



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS DE CASCAVEL*
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PCF
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATO
OBTIDO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE *Cecropia pachystachya* TRÉCUL**

MAIARA ALINE DAGA

CASCAVEL - PR

2021

MAIARA ALINE DAGA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATO
OBTIDO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE *Cecropia pachystachya* TRÉCUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Thaís Soprani Ayala

CASCADEL - PR

2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do
Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Daga, Maiara Aline Avaliação da atividade
trípanocida in vivo e in vitro de extrato obtido por
fluido supercrítico de Cecropia
pachystachya Trécul / Maiara Aline Daga;
orientadora Rafael Andrade Menolli; coorientadora Thaís
Soprai Ayala. -Cascavel, 2021. 68 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de
Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de
Ciências
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Imunologia. 2. Parasitologia. 3. Embaúba. I.
Menolli, Rafael Andrade , orient. II. Ayala, Thaís Soprai,
coorient.

III. Título.

MAIARA ALINE DAGA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE EXTRATO POR FLUIDO
SUPERCRÍTICO DAS FOLHAS DE *Cecropia pachystachya* TRÉCUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Thais Soprani Ayala

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE
Orientador

Ana Claudia Paiva Maller

Prof^ª. Dra Ana Claudia Paiva Alegre Maller
*Centro Universitário Fundação Assis
Gurgaz
FAG*

Prof^ª. Dra. Fernanda Giacomini Bueno
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE

Cascavel - PR

2021

BIOGRAFIA RESUMIDA

Maiara Aline Daga, natural de Toledo, Paraná, Brasil, nascida em 13 de maio de 1992. Graduiu-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – UNIOESTE, *campus* de Cascavel, tendo finalizado o curso em 2018. Ingressou no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas no ano de 2019. É especialista em Hematologia e Oncologia pela Uninter, com conclusão do curso em 2021. Trabalhou como farmacêutica assistente na Raia Drogasil de Agosto de 2019 até Janeiro de 2021. Cursa Pós - Graduação *Lato Sensu* em Saúde Estética no Centro Universitário Assis Gurgaz – FAG desde Julho de 2021. Atualmente atua como farmacêutica assistente na Drogavet desde Fevereiro de 2021 e desenvolve projeto experimental de dissertação junto a linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli e coorientada pela Prof^a. Dra. Thaís Soprani Ayala.

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante"

(O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry)

A minha mãe, que esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida e ao meu pai, que estará sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por minha vida e em tempos de pandemia, me dar saúde para ir em busca dos meus sonhos.

A todos os meus familiares, incentivadores e apoiadores da minha qualificação profissional. De modo muito especial, a minha mãe Marcia Arnold Daga, que em meio a toda a correria do dia a dia sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me dando amparo nos momentos difíceis. Obrigada pela paciência e compreensão, tudo isso foi por você. Ao meu pai Nei Paulo Daga, que partiu tão cedo e agora somos um só. Minha eterna gratidão por ter tido a honra de ser sua filha.

Ao meu irmão Alisson Luan Daga, por ser um exemplo de ser humano, por ter me acolhido sempre que precisei, pelos conselhos e por sempre me incentivar a ser melhor. Não há nada que expresse o tamanho do meu orgulho por ti. Saber que tenho você como irmão faz tudo ficar mais leve.

Ao meu namorado Alexandre Daronco, por todo incentivo, paciência e amor. Obrigada por estar sempre ao meu lado. A minha madrinha Ivanete Daga Cielo que me ajudou muito nessa caminhada, você sempre será um exemplo pra mim.

Aos meus amigos que estiveram comigo nessa jornada, em especial a Aline da Silva Mattos, por sempre ser solícita em ajudar no que fosse preciso. Obrigada pela sua amizade e parceria. As alunas da Iniciação Científica, de modo especial a Amanda Stefanello que sempre se prontificaram em auxiliar nos experimentos. Aos colegas do laboratório por todo auxílio nessa jornada. A vocês meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli e a minha coorientadora Dra. Thaís Soprani Ayala por todo conhecimento compartilhado e por toda paciência, o quanto eu aprendi e cresci nesses últimos anos foi porque tenho vocês como inspiração. Serei sempre grata por essa oportunidade.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) por cultivar a excelência, primando pelo amplo desenvolvimento de seus alunos e por todos esses anos de história.

A todos que, de uma forma ou outra, colaboraram para que o trabalho fosse realizado com êxito.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATO OBTIDO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE *Cecropia pachystachya* TRÉCUL

RESUMO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que afetam milhões de pessoas, sendo consideradas um grande problema de saúde pública e de elevada incidência em países subdesenvolvidos. Dentre as doenças tropicais negligenciadas inclui-se a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido por meio da picada de triatomíneos, acidentes laboratoriais, verticalmente e pela ingestão oral que apresenta as formas aguda e crônica da doença. O único medicamento disponível para o tratamento da doença de Chagas é o Benzonidazol, que possui diversos efeitos colaterais, dificultando a adesão dos pacientes. Plantas e seus extratos têm sido muito utilizados na busca por alternativas nos tratamentos para diversas doenças e são importantes para a indústria, pois podem servir como fonte de matérias-primas para novos medicamentos. A utilização das plantas do gênero *Cecropia* estão dentre aquelas com alto potencial medicinal, apresentando diversos componentes bioativos com distintas atividades biológicas, sendo utilizados para o tratamento de inúmeras patologias. A espécie *Cecropia pachystachya trécul* pertence à família Urticaceae, é conhecida popularmente como embaúba e apresenta em sua composição diversos compostos como taninos, flavonoides, alcaloides, entre outros. Devido à ação antimicrobiana já detectada em extratos de embaúba, buscou-se avaliar sua ação *in vitro* e *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* de um extrato das folhas de *C. pachystachya* obtido por CO₂ supercrítico. Foram avaliados a citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais de camundongos e atividade tripanocida do extrato sobre diferentes formas do *T. cruzi* *in vitro*. Foi analisado se o extrato também teria ação sobre os parasitas se administrado via oral em animais infectados com formas tripomastigotas. Os macrófagos e os parasitas receberam tratamento com diferentes concentrações (5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 175, 200, 300 µg/mL) do extrato diluído em meio. Não houve alteração na viabilidade celular, porém o extrato teve ação contra as formas epimastigotas com uma Concentração inibitória de 50% dos parasitas (CI₅₀) de 17,9 e Índice de Seletividade (IS) de 22,33 e para os tripomastigotas a CI₅₀ foi de 26,73 e o IS de 14,96 comparados com o Benznidazol (medicamento de referência) onde os CI₅₀ foram de 3,13 e 7,30, respectivamente e os IS de 22,33 e 14,96, respectivamente. Nos experimentos *in vivo* verificou-se que os extratos via oral pioraram o quadro dos animais, com maior parasitemia e menor sobrevivência, quando comparados aos animais não tratados. O extrato providenciou um quadro anti-inflamatório nos animais infectados e tratados, com maior presença de IL-10 plasmática e menor produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais. Ainda, esses animais tiveram acentuada a resposta de perfil Th2, com maiores níveis de IL-4. Assim, o extrato de embaúba obtido por extração por CO₂ supercrítico mostrou atividade tripanocida *in vitro*, porém não demonstrou ação *in vivo*, na qual sua ação anti-inflamatória acarretou uma piora no quadro de infecção.

