e DC, são exemplos de DTN que têm sido alvo de reduzido reparo por parte do governo e indústria farmacêutica. Nos últimos 15 anos o arremesso global em medicamentos antiparasitários resumiu-se a 0,1% do capital universal empregue. (Vermelho, 2014)

Ambas as patologias, Leishmaniose e DC, são originadas por parasitas taxonomicamente relacionados e que têm particularidades morfológicas e bioquímicas análogas.

Os fármacos presentemente empregues no tratamento destas patologias padecem de problemas de toxicidade, efectividade inconstante, formalidades para gestão e/ou observância de regulamentos de terapia parenteral. As duas doenças apresentam poucos medicamentos ou tratamentos em evolução clínica.

Em contrapartida, para a **Leishmaniose** tem-se verificado um avanço considerável com anfotericina B lipossomal (AmBisome®), miltefosine e paramomicina.

Ainda assim, as investigações apresentam até agora muitas lacunas e aspectos inconcludentes. Importa salientar 4 particularidades da biologia da *Leishmania* especialmente referentes à actividade do fármaco:

- a) A localização intracelular da forma amastigota;
- b) Distintas exigências de farmacocinética no transporte das substâncias activas ao nível do fígado, baço, medula óssea em LV ou pele em LC;
- c) Variações consideráveis na susceptibilidade aos medicamentos, dos 17 géneros de *Leishmania* que dão origem a Leishmaniose em seres humanos;
- d) Efeito da imunossupressão ligada à Leishmaniose, que podem reduzir a eficácia de certos medicamentos.

A ausência de vacina humana contra leishmaniose promove a quimioterapia como procedimento de eleição no combate a estas patologias. Embora haja vários quimioterápicos contra a leishmaniose humana, grande parte deles baseiam-se em novas formulações de fármacos antigos. (Vermelho, 2014)

Os medicamentos de escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose, têm sido os antimoniais pentavalentes. O **Antimónio Pentavalente**, actualmente com alto grau de resistências na Índia, mantém a sua utilidade terapêutica em outras áreas do globo. A sua aplicação é contudo restrita, devido à extensa durabilidade do tratamento, administração parenteral, descrição de efeitos tóxicos marcadamente mortais, nomeadamente para o coração, fígado e rins. A sua estrutura química é ainda pouco conhecida. Assim como acontece com a LV, há terapêuticas com uso restrito também para LC (Michael, 2012).

Nos estados de língua inglesa, a formulação comercializada é o estibogluconato de sódio (Pentostam®), ao passo que nas nacionalidades de língua francesa, espanhola e portuguesa, o agente terapêutico utilizado é antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Não obstante os sucessivos insucessos na terapêutica com os antimoniais pentavalentes, subsistem até então como os medicamentos de primeira linha contra todos os tipos de leishmaniose por apresentarem maior efeito farmacológico a preço inferior, comparativamente aos medicamentos de segunda opção.

A **Anfotericina B** é um antibiótico poliénico usado como antifúngico, com elevada acção contra promastigotas e amastigotas. Este medicamento é usado em segunda opção, já que apresenta variadas reacções laterais e, como tal, só deve ser utilizado quando o tratamento com antimoniais não é eficaz (Oliveira, 2013).

Este fármaco, é presentemente na Índia, a terapêutica de escolha depois que o antimónio pentavalente deixou de ter actividade. Este agente terapêutico encontra-se presentemente na liderança do tratamento de LV, numa sequência de formulações à base de lípidos para a terapia de micoses sistémicas em doentes imunocomprometidos. Entre os que evidenciaram aptidão para o tratamento de LV, somente a formulação lipossomal, AmBisome®, está patenteada para a LV em algumas partes do mundo. Apesar de haver já alcançado um pequeno custo ajustado com os fabricantes, são indispensáveis múltiplas ampolas para o tratamento de curso único, e permanecem discutíveis quanto às reacções laterais e estabilidade de temperatura. Foram também confirmadas variações locais nos resultados obtidos com os tratamentos LV. Portanto, o emprego universal de AmBisome® para LV exige uma análise mais austera em confinadas regiões do mundo (Michael, 2012).

A **Pentamidina** é uma diamina aromática que parece apresentar acentuada actividade como terapia de substituição aos antimoniais. No entanto, devido à sua toxicidade, o seu uso é bastante limitado (Oliveira, 2013).

Em anos anteriores, o aminoglicosídeo **Paramomicina** mostrou apresentar efeito antileishmanicida. Mais tarde, alguns ensaios manifestaram grande êxito com esta terapia e a preço reduzido. Contudo, novamente de acordo com distintas respostas de cura consoante diversas localizações, o mesmo não é empregue em monoterapia por estas disparidades serem inconclusivas.

Em contrapartida, o **Miltefosine** foi o tratamento oral primordial para LV com efeito antileishmanicida. Esta substância apresenta 94% de actividade e foi o antiparasitário exclusivamente sujeito a testes de fase IV. Contudo, há no entanto certos quesitos relativos à sua aplicação que compreendem: (i) possibilidade de malformações no feto; (ii) possíveis recidivas ao fim de 28 dias de tratamento e limitada cooperação do doente; (iii) cuidados de acordo com resistência aos fármacos (Michael, 2012).

A **Sitamaquina**, conhecida quimicamente como 8-aminoquinoína, é o único agente terapêutico que foi concebido para tratamento da LV. O benefício deste medicamento é a administração oral. Contudo, embora apresente relevante efeito terapêutico foram verificadas algumas reacções adversas: vómitos, dispepsia, cianose, síndrome nefrótica e outros. Este fármaco em doses elevadas inibe a mobilidade, estrutura e desenvolvimento do parasita. Ainda assim, são imprescindíveis mais ensaios para compreender a eficácia, mecanismo de acção e toxicidade deste composto (Singh, 2012).

Os **triazóis** e **imidazóis**, conhecidos como agentes antifúngicos, também exibem actividade contra algumas espécies de *Leishmania*, contudo apresentam limitações de solubilidade em água que limitaram ensaios posteriores (Pham, 2013).

Os medicamentos actualmente aplicados no tratamento de LV e LT como Pentostam®, Glucantime®, Pentamidina e Anfotericina B não apresentam efeitos terapêuticos se administrados oralmente e necessitam de administração parenteral a longo prazo. Adicionalmente, estes agentes quimioterapêuticos são extremamente dispendiosos e originam efeitos laterais marcados devido à sua acentuada toxicidade.

Em conjunto todos estes aspectos conduzem à mínima cooperação dos doentes com a terapia ou desistência da mesma. Por outro lado, a quebra da terapêutica produz um enorme impacto na disseminação da afecção e aparecimento de estirpes resistentes aos medicamentos (Vermelho, 2014).