PALAVRAS-CHAVE: tripanossomíase, embaúba, atividade antiparasitária.

**EVALUATION OF *IN VIVO* AND *IN VITRO* TRIPANOCIDAL ACTIVITY OF
EXTRACT OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID FROM *Cecropia
pachystachya* TRÉCUL**

ABSTRACT

Overlooked Tropical diseases are a various group of transmittable diseases that affect millions of people, they are considered as a huge public health issue with strong emphasis in underdeveloped countries. Between the overlooked tropical diseases, includes the Sore disease or well known as Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, that is transmitted by the triatomines pic, laboratory accidents, vertically or by oral intake, and it causes the acute and chronic forms of the disease. The only available medication for Chagas disease treatment is the benznidazole, which has several side effects, hindering the patient compliance. Plants and their extracts have been used in pursuit of alternatives of treatment for a large amount of diseases, and are important to the industry, because they can serve as source of raw materials to new medications. The use of herbs of the sort *Cecropia*, are among those with high medical potential, showing several bioactive components with distinct biological activities, being used for the treatment of many pathologies. The species *Cecropia pachystachya* belongs to the Family Urticaceae, is popularly known as baobab, and has in its composition tannin compounds, flavonoids, alkaloids and more. Due to the antimicrobial action already detected in baobab extracts, sought to evaluate its action in vitro and in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* of an extract from the leaves of *C. pachystachya*, obtained by supercritical carbon dioxide. Were assessed the cytotoxicity on mice peritoneal macrophages, and the extract's trypanocidal activity on different forms of *T. cruzi* in vitro. It was analyzed whether the extract would also act on parasites if taken orally by animals infected with trypomastigotes. Macrophages and parasites were treated with different concentrations (5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 175, 200, 300 µg/mL) of the extract diluted in half. There was no change in cell viability, but the extract had action against the epimastigotes forms with an Inhibitory concentration of 50% of the parasites (CI₅₀) of 17,9 and Selectivity Index of 22,33 and for trypomastigotes the CI₅₀ was 26.73 and the Selectivity Index was 14,96 compared to Benznidazole (reference medicine) where the CI₅₀ were 3,13 and 7,30 respectively and the Selectivity Indexes were 22,33 and 14,96 respectively. In the in vivo experiments it was found that the orally administered extracts worsened the animals' condition, with higher parasitemia and lower survival, compared to untreated animals. The extract provided an anti-inflammatory condition in infected and treated animals, with a higher presence of plasma IL-10 and lower nitric oxide production by peritoneal macrophages. Furthermore, these animals had an accentuated Th2 response, with higher levels of IL-4. Thus, the baobab extract obtained by supercritical CO₂ extraction showed trypanocidal activity in vitro, but showed no action in vivo in which its anti-inflammatory action led to a worsening of the infection.

KEYWORDS: trypanosomiasis, embaúba, anti-parasitic activity.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Objetivo geral | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 Doenças tropicais negligenciadas | 19 |
| 3.2 Doença de Chagas..... | 20 |
| 3.3 Interação com sistema imune do hospedeiro | 23 |
| 3.4 Doença de Chagas experimental | 25 |
| 3.5 Tratamento da Doença de Chagas..... | 26 |
| 3.6 <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul | 27 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Extratos | 30 |
| 4.1.1 Material vegetal | 30 |
| 4.1.2 Extração por fluido supercrítico e identificação do composto..... | 30 |
| 4.2 Animais..... | 30 |
| 4.2.1 Manutenção da cepa Y de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| 4.3 Obtenção de macrófagos peritoneais..... | 31 |
| 4.4 Cultivo das células Vero | 34 |
| 4.5 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)..... | 32 |
| 4.6 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas epimastigotas | 33 |
| 4.7 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas | 34 |
| 4.8 Dosagem da produção de óxido nítrico (NO) | 32 |
| 4.9 Experimento <i>in vivo</i> | 35 |
| 4.9.1 Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratamento com extrato de embaúba | 35 |
| 4.9.2 Curva de parasitemia | 36 |

| | |
|--|----|
| 4.9.3 Contagem de leucócitos e eritrócitos..... | 36 |
| 4.9.4 Determinação de citocinas e avaliação da produção de óxido nítrico | 36 |
| 4.9.5 Análise histopatológica..... | 37 |
| 4.10 Análise Estatística | 38 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 5.1 Caracterização do extrato | 39 |
| 5.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)..... | 40 |
| 5.3 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas epimastigotas | 41 |
| 5.4 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas | 44 |
| 5.5 Experimento <i>in vivo</i> | 46 |
| 5.5.1 Atividade do extrato de <i>C. pachystachya</i> | 46 |
| 5.5.2 Determinação das citocinas e dosagem de óxido nítrico..... | 51 |
| 5.6 Análise Histológica | 56 |
| 6 CONCLUSÕES | 57 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| 8 ANEXOS | 66 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Extrato supercrítico de CO ₂ de embaúba: Benzonidazol. SI (índice de seletividade): CC ₅₀ / IC ₅₀ ou LC ₅₀ | 43 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo de vida dos do <i>T. cruzi</i> | 21 |
| Figura 2. Folhas de embaúba - <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul..... | 26 |
| Figura 3. Viabilidade celular de macrófagos tratados com extrato de embaúba..... | 38 |
| Figura 4. Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> no tempo de 24 horas..... | 39 |
| Figura 5. Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> no tempo de 48 horas..... | 40 |
| Figura 6. Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> no tempo de 72 horas..... | 41 |
| Figura 7. Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> no tempo de 96 horas..... | 42 |
| Figura 8. Atividade tripanocida do extrato de embaúba nas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> após 48 horas de tratamento..... | 43 |
| Figura 9. Curva de parasitemia de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 45 |
| Figura 10. Curva de parasitemia de camundongos BALB / c infectados com 1×10^3 formas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 45 |
| Figura 11. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB / c infectados com 1×10^3 formas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 46 |
| Figura 12. Relação entre peso atual e peso inicial no oitavo e décimo quarto dia de infecção de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 47 |
| Figura 13. Concentração de hemácias de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y) e tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e não-tratados (NT)..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y) e tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e de camundongos não tratados (NT)..... | 48 |
| Figura 15. Dosagem de NO após 48h de incubação produzidos por macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 49 |
| Figura 16. Atividade de arginase após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 49 |
| Figura 17. Dosagem de TNF- α após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 50 |
| Figura 18. Dosagem de IL-10 após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 51 |
| Figura 19. Dosagem de NO em 48 horas de células do baço de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 51 |
| Figura 20. Dosagem de IL-4 após 48h de incubação de células do baço de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y)..... | 52 |
| Figura 21. Dosagem de IFN- γ de células do baço de camundongos BALB / c infectados com <i>T. cruzi</i> | 53 |
| Figura 22. Dosagem de IL-10 de plasma de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (Y) e tratados ou não com extrato de embaúba..... | 53 |
| Figura 23. Dosagem de TNF- α no plasma de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e tratados ou não com extrato de embaúba..... | 54 |

Figura 24. Fotomicrografia de lâminas histológicas das lesões provocadas por *T. cruzi* nos corações dos camundongos BALB / c, corados com H&E, em aumento de 400x.....55

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças endêmicas e crônicas que afetam, principalmente, populações de países subdesenvolvidos que vivem em situações precárias, em situação de pobreza, sem saneamento adequado e em contato com vetores infecciosos.

Dentre as DTNs está a causada pelo protozoário do gênero *Trypanosoma*, responsável pela forma aguda e crônica da doença de Chagas. O *Trypanosoma cruzi* pertence à família *Trypanosomatidae* e é transmitido para os seres humanos através da picada do triatomíneo, da transfusão sanguínea, oralmente, de forma congênita e em acidentes laboratoriais causando a doença de Chagas. Esta acomete milhares de pessoas em toda a América, sendo uma das principais causas de morte entre as doenças causadas por parasitas.

Para o tratamento da doença de Chagas, possuímos limitada disponibilidade de medicamentos e utilizamos como tratamento o Benzonidazol, descoberto nos anos setenta, sendo o mais utilizado e o mais eficaz. Outro fator que dificulta é a adesão dos pacientes ao tratamento devido aos efeitos adversos.

Assim, considerando o quantitativo de pessoas que são afetadas pela doença e a escassez de opções de tratamento, a pesquisa por novas drogas antiparasitárias contra as diversas formas do agente torna-se importante. Ademais, tendo em vista a diversidade de espécies vegetais brasileiras e que estas são importantes fontes na busca por substâncias bioativas, entende-se a necessidade de busca por novos tratamentos na flora brasileira.

A espécie *Cecropia pachystachya* Trécul, conhecida como embaúba, está dentro das plantas com potencial medicinal, sendo encontrada nas regiões de Mata Atlântica e possui diversas atividades biológicas relacionadas a presença de compostos bioativos, os quais exercem vários efeitos. Há estudos relacionados com a planta e suas atividades contra os agentes das Leishmanioses, sendo que estes parasitas pertencem à mesma família (*Trypanosomatidae*) que o *Trypanosoma cruzi*. Nesse contexto, é pertinente a investigação da atividade tripanocida e citotóxica do extrato obtido a partir das folhas desta planta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo é avaliar a atividade tripanocida contra o parasita *Trypanosoma cruzi* a partir do extrato obtido por fluido supercrítico das folhas de embaúba.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito dos extratos sobre a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais murinos;
- Avaliar a ação do extrato contra as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi in vitro*;
- Avaliar a ação do extrato de embaúba aplicado via oral em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, comparando com animais não-tratados por meio da parasitemia e sobrevivência dos mesmos;
- Analisar os animais infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com o extrato com relação ao número de hemácias, leucócitos, produção de citocinas e óxido nítrico em comparação com os não-tratados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças tropicais negligenciadas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define as DTNs como um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas (WHO, 2019).

As DTNs são doenças tratáveis e evitáveis através de intervenções de saúde pública relativamente simples e estão concentradas em países mais pobres, afetando negativamente sobre a vida das populações mais vulneráveis (KUPER, 2019). São compostas por um grupo de doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas que afetam pessoas que vivem com menos de U\$ 2 dólares por dia, causando milhões de mortes e condições de invalidez anualmente, dentre elas está a doença de Chagas (VASCONCELOS et al., 2015).

As razões para o maior acometimento da população de países subdesenvolvidos é consequência de condições socioeconômicas, culturais e ambientais, estando diretamente ligada a vulnerabilidade social e a pobreza (ARRAIS et al., 2019).

Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas *pelo Trypanosoma cruzi* em todo mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública causando incapacidade e mais de 10 mil mortes por ano (WHO, 2019).

Essa incapacidade causa alto impacto na população acometida, que pode ser determinado pelo índice “Anos de Vida Ajustado por Incapacidade” (DALY). Esse indicador representa a soma dos anos de vida perdidos devido a morte prematura e anos de vida vividos com incapacidade, ou seja, anos de vida perdidos devido a incapacidade causada por uma doença (MOTA et al., 2014).

Há uma relação direta entre a elevada prevalência das DTNs com o baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Tendo em vista a mudança desse cenário, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil aderiu ao Plano Global para o Combate das Doenças Tropicais Negligenciadas, proposto pela OMS, a fim de reduzir a carga das doenças no Brasil (BRASIL, 2018). Para isso, recomenda-se cinco estratégias de saúde pública para a prevenção e o controle: medicação preventiva, intensificação da

gestão de casos, controle de vetores, provimento de água limpa e saneamento, higiene e saúde pública animal (OPAS, 2020).