No que diz respeito à DC, sendo esta uma patologia reportada há mais de 100 anos, apresenta desde cedo, uma narrativa de sucessivos esforços de controlo terapêutico. Entre eles destacam-se: - compostos químicos com respostas duvidosas e contestáveis, nomeadamente **violeta de genciana** (usado até então como profilático em bancos de sangue); - fármacos aplicados na clínica para tratamento da DC, mais concretamente, o **nifurtimox** e **benzonidazol**.

Os dois fármacos exibem actividade demarcada por: - resistência de algumas cepas; - diferença de sensibilidade dos doentes ao tratamento, que é atingida pela idade do paciente e distribuição geográfica; - fase clínica da doença para a qual são administrados (sendo os dois mais eficazes na fase aguda); - a dose e o curso do tratamento; - efeitos laterais (como perda de peso, sonolência, excitação, entre tantos outros) (Cortez, 2012).

O **Nifurtimox** é um medicamento tripanocida, que actua não só contra tripomastigotas circulantes como amastigotas. Ainda que o seu emprego fosse alvo de reprovação por longos períodos de tempo, com a suspensão da utilização do benzonidazol houve uma ampliação do seu uso. Apresenta reduzido poder tripanocida, já que o tempo de semi-vida de eliminação no plasma é de aproximadamente 3 horas, e necessita por isso de administração continuada. Os efeitos tóxicos mais frequentes incidem sobretudo sobre o sistema nervoso central (SNC) e periférico, e manifestações gastro-intestinais (GI) (náuseas, vômitos, dores de estômago e diarreia).

O **benzonidazol** manifesta acção terapêutica contra diversas estirpes T.cruzi. É administrado por via oral em adolescentes. Encontra-se presentemente em progresso, uma recente formulação que visa coadjuvar a administração pediátrica. As reacções laterais são igualmente habituais, particularmente respostas de hipersensibilidade na pele, mas também manifestações ao nível do intestino e neurológicas são similarmente descritas (Michael, 2012).

Este agente terapêutico parece actuar mediante três mecanismos diferentes: - efeito tripanocida; - incremento da fagocitose e lise do parasita por mecanismo IFN- $\gamma$ -dependente; - inibição do crescimento do parasita por bloqueio NADH-fumarato-redutase. (Pereira, 2013)

Pela amplitude destas reacções, o nifurtimox teve o seu uso interrompido em alguns países do sul. A redução da actividade em monoterapia na luta contra T.Cruzi somada à inaptidão e considerável privação monetária de trabalhadores nos países abrangidos pela DC, desponta a evidente precisão da criação de novos agentes terapêuticos para o tratamento desta moléstia.

Existem outros fármacos que actuam *in vitro* contra T.cruzi mas presentemente, apenas estes dois se encontram em uso na terapia humana. Os efeitos adversos são mais usuais em indivíduos com mais de 50 anos de idade, logo não são aconselhados nesta faixa etária. A sua obtenção por meio da sociedade das nações (SDN) não está disponível, e o seu fornecimento é feito de modo gratuito pela organização mundial de saúde (OMS).

Os dois fármacos são administrados por via oral em regime de ambulatório e contra-indicados (CI) na gravidez, insuficiência hepática e renal. É desconhecido qual dos dois apresenta maior tolerância em adultos infectados com T.cruzi, uma vez que nunca foram comparados entre si (Cortez, 2012).

Certos estudos revelam que o nifurtimox e o benzonidazole actuam por meio da formação de radicais livres e/ou metabolitos electrolíticos (Silva, 2009).

## 2.2. Combinações de fármacos existentes

Perante a progressiva ausência de resultados viáveis com apenas um fármaco, a combinação de fármacos para o tratamento da **Leishmaniose** tem-se tornado um gradual alvo de interesse. Estas associações terapêuticas em LV apresentam diversas vantagens. Primeiramente, a associação de fármacos de grupos químicos distintos permitem diminuir o tempo de tratamento bem como a quantidade integral de fármaco empregue com redução da toxicidade, melhor aceitação da terapia e decréscimo do encargo na saúde do individuo. Como tal, há também uma diminuição das despesas. As resistências são outro motivo que leva a lacunas no tratamento, como se verifica com os antimoniais pentavalentes (nomeadamente na Índia). Também se tem averiguado

resistências à miltefosina resultante de mutações, muito embora o seu uso contra LV tenha sido aplicado por curto período.

Deste modo, a terapia combinada pode auxiliar o atraso da evolução destas resistências e aumentar o tempo de semi-vida dos fármacos para este tipo de patologias. Por fim, este tipo de associações pode ainda otimizar a eficácia terapêutica em doentes com VIH, para os quais o tratamento em monoterapia não tem sido eficaz.

Diversos ensaios têm revelado um incremento da actividade leishmanicida de certos medicamentos usados em conjunto. Foi avaliada uma formulação de paromomicina com estibogluconato de sódio no tratamento LV com respostas efectivas (no Sudão).

A associação de alopurinol via oral com Pentostam® via endovenosa também foi aplicada contra LV (no Quênia). Ainda que a princípio a terapia tenha manifestado êxito, sucederam-se mais tarde algumas recaídas.

Foi igualmente testada uma combinação de alopurinol e antimónio contra ambos os fármacos isoladamente, no tratamento da Leishmaniose canina. As respostas obtidas revelaram que a terapia conjunta das duas substâncias activas obteve melhor resposta do que com cada uma delas em separado. Este composto (alopurinol) demonstrou inibir o crescimento de LC, mas apenas quando usado como adjuvante do antimónio pentavalente.

Com o tratamento conjunto, o curso da terapia com antimónio foi mais breve e a administração de alopurinol a longo prazo foi satisfatoriamente aceite.

Estes resultados sustentaram que a quimioterapia combinada é uma solução viável na promoção do tratamento LC. Contudo, as respostas são ainda muito inconclusivas e necessitam de mais estudos clínicos (Pham, 2013).

Imiquimod é uma amina de imidazoquinolina que em conjunto com o antimoniato de meglumina, se torna uma excelente alternativa para tratamento da LC. Contudo, grande parte das observações resulta de análises limitadas a um reduzido número de doentes. Deste modo, carece-se de mais ensaios para sustentar estes resultados (Mitropoulos, 2010).

Um outro estudo revelou que ainda não estão disponíveis associações de fármacos para LV, embora tenha sido avaliada a coadministração de alguns fármacos

anti-leishmania através de análises de toxicocinética experimentais e pré-clínicas mas sem resultados concretos.

Certos ensaios realizados revelaram que tanto a combinação de AmBisome com paramomicina ou miltefosine bem como miltefosine com paramomicina reduziu o custo de tratamento e teve sucesso no domínio da patologia.