Para além do Plano Global, outro aspecto de preocupação constante da OMS é o aumento das DTNs. Na 10ª reunião do Grupo Consultivo Estratégico e Técnico para Doenças Tropicais Negligenciadas, a OMS atualizou a lista existente, passando agora para 21 doenças em todo o mundo, sendo que cada país possui pelo menos uma delas de forma endêmica. Dentre essas doenças há as infecções causadas por vírus, bactérias, protozoários ou helmintos. Dentre as patologias causadas por protozoários está a Doença de Chagas (WHO, 2019).

3.2 Doença de Chagas

Cerca de 65 milhões de pessoas que vivem em 21 países endêmicos das Américas correm o risco de contrair a doença de Chagas, uma infecção parasitária que atinge 12 mil pessoas a cada ano (OPAS/WHO, 2019).

Descoberta em 1909 pelo cientista Carlos Chagas, a tripanossomíase americana, também chamada de doença de Chagas, caracteriza-se por uma doença crônica e negligenciada que acomete principalmente a região Norte e Nordeste do Brasil (BRASIL, 2017).

Destaca-se dentre as doenças crônicas por acometer 1,2 milhões de pessoas no Brasil e configura-se a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias na faixa etária acima dos 45 anos de idade (CAVALCANTI et al., 2019).

Por muitos anos a doença de Chagas se manteve como uma doença particularmente rural, mas devido aos fatores socioeconômicos, êxodo rural, urbanização e desmatamento levou a mudanças desse perfil epidemiológico, tornando-se uma enfermidade que acomete áreas urbanas especialmente as periferias, onde estão as pessoas de menor renda e marginalizadas pela sociedade (ARRAIS et al., 2019).

Através das campanhas de combate aos principais vetores, houve diminuição da prevalência dos triatomíneos que são popularmente conhecidos como barbeiros, dentre os quais as espécies de maior importância no Brasil são *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* (NIELEBOCK et al., 2017).

De acordo com Nielobock et al. (2017), a diversidade de espécies transmissoras e a grande variedade de hospedeiros vertebrados possibilitaram que a doença apresentasse multiplicidade de habitats, como tronco e copas das árvores, tocas de animais, buracos no solo, entre outros. Nas habitações humanas tem sido encontrado nos quartos junto às camas, escondidos em entulhos deixados nos cantos de paredes e, principalmente, nas rachaduras de paredes .

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e pode ser transmitida por aproximadamente 130 espécies de triatomíneos (hematófagos) da família *Reduviidae* (DINIZ et al., 2019). É transmitida por transfusões de sangue, de mãe para filho, durante a gestação ou parto e por alimentos. Estima-se que 28 mil novos casos ocorram por transmissão vetorial e outros 8 mil por transmissão congênita anualmente (OPAS/WHO, 2019).

A transmissão transfusional com sangue infectado, contaminação por transplantes de órgãos contaminados e transmissão cruzada são importantes meios de propagação da doença em países não endêmicos como Estados Unidos, Espanha, Japão e Austrália (FONSECA-BERZAL et al., 2018).

Em relação ao protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, esse pertence a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma*, apresenta ciclo biológico heteroxênico, passando por uma fase interna no caso do hospedeiro vertebrado e externo no vetor. O protozoário apresenta como formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota e inclui dois tipos de hospedeiros, um inseto hemíptero e hematófago e um mamífero (TAKAMIYA et al., 2019).

No tubo digestivo do triatomíneo se encontram as formas epimastigotas (forma replicativa) e as amastigotas são observadas no interior das células dos mamíferos. As formas tripomastigotas metacíclicas (forma infecciosa) são encontradas nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes no sangue de mamíferos (BRASIL, 2017).

Segundo Echeverria & Morillo (2019), quando a transmissão ocorre através dos triatomíneos, as tripomastigotas metacíclicas infectam humanos via excreção dos triatomíneos, que possuem o hábito de defecar enquanto se alimentam, com o parasita penetrando pela pele lesada, provocada por arranhões enquanto são mordidas ou através de membranas mucosas. Ao infectar o hospedeiro humano, invade o tecido local, fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e cardíacos onde a forma amastigota se multiplica dentro das células, invadindo células adjacentes com a forma tripomastigota e se

espalhando através do sistema linfático e corrente sanguínea. O inseto durante o repasto sanguíneo adquire as formas tripomastigotas, que no seu trato digestivo, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (forma multiplicativa) que se distingue na forma infecciosa no terço final do sistema digestório do triatomíneo, o que pode ser visualizado através da Figura 1.

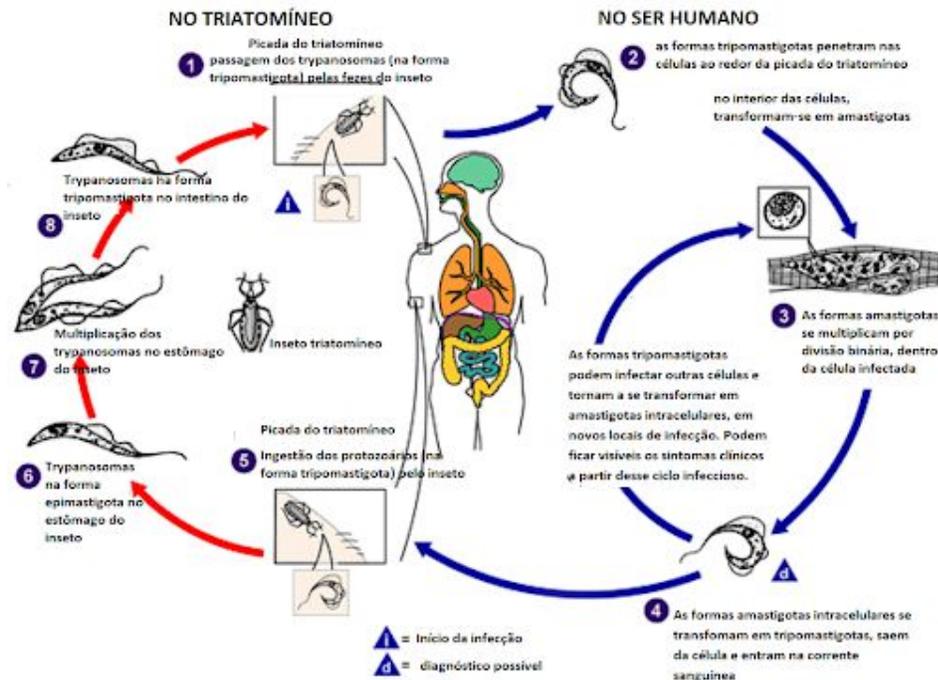


Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.

Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC 2019).

Outra forma de transmissão é a via oral, a qual no caso do homem ocorre por meio de alimentos contaminados com o parasita a partir de triatomíneos. As formas tripomastigotas metacíclicas são ingeridas através do consumo de frutas comercializadas *in natura* ou semi-industrializadas, o que reflete na questão de vigilância sanitária em relação a segurança alimentar e boas práticas de manipulação de alimentos (LOYANE; CARVALHO, 2018).

A transmissão oral geralmente se manifesta da forma aguda, estudos de Bermudez et al. (2016) mostram que as formas tripomastigotas metacíclicas invadem o epitélio mucoso gástrico, induzindo níveis mais altos de parasitemia, mortalidade, alterações no fígado e citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α). Esses estudos têm demonstrados também que o local de entrada do parasita afeta fortemente a resposta imune do hospedeiro e desfecho da doença. Clinicamente a doença de Chagas

apresenta duas formas: aguda e crônica, sendo bastante distintas entre si. A principal característica da fase aguda é a parasitemia microscopicamente detectável e no local da picada a lesão (chagoma) de inoculação. Os sintomas incluem febre variável, linfadenopatia, mal-estar, hepatoesplenomegalia, que geralmente são sinais e sintomas não observados em crianças. Em uma porcentagem pequena dos casos agudos, também observa-se edema unilateral nas pálpebras (sinal de Romaña). Porém, a maioria das infecções apresenta poucos sintomas ou os infectados são assintomáticos, 70% das infecções crônicas são assintomáticas, 20 a 30% apresentam manifestações irreversíveis, como cardiopatia chagásica, alterações no trato digestivo (megacólon e megaesôfago) e mudanças neurológicas que colocam em perigo a vida ou até mesmo levam a casos fatais (OPAS/WHO, 2019; TARLETON, 2016).

A cardiopatia chagásica crônica é importante causa de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) em indivíduos jovens economicamente ativos. No hemisfério ocidental esse valor chega em 7,5, valor tão elevado quanto o da malária. Isso gera um grande impacto social e econômico na saúde pública dos países endêmicos. No Brasil são registrados mais de 5 mil óbitos anuais relacionados a doença de Chagas, a maior parte devido a complicações cardíacas (NIELEBOCK et al., 2017; TEIXEIRA, 2015).

3.3 Interação com sistema imune do hospedeiro

A ação do sistema imune frente a infecção é um dos principais fatores que determinam as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. A imunidade inata tem um papel fundamental no controle da multiplicação do parasita na fase aguda e atua determinando a patogenia na fase crônica (PAVANELLI, 2008).

Na fase aguda da doença de Chagas há a presença de parasitas circulantes no sangue, podendo ser diagnosticada por métodos parasitológicos diretos, como exame de sangue a fresco, gota espessa ou esfregaço sanguíneo. Assim como a titulação de IgM anti - *T. cruzi*, quando encontrado no sangue periférico é considerado indicativo da fase aguda, principalmente associado as alterações clínicas e epidemiológicas (BRASIL, 2016; REIGOTA; OLIVEIRA, 2017).

No início da infecção, os parasitas podem estimular as células do hospedeiro a produzirem mediadores que desencadeiam respostas inflamatórias. Esses estímulos ocorrem via células dendríticas, que são derivadas da medula óssea e pertencem ao grupo de células apresentadoras de antígenos (APC), que quando imaturas, possuem uma gama de receptores inatos que permitem o reconhecimento de patógenos por meio de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dentre elas, proteínas denominadas de receptores tipo Toll (TLR) (GIL-JARAMILLO et al., 2016).

Quando as células APCs (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são ativadas, primariamente ocorre a produção de moléculas efetoras mediadas por linfócitos T CD4⁺ podendo se diferenciar em Th1 e Th2. Citocinas do padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α) agem em conjunto induzindo a ativação de macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas na resposta local e sistêmica, atuam na eliminação do parasita. As citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) bloqueiam as citocinas do padrão Th1, permitindo a sobrevivência do *T. cruzi* (PAVANELLI, 2008).

Os macrófagos, ativados via citocinas originadas das células Th1, levam a morte dos parasitas ao induzir o aumento das ROS e NO, atuando na destruição parasitária intracelular. Em contrapartida, os parasitas atuam geralmente reduzindo essa resposta, alterando a atividade da enzima NADPH oxidase, que regula a produção de ROS a fim de favorecer o parasitismo (GONZALEZ; CUÉLLAR; J. PUERTA, 2018).

A invasão dos macrófagos pelos parasitas leva à secreção de IL-12, que ativa as células NK a produzirem IFN- γ . A produção dessa citocina na fase aguda da infecção por *T. cruzi* está associada a resistência do parasitismo e a depleção de IFN- γ agrava a parasitemia, resultando no aumento da mortalidade em camundongos infectados. Assim, a resposta Th1 e ausência da resposta Th2 fornece controle ideal contra infecção por *T. cruzi* (KUMAR; TARLETON, 2015; SANTILIANO; ALMEIDA, 2012; SOARES et al., 2012).

Com o passar do tempo, a parasitemia diminui e os antígenos persistem, gerando infiltrado inflamatório difuso e miocardite. Durante a fase crônica ainda há resposta imune Th1 exagerada, com liberação de IFN- γ e TNF- α . O IFN- γ além de controlar os parasitas contribui com a patogênese cardíaca, pois lesiona o miocárdio através de mecanismos celulares que geram a disfunção miocárdica e ocorre a

diminuição de IL-10 e supressão de citocinas relacionadas a resposta Th2, como a IL-4 (SANTOS; MENEZES FALCÃO, 2020; IMPROTA-CARIA; ARAS, 2021).

Em pacientes com infecção crônica há aumento das metaloproteínas 2 (MMP2) e 9 (MMP9) em neutrófilos e monócitos comparados com indivíduos não infectados. Essas enzimas participam do remodelamento tissular, podendo também estar associadas ao dano cardíaco. Em crianças na fase inicial assintomática o número de células NK e monócitos inflamatórios é aumentado (GONZALEZ; CUÉLLAR; J. PUERTA, 2018).

Essas respostas são importantes para o controle tecidual e da parasitemia, mas não são capazes de eliminar a infecção parasitária, sendo que o sucesso da infecção reside principalmente em sua capacidade de resistir ao ataque oxidativo das células imunológicas do hospedeiro, levando a doença crônica (GIRARD et al., 2018).