No que se refere à LC algumas patentes demonstraram que antifúngicos azóis como fluconazol e itraconazol apresentam algum efeito terapêutico. Foram ainda efectuados estudos de terapia adjuvante com imunomoduladores com capacidade de recuperação, e ainda combinação de BCG com antimoniais. Uma vez mais os antimoniais em associação exibem actividade aumentada comparativamente com cada um deles em isolado. (Barret, 2012)

Todos os estudos realizados até agora relativamente à DC revelaram que esta não apresenta um tratamento farmacológico infalível, sobretudo na sua fase crónica. Assim, uma das opções mais proveitosas para a terapia de doentes chagásicos é também a terapia combinada, especialmente o sinergismo entre o benzonidazol (BNZ) e outros derivados azólicos, como itraconazol (ITZ) (Silva, 2014).

Por sua vez, o óxido nítrico administrado em conjunto com benzonidazol mostrou-se útil na prevenção da morte através da diminuição da parasitemia e inflamação ao nível do coração (Pereira, 2013).

### 2.3. Novos fármacos

A concepção de novos fármacos para a DC, é dotada de obstáculos sobretudo porque os doentes que ingressam na fase indeterminada não apresentam sintomatologia e há uma enorme complexidade para identificar parasitas. Já no caso das manifestações crónicas, impede toda a estimativa concludente de restabelecimento. Apesar disso, diversas substâncias encontram-se em estudos médicos para esta patologia. Os inibidores do lanosterol, nomeadamente **posoconazole** e **E1224** têm-se revelado muito promissores. Os dois encontram-se disponíveis por via oral e em fase preliminar de ensaios. O **inibidor protease cisteína** revelou igualmente actividade em protótipos de roedores crónicos e está em evolução pré-clínica.

Com o intuito de escapar às reacções adversas marcadas do nifurtimox e benzonidazol usados na DC, assim como a carência de formulação pediátrica e a sua reduzida actividade na eliminação do parasita, estão a ser realizados estudos clínicos com **antifúngicos triazóis** (ravuconazol, voriconazol). Contudo, determinados antifúngicos como cetoconazol e itraconazol, não estão aptos a incitar recuperação parasitológica completa nesta patologia.

O **posoconazol** mostrou resposta promissora no tratamento de doentes tanto em fase crónica como aguda, sobretudo em estirpes resistentes ao benzonidazol, sendo actualmente o aspirante de eleição nesta nova categoria terapêutica.

Os benefícios mais relevantes são sobretudo a sua acentuada actividade e selectividade, efeito terapêutico contra estirpes resistentes, maior tolerância e perfil de segurança. Os entraves mais significativos são as acentuadas quantias, associados às dificuldades e elevados custos de fabrico (Cortez, 2012).

A descoberta de uma célula bacteriana como a **nitro-redutase** em *T.cruzi* fundamenta a ideia de que os compostos têm a possibilidade de ser activados por parasitas, em lugar de células hospedeiras, reduzindo as reacções adversas, e a capacidade de ocorrência de mutações, uma relevante inquietação associada a estes compostos.

Relativamente à Leishmaniose e apesar da LV ser uma doença letal, não foi até à data possível desenvolver nenhuma vacina humana passível de utilização, e as que se encontram em análise são direccionadas para a configuração menos crítica da patologia, a forma cutânea. A investigação de infecções auto-resolução ou pessoas espontaneamente imunes facultam importante conhecimento quanto ao possível fabrico destas vacinas.

A leishmunização engloba a inoculação com parasitas *Leishmania* numa zona encoberta para evitar o aparecimento de lesões em regiões perceptíveis. No entanto, algumas análises indicaram uma defesa pouco eficaz contra LV e diminuta probabilidade de imunidade para outras vacinas (McCall, 2013).

Um outro ensaio foi executado com **leishmanolisina**, um relevante agente de virulência que fortuitamente poderá ser empregue como vacina contra a leishmaniose. Como tal, observou-se que a gp63 é a glicoproteína mais rica na *Leishmania*. Além do mais, a gp63 está ligada à defesa contra lise causada pelo sistema complemento.

Observações anteriores asseguram que esta glicoproteína é apta para activar citocinas envolvidas na resposta Th1. No âmbito da imunologia, uma vacina deve induzir a resposta Th1 e reduzir uma série de condições imunodepressoras. Posto isto, estima-se que a gp63 ou leishmanolisina é um relevante factor de virulência em tripanossomatídeos sendo portanto uma boa candidata à concepção de vacinas (Souza, 2014).

Os fármacos como a pentamidina têm sido já há algumas dezenas de anos usados contra estes dois tipos de doenças. Contudo, foram realizados estudos no sentido de encontrar agentes terapêuticos com ligação a melhores atributos farmacológicos e de segurança do que a pentamidina. Como tal, surge a **arylimidamida** (DB766), administrada via oral em ratos e parece indicar efeito terapêutico benéfico contra estirpe resistente, embora com janela terapêutica estreita. Noutros ratinhos os resultados parecem ter sido mais benéficos com DB613A, que revelou eficácia a metade da concentração máxima inibitória, em formas amastigotas (Buckner, 2010).

#### **2.4. Tratamentos naturais à base de plantas**

Desde a antiguidade, os compostos à base de plantas, animais e minerais têm sido empregados em medicina clássica na luta contra doenças humanas.

No decorrer dos tempos, esta medicina tem-se apresentado como o único cuidado de saúde acessível à diligência e intervenção de diversas patologias em múltiplas culturas. Presentemente, o exercício da medicina clássica tem até então um enorme abalo na saúde da população que não pode servir-se dos cuidados de saúde contemporâneos. Mais concretamente, aproximadamente 80% dos indivíduos que habitam em países subdesenvolvidos estão sujeitos quase integralmente a este tipo de compostos para resolver as suas carências básicas de tratamento.

Deste modo, o uso destas substâncias em fármacos tem despertado a atenção da indústria farmacêutica por todo o mundo, na procura de novos compostos com efeito terapêutico. Das substâncias naturais mais analisadas, são as plantas que predominam na origem de constituintes com efeito antileishmanicida.

Os fármacos extraídos de plantas têm sido enumerados por diversos laboratórios ao redor do planeta.

As principais vantagens dos fitocompostos abrangem: (i) defesa contra efeitos tóxicos; (ii) ampliação do efeito terapêutico; (iii) maior segurança; (iv) incremento do tempo de retenção; (v) defesa contra deterioração física e química (Vermelho, 2014).

Sendo a leishmaniose vista como uma das enfermidades mais negligenciadas, e com o intuito de indicar caminhos para a renovação no tratamento da mesma, diversas plantas tem revelado efeito terapêutico contra a *Leishmania*, tais como (Tabela 2): *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum*, *Tabernaemontana australis*, *Phyllanthus amarus*.