3.4 Doença de Chagas experimental

O modelo animal ainda é bastante utilizado quando se trata de experimentos *in vivo*, porém, dependendo das cepas utilizadas, do peso do animal, sexo e idade, resultados inteiramente diferentes podem ser observados (KONAR, 2015).

Assim como em 1978, onde foi demonstrado que camundongos da linhagem BALB / c e C57BL / 6, infectados com o mesmo inóculo (1×10^4) de tripomastigotas, obtiveram resultados de mortalidade e parasitemia diferentes, ou seja, a combinação de camundongos e as cepas dos parasitas produziram resultados variados (JELICKS; TANOWITZ, 2011).

As cepas Y do *T. cruzi* possuem alto parasitismo pelas células do baço e fígado, em contrapartida, possui baixo parasitismo por células do músculo cardíaco. Enquanto a cepa CL age de maneira oposta. Essa diferença pode estar relacionada com a variação de receptores de superfície celular (CAMPBELL; WESTENBERGER; STURM, 2004).

As cepas Y são inoculadas em camundongos BALB / c, na sua maioria apresentam pico de parasitemia entre o 7º e o 8º dia após a infecção. Variações podem ser encontradas dependendo da dose inoculada, mas a letalidade dessa cepa é sempre alta (BARBOSA et al., 2019).

Segundo estudos de Tatakihara et al. (2008), os camundongos da linhagem BALB / c infectados com cepa Y do *T. cruzi* foram mais suscetíveis do que a linhagem C57BL / 6, alcançando nível mais elevado de parasitemia e mortalidade.

3.5 Tratamento da Doença de Chagas

Ainda há uma lacuna significativa nas pesquisas dedicadas às DTNs. Entre 2012 e 2018 apenas 6, de 256 novos produtos farmacêuticos, visavam essas doenças, ou eram drogas reaproveitadas, ou novas formulações ou novos produtos biológicos (BATISTA et al., 2019).

Em relação ao tratamento da doença de Chagas, os únicos medicamentos aprovados foram lançados no início de 1970, Benzonidazol (BZN) e Nifurtimox® (NFX). Ambos os compostos possuem melhor tolerância quando administrados em crianças, maior efetividade durante a fase aguda, porém, maior toxicidade em adultos. Os tratamentos prolongados, os efeitos colaterais, a resistência dos parasitas e não adesão dos pacientes dificultam o tratamento da doença de Chagas (BERMUDEZ et al., 2016).

O BZN é o medicamento de primeira escolha, atuando na síntese proteica e por isso prejudicam a formação do parasita (DINIZ et al., 2019). O tratamento melhora os resultados clínicos em adultos cronicamente infectados e previne novas futuras infecções, no entanto, deve ser iniciado antes das complicações cardíacas, já que após se torna menos eficaz (BATISTA et al., 2019). É recomendado independentemente de como a doença foi adquirida, não sendo indicado para gestantes, lactentes, etilistas e pacientes com históricos de insuficiência hepática (TAKAMIYA et al., 2019).

O BZN apresenta eficácia na fase aguda e na fase crônica da doença, sendo que cerca de 80% dos pacientes não apresentam sinal do parasita no sangue após 12 meses do término do tratamento, que dura 60 dias. Apesar dos benefícios, o tratamento possui alguns efeitos colaterais como: intolerância gástrica, erupções cutâneas ou problemas neuromusculares, entre outros (DNDi, 2019).

A apresentação farmacêutica para adultos consiste em comprimidos de 100 mg, sendo a posologia utilizada, doses de 5 mg/Kg/dia por via oral durante 60 dias em duas ou três tomadas diárias. Entretanto, forma farmacêutica dificulta a adesão ao

tratamento para crianças até 2 anos de idade, após o surgimento da apresentação pediátrica comprimidos de 12,5 mg dispersíveis, houve aumento da adesão dos pacientes, visto que a maioria nasce com a infecção, com o tratamento adequado, há 90% de chance do parasita ser eliminado se tratados no primeiro ano de vida. A administração para essa faixa etária é de até três comprimidos, dependendo do peso da criança, onde a dose recomenda é de 5 - 10 mg/Kg/peso/dia (DNDi, 2019; BRASIL, 2016).

No Brasil, o uso do NFX não está mais disponível. Sua comercialização está suspensa devido ao surgimento de cepas resistentes ao medicamento nas regiões endêmicas do país e por sua alta toxicidade sobre o sistema nervoso central, genotoxicidade e eficácia reduzida (GIL-JARAMILLO et al., 2016).

O DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) realizou ensaios e estudos, concluindo que doses mais baixas de BZN, em combinação com o Fosravuconazol, mostraram-se eficazes na eliminação do *T. cruzi* (DNDi, 2019).

Considerando a necessidade de novas terapias para o tratamento da doença de Chagas, estudos com extratos de plantas, que possam possuir uma ação contra o parasita da doença de Chagas se tornam tão relevantes.

3.6 *Cecropia pachystachya* Trécul

O gênero *Cecropia* pertencente à família Urticaceae e compreende aproximadamente 100 espécies. *Cecropia pachystachya* Trécul popularmente conhecida como embaúva, embaúba, imbaúba, umbaúba, árvore da preguiça ou toré. É uma árvore arbórea e frutífera com finalidade ornamental e medicinal, utilizada na medicina populacional. Possui crescimento rápido, tem maior ocorrência na região Sul e Sudeste do país, em especial na zona da Mata Atlântica (Figura 02) (PACHECO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).



Figura 2- Folhas de embaúba - *Cecropia pachystachya* Trécul.

Fonte: Emilio Ruiz, Compêndio Online Gerson Luiz Lopes. Laboratório de Manejo Florestal.

Na medicina popular a embaúba é utilizada como diurético, tônico, anti-hemorrágico, adstringente, antiasmático, antitussígeno, para episódios de taquicardia, bronquite, hipertensão arterial, tuberculose, feridas, febre, entre outras finalidades (DA SILVA et al., 2010).