Os produtos à base de plantas são possíveis “minas”, imensamente diversas, de compostos com propriedades terapêuticas.

Tabela 2. Plantas e algumas substâncias activas isoladas com acção contra *Leishmania*,  
[adaptada de Oliveira et al., 2013]

Espécie / Família	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lamarck) Persoon Crassulaceae	<i>Plumbago scandens</i> (Muell. Arg) Miers Plumbaginaceae	<i>Physalis angulata</i> Schum. & Thonn. Solanaceae	<i>Piper aduncum</i> L. Piperaceae	<i>Tabernaemontana australis</i> L. Apocynaceae	<i>Phyllanthus amarus</i> L. Phyllanthaceae
Nome popular	Folha da fortuna	Louco	Camapu	Aperta ruão	Jasmin catavento	Quebra pedra
Parte da planta	Folhas	Raízes	Planta inteira	Inflorescências	Caule	Folhas
Extracto/Fracção/ Substância	Extracto aquoso das folhas	Substância isolada	Substância isolada de extracto etanólico	Fracção extraída Diclorometano	Fracção extraída com clorofórmio	Extrametanólico
Principais substâncias activas/Classe química	Quercetina (Quercetina- 3-O- $\alpha$ -L ramnospiranosí- deo) (flavonóide)	Plumbagina (5-hidroxi-2-metil naftoquinona)	Fisalinas B e F Secoster-óides	2',6'-Dihidroxi-4'- Metoxichalcona (chalcona)	Coronaridina (alcaloide indólico)	Geraniina, Filantusiina B, Filantusiina C, Amariina (Taninos), Polifenóis
Leishmania (amastigotas) (in vitro)	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. donovan</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i> <i>L. donovan</i>
Concentração inibitória para 50% da espécie testada <i>in vitro</i> (CI50)	1 $\mu$ g/ml	1,1 $\mu$ g/ml 0,4 $\mu$ g/ml	0,21 e 0,18 mM	24 $\mu$ g/ml	12 $\mu$ g/ml	78,3 $\mu$ g/ml 1-8 $\mu$ M
Modelo animal	Camundongos BALB/c infectados com LV (dose total de 8 mg) Camundongos BALB/c infectados com LC (400 mg/kg)	Camundongos BALB/c infectados com LV tratados com 2,5-5 mg/ kg/dia de plumbagina	Camundongos BALB/c infectados com LV Aplicação tópica 1x/ dia de Fisalina F em creme	Não  Determinado	Não  Determinado	Não  Determinado
Mecanismo de acção	Estimulação da produção de NO pelo macrófago, causando morte do parasita	Parece interferir na fosforilação oxidativa por acção sobre 10-ubiquinona	Não  Determinado	Destruição das mitocôndrias dos amastigotas sem afectar as mitocôndrias dos Macrófagos	Profundas alterações no parasita sem afectar a estrutura do macrófago	Activação do macrófago provavelmente por libertação de NO, TNF ou INF- $\gamma$
Referências	Muzitano et al., 2006 Da Silva et al., 1995 Gomes et al., 2009 Da Silva, Costa e Rossi- Bergman, 1999	Croft, Evans e Neal, 1985 Fournet et al., 1992	Guimarães et al., 2009	Torres-Santos et al., 1999	Delorenzi et al., 2001	Onocha e Ali, 2010 Kolodziej e Kiderlen, 2005

Segundo o estudo realizado por Mishra and Kale, os alcalóides, também denominados metabólitos secundários, são particularmente relevantes nas plantas como protecção contra diversos microorganismos e herbívoros e são equitativamente

essenciais para o homem no combate contra parasitas (Mishra, 2009). Vários alcalóides são descritos como possuindo notável actividade leishmanicida. Contudo, necessitam ser expostos a testes clínicos para utilizações futuras.

Os alcalóides que parecem indicar actividade leishmanicida são os alcalóides da quinolina, indólicos, isoquinolina, naftilisoquinolina, bisbenzilisoquinolina, estroidais, benzoquinolizidina, diterpenos, pirrolidínio, acridona,  $\beta$ -carbolina, esponja marinha, entre outros.



### **3.1. Novos Sistemas Terapêuticos**

O emprego de utensílios e produtos em nanoescala possibilitou o desenvolvimento de formulações de nanopartículas, dentre as quais os lipossomas, microemulsões, microcápsulas, de grande utilidade para a indústria farmacêutica.

Os novos sistemas de distribuição de fármacos (SDF), baseados em lipossomas são os mais analisados devido à sua grande biocompatibilidade, simplicidade de fabrico e variabilidade química. Este tipo de formulações são ainda biodegradáveis, biocompatíveis, não-imunogénicos e altamente multifacetados para a investigação, aplicações analíticas e terapêutica (Vermelho, 2014).

A procura de novos sistemas terapêuticos (NST) é uma alternativa adicional à concepção de novos agentes terapêuticos e terapia combinada para LV.

Estes sistemas têm a capacidade de preservar o medicamento contra o efeito de primeira passagem a que este está sujeito quando em contacto com os fluidos biológicos e são também passíveis de ser administrados por outras vias. Estas novas formulações acabam com as limitações de solubilidade reduzida em água, do mesmo modo que permitem efectuar o transporte de vários fármacos em simultâneo, facilitando deste modo a aplicação de terapia combinada.

A terapêutica convencional falha devido a diversos aspectos tais como: difícil e inadequado diagnóstico, casos de resistência aos fármacos, dosagem imprecisa, impossibilidade monitorizar adequadamente a dose, frequência administração elevada, fraca adesão do paciente, falta de procedimentos físicos que auxiliem o tratamento, inadequada resposta imune dos pacientes à terapêutica. Outros aspectos biofarmacêuticos que regem a concepção de NST incluem a permeabilidade do fármaco através das membranas celulares, o mecanismo de captação celular (principalmente no caso de infecções parasitárias intracelulares), estabilidade, actividade e cinética no ambiente da célula alvo (Date, 2007).

Contudo, os NST apresentam uma importante desvantagem que é o seu elevado custo (Pham, 2013).

Dos vários NST existentes, os lipossomas e as nanopartículas são especialmente viáveis contra LV (dependendo do fármaco que veiculam), pois transportam partículas submicrónicas que mais facilmente são capturadas pelo sistema fagocitário mononuclear, o que se torna numa vantagem adicional no tratamento desta patologia.

Na realidade, a administração intraperitoneal e intravenosa de lipossomas provou ser um ótimo sistema de distribuição de fármacos pois aumenta a acumulação destes em tecidos ricos em macrófagos, como o baço e fígado, áreas onde os parasitas *Leishmania* estão também em maior quantidade.

Os **lipossomas** são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas de fosfolípidos que englobam um núcleo aquoso.

Alguns estudos levados a cabo revelaram que os antimoniais encapsulados em lipossomas apresentam um efeito terapêutico 700 vezes superior contra Leishmaniose canina. Um outro fármaco desenvolvido neste âmbito, foi a anfotericina B (AmB) lipossomal (AmBisome®) que se mostrou 350-750 vezes mais efectivo do que o antimoniato de meglumina e o AmB não encapsulados. Esta formulação permitiu também diminuir os efeitos tóxicos ao nível das células, e revelou maior estabilidade e actividade contra LV. Correntemente, este é o único produto autorizado e vendido para a terapia da Leishmaniose. O exemplo do AmB lipossomal mostra claramente que a concepção de um novo sistema de transporte do fármaco pode melhorar substancialmente o desempenho do mesmo.

Açúcares acoplados a lipossomas parecem também possuir actividade leishmanicida relativa aos fármacos livres, bem como reduzida toxicidade.

Os **niossomas** são vesículas constituídas por surfactantes não-iónicos e colesterol que apresentam características similares aos lipossomas. Estes surfactantes necessitam de uma correcta escolha de modo a serem económicos e seguros, permitindo otimizar o efeito terapêutico contra a leishmaniose.

As **NLS** (nanopartículas de lípidos sólidos) consistem em NST à escala nanométrica, nos quais a matriz é constituída por lípidos sólidos à temperatura ambiente. Geralmente são dotados de elevada segurança, simplicidade fabrico em ampla extensão, e montante diminuto. Estes sistemas também permitem uma libertação controlada do fármaco e expulsão imediata pelo fígado e baço.

Embora os ensaios ainda não permitam claras conclusões, as NLS revelaram aptidão na promoção do efeito terapêutico de agentes leishmanicidas e antimaláricos com anfotericina B e arizalina.

Verificou-se também, numa outra análise, melhor absorção ao nível hepático e aumento do efeito terapêutico antileishmaniose utilizando nanoesferas com lípidos revestidos por manose de AmB.

Outros **NST à base de lípidos** com AmB patenteados para uso terapêutico, são as **dispersões coloidais** de AmB (Amphocil®) e os **complexos lipídicos** de AmB (Amphotec®). Do mesmo modo que os anteriores, também estes permitem diminuir os efeitos tóxicos e elevar o índice terapêutico. O AmBisome® é o NST aplicado para o tratamento da LV via parentérica e já existem genéricos em comercialização.

Uma outra classe de NST são as **nanopartículas poliméricas**, que podem dividir-se em: - **nanoesferas**, sendo a matriz constituída por correntes de polímeros interligados; - **nanocápsulas**, cujo depósito de nanopartículas de óleo ou água é envolto por um fino revestimento polimérico.

Ambos os veículos permitem otimizar a libertação do fármaco bem como a sua posterior eliminação. Assim, foram testadas nanopartículas carregadas com primaquina, com uma resposta 21 vezes mais elevada em termos de libertação do fármaco e com menos efeitos laterais. Estes mesmos resultados se observaram com utilização de nanopartículas contendo AmB. Também se avaliaram nanopartículas de pentamidina, cuja resposta obtida foi 25 vezes maior em termos de libertação do fármaco e com menos efeitos laterais.

Como já foi referido anteriormente, à excepção de miltefosine e sitamaquina, os medicamentos leishmanicidas nos tempos correntes têm uma biodisponibilidade oral muito reduzida. Este aspecto é consequência de uma enorme possibilidade de decomposição enzimática, reduzida permeação membranar ao nível do intestino, e mais relevante ainda, a reduzida solubilidade de várias substâncias em água.

Posto isto, podem ser adoptadas algumas alternativas com o intuito de ultrapassar estas limitações, concebendo assim NST orais mais activos e estáveis. Dentre as quais, pode referir-se: (a) aumento da solubilidade aparente; (b) alteração do modo de absorção; (c) aumento do tempo de residência.

Em seguida, iremos abordar NST que se incluem numa ou mais destas categorias, visando o incremento da biodisponibilidade oral:

a) Aumento da solubilidade aparente

*a.1) redução do tamanho das partículas*

A concepção de fármacos à escala nanométrica permite amplificar a área de contacto e favorecer a decomposição no tracto GI. Como exemplos, temos as nanopartículas poliméricas e nanosuspensões.

Um estudo realizado com AmB formulado em nanocápsulas contendo PLGA revelou-se 8 vezes superior ao Fungizone®, tanto em biodisponibilidade oral, bem como em actividade antifúngica.

As **nanosuspensões** são constituídas pelo fármaco mais uma dose mínima de agentes de superfície, geralmente sob a forma de uma dispersão aquosa. Analisaram-se alguns antiparasitários articulados em nanosuspensões, e estes foram avaliados com êxito *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania* spp.

Salienta-se, especialmente, a nanosuspensão de AmB com dimensão de partícula de aproximadamente 530 nm, obtida por homogeneização de alta pressão com um conjunto de surfactantes: pluronic F68, Tween 80 e colato de sódio. Esta formulação apresenta-se eficiente contra LV após administração oral no rato, opostamente ao AmBisome®, Fungizone® e AmB micronizado administrado sob idênticas circunstâncias, os quais não mostraram nenhuma actividade.

*a.2) complexação com dextrinas*

Um outro modo de aumentar a solubilidade do fármaco de forma a auxiliar absorção oral é o uso de ciclodextrinas.

As **ciclodextrinas** são oligossacáridos cíclicos hidrofílicos, com um espaço extrínseco hidrofílico e uma concavidade central lipofílica, empregues como promotores da absorção do medicamento aquando da sua distribuição. Geralmente os fármacos hidrófobos são colocados na abertura central, aumentando a solubilidade em água. Através de uma sequência de ensaios foi provado que o antimoniato de meglumina quando complexado com ciclodextrina vê a sua biodisponibilidade oral melhorada.

b) Alteração do modo de absorção

*- uso de sistemas à base de lípidos*

Existe uma clara série de certezas que apontam para os sistemas à base de lípidos como apresentando elevada aptidão na promoção da biodisponibilidade de compostos com reduzida solubilidade por via oral. O uso de lípidos como aditivos pode alterar o meio GI, modificando o modo de absorção e enzimas que os metabolizam. Como tal, os NST que se enquadram nesta categoria são essencialmente: - micro/nanoemulsões; - micelas mistas; - nanopartículas à base de lípidos.

Uma **emulsão** é uma dispersão de pequenas gotículas de um líquido num segundo líquido no qual o primeiro não é miscível e usualmente exige um ou mais tensoactivos para equilibrar a interface. No caso das **nanoemulsões** as gotas estão na gama dos nanómetros.