Essa espécie tem sido objeto de vários estudos fitoquímicos, com foco em preparações foliares. Os extratos possuem compostos fenólicos, que inclui flavonoides C-glicosilados, vitexina (DA SILVA MATHIAS; RODRIGUES DE OLIVEIRA, 2019), ácido clorogênico, isorientina, orientina, catequina, epicatequina, procianidina, isoquercitrina, isovitexina, β -sitosterol, α -amirina e ácidos ursólicos, pomólicos e oleanólico (PACHECO et al., 2014). Esses constituintes estão relacionados as propriedades biológicas, como anti-inflamatórias, atividade leishmanicida e hipoglicemiantes, entre outras (UCHÔA et al., 2010).

Estudos mostram que os flavonoides C-glicosilados têm associação a efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, efeitos que podem ser observados através das diferentes concentrações de isovitexina nos extratos (STRADA et al., 2017). A isovitexina é um isômero da vitexina e ambos exercem efeitos similares, devido as suas estruturas químicas semelhantes (HE et al., 2016).

O composto isorientina apresentou ação anti-inflamatória através da inibição da IL-6 e pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de camundongos (WEDLER et al., 2014). Ainda, o estudo de Maquiaveli et al. (2014) mostrou que o tratamento com *Cecropia pachystachya* promoveu a redução da hipertensão melhorando a função renal em animais que foram associados a redução da inflamação induzida por angiotensina II e aumento na produção de NO.

Os extratos de embaúba parecem afetar os mecanismos de produção dos mediadores inflamatórios, possuindo altos níveis de polifenóis que são antioxidantes, atuando na eliminação de radicais livres e inibindo enzimas da cascata pró-inflamatória (DAGA; AYALA; MENOLLI, 2020).

Tasdemir e outros (2006) mostraram que os compostos catequina e epicatequina, presentes nos extratos da embaúba, apresentaram-se microbicidas contra as formas amastigotas de *Leishmania donovani*. Assim como a ornitina também apresentou essa ação (CRUZ et al., 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato

4.1.1 Material vegetal

As folhas da embaúba foram coletadas em pontos aleatórios da árvore localizada na cidade de Quatro Pontes, Paraná (S 24°35'40,56" e O 53°57'46,60"). A planta foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (no. 3000). Os experimentos foram conduzidos com pressão e temperatura controlados, através do espectrômetro de massa GC-MS QP2010 SE (Shimadzu).

4.1.2 Extração por fluido supercrítico e identificação do composto

As folhas colhidas foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C por 72 horas. Após secas, foram moídas em triturador de facas. Esse processo foi realizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação, no Departamento de Engenharia Química, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus Toledo* e cedido para a realização deste trabalho.

O extrato foi primeiramente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos ensaios. Foi preparada uma solução-mãe na concentração de 40 mg/mL do extrato testado. A partir da solução-mãe foram feitas diluições em meio de cultura (RPMI ou LIT) para obter as concentrações de 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 175, 200 e 300 µg/mL.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos BALB / c, fêmeas, com aproximadamente 2 meses de idade, mantidos no biotério, em caixas plásticas, a temperatura de aproximadamente 23 ± 2 °C e ciclo claro / escuro de 12 horas, com acesso livre à água e ração comercial. Todos os procedimentos deste trabalho seguiram as

Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, sendo devidamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Unioeste sob o número 21-11, 29/19 e 02-21 (ANEXO I).

4.2.1 Manutenção da cepa Y de *T. cruzi*

Os parasitas foram obtidos através de repiques, em animais mantidos no biotério, de acordo com o Item 4.2. As formas tripomastigotas foram coletadas por punção cardíaca após anestesia do animal com xilazina (30 mg/Kg) e quetamina (270 mg/Kg). As formas móveis do parasita foram contadas (5×10^2 ou 1×10^3) e injetadas via intraperitoneal em camundongos BALB / c, previamente anestesiados. Esse processo foi repetido a cada 9 ou 11 dias. Dependendo da necessidade experimental, uma alíquota de sangue contendo os parasitas foi coletada para realização dos devidos experimentos.

4.3 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos através de camundongos BALB / c previamente eutanasiados com excesso de anestésico. Realizou-se a assepsia da região abdominal com Iodopovidona (PVPI), álcool 70% e, então, a camada serosa do peritônio foi exposta, seguida de infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C. Em seguida, realizou-se a massagem na região peritoneal para obtenção dos macrófagos. O PBS foi retirado com a própria agulha e seringa de inoculação, a suspensão resultante transferida para um tubo estéril cônico e centrifugado a 1500 rotações por minuto (rpm) por 06 minutos, a 4 °C.

As células obtidas após centrifugação foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. O número de células foi determinado pela contagem em Câmara de Neubauer e ajustadas na concentração de 2×10^5 células por poço. Posteriormente, estas células foram então plaqueadas, em placas de 96 e incubadas por 2 horas a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO₂) para aderência. As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C e, em seguida, foi

adicionado 200 μL de meio de cultura e incubado novamente por 12 horas. Após, foi retirado o sobrenadante e lavado os poços com PBS a 37 °C e tratado com meio de cultura contendo o extrato da embaúba nas concentrações estabelecidas. O tempo de incubação das células com o extrato foi de acordo com cada experimento.

4.4 Dosagem da produção de óxido nítrico (NO)

Para a dosagem da produção de NO foi realizado de acordo com o Item 4.3, após 48 horas de incubação, em seguida 100 μL do sobrenadante foram utilizados para reagir com 100 μL do reagente de Griess (solução 1:1 de naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)) e aguardaram-se 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo), sendo então realizada a leitura em leitor de microplaca (BIOTEK modelo EPOCH) a 550 nm.

Para a produção de NO, utilizou-se como controle positivo lipopolissacarídeo (LPS) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e DMSO (0,6%) como controle branco. O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) e os dados foram expressos em micro molar (μM), através de curva-padrão, obtida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) em meio RPMI, variando de 5 a 100 μM .

4.5 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Os macrófagos peritoneais coletados de acordo com o item 4.3 foram plaqueados a 2×10^5 células por poço, em placas de 96 poços, deixando-se aderir a 37° C, sob 5% de CO_2 , por 2 horas. Após o tempo de aderência dos macrófagos, o meio de cultura RPMI foi retirado e a placa lavada com PBS estéril a 37 °C, então adicionado em cada poço as diferentes concentrações do extrato, somente meio de cultura RPMI como controle negativo, RPMI + DMSO (0,6%), como controle branco e lipopolissacarídeo (LPS) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como controle positivo.