A produção de uma microemulsão O/A carregada com AmB mostrou habilidade no aumento da dissolução do fármaco em 1000 vezes, com redução dos efeitos tóxicos para as células. Também um outro ensaio realizado com uma formulação autoemulsionante de AmB com mono e diglicerídeos mais vitamina E (estabilizante), demonstraram estabilidade no fluido intestinal, sendo que a concentração de AmB se manteve constante por 6 horas, e com boa biodisponibilidade oral.

Um outro procedimento de desenvolvimento de novos fármacos, ocorre pela produção de **micelas mistas** com compostos anfifílicos. Este tem a capacidade de reproduzir o sistema fisiológico, no qual os lípidos provenientes da alimentação são transformados em micelas mistas de sais biliares. Um exemplo da utilidade destes ST em formulações farmacológicas foi o estudo com AmB integrado nessas micelas com fosfolípidos e ácidos biliares. Como tal, a formulação favoreceu a absorção de AmB num protótipo de perfusão de alça intestinal em ratos, apesar de não experimentada no animal sadio.

As nanopartículas à base de lípidos apresentam benefícios comparativamente aos outros NST para via oral, já que são dotados de boa estabilidade física, simplicidade de obtenção de fármacos hidrofóbicos. Entre estes destacam-se: SLN, cubossomas e *nanocochleats*.

As NLS foram alvo de estudo contra a Leishmaniose, tendo sido elaborado um, à base de AmB, exclusivamente para administração oral. O estudo obteve uma resposta

de biodisponibilidade aumentada, bem como tempo de semi-vida, através de libertação controlada.

Os **cubossomas** são estruturas lipídicas cristalinas com simetria cúbica formada por moléculas anfifílicas e contém duas fases aquosas não homogêneas alternadas, delimitadas por bicamadas lipídicas. Assim, possuem uma grande aptidão para encapsular substâncias activas solúveis em água, garantindo defesa contra o meio ambiente externo. Deste modo, são o processo apropriado para administração oral. Uma vez mais, foi realizado um estudo com cubossomas contendo AmB, não havendo no entanto parecer biológico.

Por fim, temos os *nanocochleats* que correspondem a nanoestruturas com formato de charuto, constituído por bicamadas lipídicas carregadas negativamente, unidas a um catião divalente, geralmente o cálcio.

Os benefícios deste tipo de NST são essencialmente a segurança que fornecem ao fármaco contra o meio GI, defesa contra a oxidação, conservação da morfologia após liofilização, que possibilita o seu armazenamento por extensos períodos à temperatura ambiente. O estudo de uma formulação de *nanocochleats* contendo AmB evidenciou melhoria na absorção oral e na actividade antifúngica relativamente ao AmB livre.

c) Aumento do tempo de residência

Outra alternativa que visa a promoção da biodisponibilidade oral de fármacos, é o incremento do tempo de residência do fármaco no local de absorção. NST aptos a ligar-se à parede intestinal, são uma forma de alcançar esse propósito. O incremento do gradiente de concentração local do fármaco ao nível da membrana de absorção, por meio de contacto prolongado do NST com o muco, aumenta a porção de fármaco capaz de ser assimilado. Além do mais, os NST podem ainda incluir aditivos, que tem capacidade de fomentar a difusão através do epitélio da mucosa e, portanto, favorecer a permeação do fármaco. Um utensílio útil na criação destes NST e que conjuga bioadesão com características de aumento de absorção, é o **quitosano**.

O quitosano é um polissacarídeo natural composto por glucosamina e N-acetilglucosamina, e é obtido por meio de insectos e crustáceos. Este composto pode

ainda funcionar como um promotor de absorção através do epitélio intestinal, por meio das suas competências em fortalecer a difusão dos mucoadesivos.

Recentemente foi estudada uma preparação de nanopartículas de quitosano que manifestaram redução dos efeitos tóxicos via IV, e boa actividade leishmanicida num modelo de ratos (Pham, 2013).

O principal desafio da farmacoterapia da DC é atingir os parasitas intracelulares disseminados. As infecções bacterianas intracelulares causadas por protozoários, apresentam barreiras físicas que dificultam a chegada de porções significativas de fármaco ao local alvo. O BNZ e nifurtimox (NF) exibem elevado volume de distribuição (Vd), contudo o fraco acesso aos alvos intracelulares origina concentrações plasmáticas e efeitos tóxicos elevados. A habilidade de alterar a superfície das células alvo e tecidos, bem como a fagocitose, atribui aos NST a competência de ultrapassar essas barreiras e transportar os fármacos num volume extraordinariamente pequeno, minorando a sua concentração no sangue em circulação e tecidos não-alvo.

Posto isto, a eficácia dos lipossomas contra a **tripanossomíase ou DC**, tem sido investigada numa extensão muito inferior relativamente à Leishmaniose. Esta situação resulta possivelmente do posicionamento difundido dos parasitas nas células do sistema fagocítico mononuclear (MPS), o que dificulta o seu alcance com o emprego de lipossomas, que são definidos por se aglomerar nas MPS após injeção intra-venosa (IV).

Nakae e seus colaboradores em duas pesquisas apontaram a eficácia de lipossomas portadores de carga positiva com esterilamina (isento de fármaco) contra *T.Cruzi*. Mais interessante é que, lipossomas carregados positivamente com fosfatidilcolina e estearilamina, mostraram capacidade de destruir *T. cruzi* num curto espaço de tempo (30'), numa dose de lípidos moderadamente reduzida (100 uM) e sem toxicidade para os eritrócitos. Por sua vez, a fosfatidilcolina e a esterilamina testadas isoladamente, não revelaram nenhuma actividade contra parasitas, reforçando a ideia de que a associação de ambos num lipossoma é de extrema relevância para a actividade antiparasitária.

Um outro estudo foi realizado por Morilla e seus colaboradores com lipossomas encapsulados com BNZ, e embora a concentração deste no fígado e no sangue tenha aumentado, a eficácia desta formulação no tratamento da DC não foi viável, já que os

lipossomas não foram capazes de fazer o BNZ chegar ao citoplasma, local onde usualmente reside o parasita. Com este fracasso, Morilla e seus colaboradores numa outra investigação, avaliou a utilidade de lipossomas sensíveis ao pH incorporados com etanizole (ETZ) na promoção da chegada deste ao citoplasma. Esta formulação resultou em aproximadamente 72% de parasitas mortos, bem como redução da parasitemia, contrariamente ao ETZ isolado, que não apresentou qualquer actividade. No entanto, também esta associação não permitiu total eliminação do parasita, mas contribuiu para o avanço de próximos estudos com lipossomas sensíveis ao pH.

Yardley e seus colaboradores relacionaram a actividade de AmB à base de lípidos *in vitro* e *in vivo*, nomeadamente AmBisome®, Amphocil®, Abelect® no tratamento da DC. Apesar do Amphocil® se ter revelado mais eficiente *in vitro*, *in vivo* foi o AmBisome® que demonstrou maior actividade na redução de parasitemia relativamente às outras formulações testadas.

As nanopartículas poliméricas, assim como os lipossomas, são também alvo de escassa investigação no que se refere ao tratamento da DC. Contudo, Gonzalez-Martin e seus colaboradores apontaram a utilidade de nanopartículas de polietilenoacrilato carregados com nifurtimox (mais propriamente nanoesferas), contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares com um resultado de IC<sub>50</sub> 21 vezes menor do que o fármaco livre. Os mesmos autores num outro ensaio, demonstraram a actividade *in vitro* de nanopartículas de polietilenoacrilato carregadas com alopurinol contra epimastigotas de *T.cruzi*, com uma resposta duas vezes mais eficaz que o fármaco livre. No entanto, os estudos realizados, para serem validados, necessitam de confirmação *in vivo*, no sentido de confirmar o verdadeiro êxito destas nanopartículas.

Molina e seus colaboradores também testaram nanopartículas de DO870 (PEG e ácido láctico) injectadas IV num modelo de rato contaminado com *T.cruzi*. A formulação conduziu à cura da tripanossomíase com uma actividade dependente da dose, isto é, quanto mais elevada a dose maior foi efeito terapêutico produzido contra DC. Apesar dos poucos avanços alcançados através destes estudos, espera-se que contribuam para novas abordagens, pois são ainda muito inconclusivos e necessitam de mais investigação. (Date, 2007)

No último decénio, os progressos da nanociência têm sido, de modo similar, aplicados a medicamentos de origem natural, o que exhibe uma interpelação auspiciosa e

útil no tratamento de diversas patologias, nomeadamente a leishmaniose. As nanoformulações preparadas com produtos oriundos de plantas medicinais e a sua actividade leishmanicida encontram-se relatados em seguida, sendo os lipossomas, niossomas, e nanopartículas as principais formulações abordadas.

As saponinas (lipossomas) e os alcalóides (nanopartículas) são os essenciais componentes de plantas empregues para preparar nanoformulações. Foi descrita uma considerável efectividade de flavonóides contra espécies de *Trypanossoma* e *Leishmania*, por meio de um ensaio efectuado com quercetina. No seguimento deste ensaio, foram experimentadas formulações de quercetina encapsuladas tanto em niossomas, como lipossomas e microesferas, e em todas se verificou redução da parasitemia relativamente ao fármaco livre, revelando que a quercetina encapsulada é mais activa na contenção da Leishmaniose.

Da mesma forma, a inclusão de terpenóides em sistemas contendo micro/nanopartículas também apresentou uma actividade terapêutica. No entanto, a procura de fármacos contra a Leishmaniose é deveras árdua, já que grande parte dos produtos apresenta reduzida solubilidade.

Mediante as diversas formulações avaliadas, as nanopartículas carregadas com andrografolida, um diterpenóide extraído da planta *Andrographis paniculata*, mostraram forte actividade leishmanicida. Mediante os ensaios realizados, demonstrou-se que a dimensão da partícula é uma relevante condição para a eficiência do transporte do fármaco. Na realidade, nanopartículas numa escala inferior a 200 nm, têm sido ligados ao aumento da fagocitose por macrófagos contaminados com *Leishmania*.

Um outro estudo com sistemas multiparticulados, mais propriamente niossomas, microesferas, lipossomas e nanopartículas, tiveram a sua actividade leishmanicida melhorada com o uso de Bacosaponina-C, (extraída de *Bacopa monnieri*), por redução da carga parasitária no baço de hamsters, comparativamente com os animais testados com fármaco livre. Com a mesma quantidade, as vesículas que apresentaram melhor actividade foram: nanocápsulas > niossomas > lipossomas > microesferas. Apesar dos resultados promissores, o uso de saponinas é bastante restrito devido à sua elevada toxicidade.

Um outro composto com visível efeito contra a leishmaniose foi obtido a partir da planta *Swertia chirata*, o amarogentina. As preparações lipossómica e niossomal deste

composto diminuíram a incidência parasitária no baço em 69 e 90%, respectivamente, ao passo que o fármaco livre na mesma quantidade obteve uma resposta de apenas 39%.

Por sua vez, o alcalóide piperina amida, extraído da planta *Piper nigrum*, tem evidenciado um forte efeito tanto contra LV como LT. Esta substância incorporada em lipossomas reduziu a parasitemia em aproximadamente 70%, ao passo que na sua forma livre além de apresentar menor eficácia também revelou maior toxicidade. Os melhores resultados foram obtidos com nanoesferas de piperina.

A harmine, isolada de *Arruda síria*, manifesta actividade leishmanicida *in vitro*. Este alcalóide incorporado em lipossomas, niossomas, e nanopartículas foram capazes de reduzir a parasitemia no baço dos animais testados. Apesar disso, o mecanismo de acção da harmina contra *Leishmania* está pouco elucidado, e uma vez mais são necessários mais estudos neste âmbito.



## CONCLUSÃO

A quimioterapia continua a ser a estratégia de eleição para combater e erradicar as DTN. Esta abordagem terapêutica serve, não só como modo de intervenção e restabelecimento de pessoas infectadas por tais patologias, mas também protecção da saúde e consolidação dos serviços de vigilância.

A farmacovigilância, apesar de ainda muito negligenciada, é um factor de extrema importância e que deveria ser levado em consideração por técnicos e sistemas de saúde, sobretudo neste tipo de patologias, das quais o conhecimento acerca dos doentes e cursos de transmissão é tao pertinente.

Os fármacos usados na terapia de DTN, tendo sido concebidos há dezenas de anos, apresentam não só efeitos tóxicos e laterais, como também são alvo de elevadas resistências. Assim, surge a emergente necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que apresentem bioequivalência *in vivo*.

Outras medidas importantes a tomar, consistem na instrução dos habitantes destas zonas endémicas, melhorias nos requisitos elementares de higiene e saneamento, condição monetária, aspectos estes que deveriam receber superior reparo por parte dos governos. Uma das limitações ao tratamento farmacológico pode dever-se à incapacidade de adoptar algumas destas medidas, conduzindo à propagação destas infecções.

Os dois fármacos actualmente utilizados no tratamento da DC são apenas activos contra a fase aguda da doença, mas não contra a crónica. Além do mais, as reacções adversas dos mesmos são danosas e responsáveis pela fraca adesão dos doentes à terapêutica.

Relativamente à leishmaniose, apesar dos progressos já alcançados no conhecimento do parasita, a terapêutica ainda falha devido à enorme diversidade de espécies existentes com características particulares. Deste modo, o controlo destas patologias torna-se num incómodo iminente pois propaga-se cada vez mais, e conduz à exacerbação de outras afecções, como é o caso do VIH.

Neste sentido surge a necessidade urgente de criar novos sistemas terapêuticos que visem ultrapassar estas limitações, e melhorar o transporte dos fármacos até ao local alvo, garantindo aumento da eficácia terapêutica. Um dos principais objectivos dos NST é conceber formulações passíveis de ser administradas via oral. Os sistemas coloidais

são seriamente proveitosos para fármacos pouco solúveis em água, como é o caso da anfotericina B, pois expressam-se sob a forma de dispersão, e facilitam a dissolução. Estes sistemas também são ricos em lípidos que permitem bioadesão, conduzindo a uma maior permanência no tracto GI.

Uma outra estratégia interessante é a investigação farmacêutica em plantas medicinais. A junção de fitoquímica com nanoformulações pode criar novas possibilidades de pesquisa de novos fármacos antiparasitários, uma vez que estas preparações podem aprimorar a actividade de compostos naturais. Esta é uma área rica em possibilidades, no entanto, a maioria dos estudos ainda estão limitados a pesquisas básicas por falta de financiamento.



## BIBLIOGRAFIA

- Andrews, K., Fisher, G., Adams, T. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance*, 4 (2), pp. 95-111.
- Astelbauer, F., Walochnik, J. (2011). Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 (2), pp.118-124.
- Badiee, A. et alii (2013). Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: Present and future trends. *Vaccine*, 31 (5), pp. 735-749.
- Barret, M.P., Croft, S.L. (2012). Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Oxford Journals*, 104 (1), pp. 175-196.
- Buckner, F., Navabi, N. (2010). Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Author Manuscript*, 23 (6), pp. 609-616.
- Buchner, F.S., Urbina, J.A. (2012). Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2 , pp. 236-242.
- Campino, L., Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, pp. 859-864.
- Chatterjee, M., Sen, R. (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. *Phytomedicine*, 18 (12), pp. 1056-1069.
- Cortez, J. et alii (2012). A Expressão Global da Doença das Chagas – Oportunidades Emergentes e impacto em Portugal. *Revista Científica da Ordem dos Médicos*, 25 (5), pp. 332-339.

Date, A.A., Joshi, M.D., Pratavala, V.B. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (6), pp. 505-521.

Davies, R.C., et alii (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, 326 (7385), pp. 377-382.

Dias, J., Coura, J., Yasuda, M. (2014). The present situation challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47 (1), pp. 123-125.

Dias, L., et alii (2009). Quimioterapia da doença das Chagas: estudo da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, 32 (9), pp.2444-2457.

Dumonteli, E., et alii (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines*, 11 (9), pp. 1043-1055.

Ferreira, M.A., et alii (2009). A new approach for potential drug target discovery through *in silico* metabolic pathway analysis using *Trypanosoma cruzi* genome information. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (8), pp. 1100-1110.

Flohé, L. (2012). The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnology Advances*, 30 (1), pp. 294-301.

Gilbert, I. (2013). Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33 (3), pp. 37-47.

Junior, L. et alii (2012). Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, pp. 11-19.

Lupi, O., et alii (2009). Tropical Dermatology: tropical diseases caused by protozoa. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60 (6), pp. 897-925.

Machado, F.S., Tanowitz, H.B., Teixeira, M. (2010). New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. *British Journal of Farmacology*, 160 (2), pp. 258-259.

Maillo, B.M., Vélez, R.L. (2013). Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs*, 73 (17), pp. 1889-1920.

McCall, L.I., et alii (2013). Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 31 (10), pp. 1420-1425.

McKerrow, J.H., et alii (2009). Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (1), pp. 263-269.

Millington, O.R., et alii (2010). Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 126 (3), pp. 310-317.

Mishra, B.B., et alii (2009). Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, 80 (2), pp. 81-90.

Mitropoulos, P., Konidas, P., Konidas, M. (2010). New world cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63 (2), pp. 309-322.

Murray, M. et alii (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366 (9496), pp. 1561-1577.

Murray, H.W. (2012). Leishmaniasis in the United States: Treatment in 2012. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86 (3), pp. 434-440.

Nagill, R., Kaur, S. (2011). Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *International Immunopharmacology*, 11 (10), pp. 1464-1488.

Oliveira, L., Gilbert, B., Bôas, G. (2013). Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos*, 8 (1), pp. 33-42.

Oliveira, J., Machado, K., Freitas, R. (2014). Produtos Naturais aplicados a doenças negligenciadas: prospecção tecnológica. *Revista Geintec*, 4 (2), pp. 729-734.

Pereira, P., Navarro, E. (2013). Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19 (1), pp. 1-8

Pham, T.T., et alii (2013). Interactions of antileishmanial drugs with monolayers of lipids used in the development of amphotericin B – miltefosine – loaded nanocochleats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, pp. 224-233.

Pham, T.T., Loiseau, P.M., Barrat, G. (2013). Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *International Journal of Pharmaceutics*, 454 (1), pp. 539-552.

Pita, S.S., Paseutti, P.G. (2011). Alvos Terapêuticos na Doença das Chagas: a Tripanotona Redutase como Foco. *Revista Virtual de Química*, 3 (4), pp. 307-324.

Romero, E.L., Morilla, M.J. (2012). Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp. 576-588.

Saha, P., Mukhopadhyay, D., Chatterjee, M. (2011). Immunomodulation by chemotherapeutic agents against leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, 11 (11), pp. 1668-1679.

Santos, F., et alii (2013). Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33 (3), pp. 37-47.

Setzer, W. (2003). Trypanosomatid disease drug discovery and target identification, *Future Science*, 5 (15), pp. 1703-1704.

Silva, E.L., Nicoletti, M.A. (2013). Controle e tratamento das doenças negligenciadas: visão da situação actual. *Revista Saúde*, 7, pp. 65-81.

Singh, N., Kumar, M., Singh, R.K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5 (6), pp. 485-497.

Singh, B., Sundar, B. (2012). Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 30 (26), pp. 3834-3842.

Tiuman, T.S., et alii (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15 (8), pp. e525-e532.

Urbina, J.A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, 115, pp. 55-68.

Vermelho, A., et alii (2014). Leishmaniasis: Possible New Strategies for Treatment. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/leishmaniasis-possible-new-strategies-for-treatment>. [Consultado em: 10/10/2014].

Zaghi, D., et alii (2011). New World cutaneous leishmaniasis: Current challenges in diagnosis and parenteral treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64 (3), pp. 587-592.