As células ficaram em tratamento a 37° C, sob 5% de CO_2 , por 48 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e separado para a realização de dosagem de

óxido nítrico (Item 4.7 metodologia descrita abaixo), e os poços foram lavados novamente com PBS estéril 37° C e em seguida, adicionados 200 µL de HBSS (solução balanceada de Hank) com MTT (brometo de (3-metil-[4-5-48 dimetiliazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) a 5 mg/mL, e incubados a 37° C, sob 5% de CO₂, por 3 horas. Após isso, o sobrenadante foi removido e o cristal de Formazan formado foi dissolvido em DMSO (150 µL por poço).

Após 10 minutos para a total solubilização dos cristais de Formazan, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (BIOTEK modelo EPOCH), a 550 nm. Os dados foram expressos em porcentagem e possibilitaram determinar a concentração citotóxica do extrato, necessária para causar a morte de 50% das células viáveis (CC₅₀). O CC₅₀ foi calculado através do programa GraphPad Prism 8.0, utilizando-se modelo logarítmico de regressão não-linear.

4.6 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em meio LIT (*liver infusion triptose*) através de repiques semanais. Ademais, foram submetidas na quantidade de 1 x 10⁵ parasitas/poço a diferentes concentrações do extrato (5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 175, 200 e 300 µg/mL) durante 96 horas, sendo realizada a contagem dos parasitas a cada 24h, em câmara de Neubauer. Somente o meio LIT, sem extrato, foi utilizado como controle, assim como o meio mais DMSO (0,6%), para verificar sua interferência. Avaliou-se o efeito do extrato, por meio do percentual de inibição do crescimento dos protozoários, comparando-se ao crescimento do parasita frente as concentrações de extrato. O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi o BZN (50 µg/mL).

As diferentes porcentagens de inibição, obtidas das concentrações, possibilitaram determinar a concentração inibitória do extrato necessária para causar a inibição do crescimento de 50% dos parasitas (CI₅₀). O CI₅₀ foi calculado através do programa GraphPad Prism 8.0, utilizando-se modelo logarítmico de regressão não-linear. Com os valores de CC₅₀ e CI₅₀ foi possível determinar o índice de seletividade (IS) do extrato sobre a forma epimastigota do *T. cruzi*, utilizando a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC50}{CI50}$$

4.7 Cultivo das células Vero

Células Vero foram mantidas a -80°C , em solução de congelamento, contendo 10% de DMSO e 90% de SFB. Para os ensaios, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C e foram transferidas para frasco de 25 cm^2 contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Em seguida, as células foram armazenadas em estufa e incubadas à temperatura de 37°C , contendo 5% de CO_2 , as mesmas foram avaliadas diariamente através do auxílio de microscópio invertido, modelo Nikon – Eclipse TS100 e o meio RPMI foi trocado rotineiramente a cada 2 dias.

Após atingir confluência superior a 80%, as células foram removidas do frasco utilizando tripsina-EDTA 0,25%, transferidas para um tubo estéril cônico e centrifugadas a 1500 rpm por 05 minutos, em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio RPMI a 10% de SFB para realização de subcultivos.

4.8 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidas por meio de repiques semanais e os parasitas foram coletados por punção cardíaca, para a realização dos ensaios de atividade tripanocida, conforme descrito no Item 4.2.1. Após a coleta, o sangue contendo os parasitas foram repassados para as garrafas contendo as células Vero e incubados a temperatura de 37°C , contendo 5% de CO_2 . As células foram infectadas pelas formas tripomastigotas e acompanhadas diariamente. A troca do meio de cultura RPMI se dava a cada dois dias. Ele era retirado da garrafa com auxílio de uma pipeta estéril, passado para um tubo Falcon e centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante era descartado e o pellet contendo algumas células que rotineiramente se desprenderam da garrafa, sendo que os parasitas eram

contados em câmara de Neubauer e devolvidos à garrafa e novo meio RPMI acrescentado.

Após os parasitas infectarem as células Vero ocorre o processo de multiplicação, a visualização das formas amastigotas, que posteriormente rompem as células e passam a infectar novas células Vero. Nesse processo há aumento do número de formas tripomastigotas.

Para a realização do experimento, utilizou-se concentração de 1×10^5 parasitas por mL, que foram incubados em placa de 24 poços contendo as diferentes concentrações do extrato (5 - 300 $\mu\text{g/mL}$) em RPMI. Após 24 e 48 horas de incubação, os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer, empregando-se microscópio óptico com aumento de 400 vezes. O efeito do extrato foi avaliado por meio do percentual de inibição da viabilidade dos parasitas obtido ao comparar o número de tripomastigotas sob ação do extrato versus, o número no meio puro. O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi o BZN (50 $\mu\text{g/mL}$).

As diferentes porcentagens de inibição, obtidas das concentrações, possibilitaram determinar a concentração letal do extrato necessária para causar a morte de 50% dos parasitas (CL_{50}). O CL_{50} foi calculado através do programa GraphPad Prism 8.0, utilizando modelo logarítmico de regressão não-linear. Com os valores de CC_{50} e CL_{50} foi possível determinar o índice de seletividade (IS) dos extratos sobre a forma tripomastigota do *T. cruzi*, por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CL}_{50}}$$

4.9 Experimento *in vivo*

4.9.1 Infecção com *Trypanosoma cruzi* e tratamento com extrato de embaúba

Os animais mantidos no biotério, de acordo com o item 4.2, foram separados em dois grupos de seis animais, sendo ambos infectados com formas tripomastigotas, obtidas conforme item 4.2.1. Os animais do Grupo 01 foram tratados por gavagem oral com extrato de embaúba (100 mg/Kg/dia), durante 10 dias, iniciando-se 4 dias após a infecção, já os animais do Grupo 02 receberam RPMI contendo DMSO com

concentração igual ao usado no extrato (0,6%). Este experimento foi realizado duas vezes, com 5 replicatas em cada uma delas, sendo que na primeira os camundongos receberam 1×10^3 parasitas e no segundo experimento 5×10^2 parasitas. Os animais infectados com a maior concentração foram observados até o vigésimo dia de infecção, para se verificar a curva de sobrevivência dos mesmos sob uma dose letal. Já os animais infectados com a menor concentração foram sacrificados com excesso de anestésicos, no 14º de infecção. A dose de extrato de embaúba escolhida para esses experimentos foi baseada em dados da literatura.

Grupo 01: Animais tratados com extrato (T); Grupo 02: Animais tratados com RPMI (Controle - NT).

4.9.2 Curva de parasitemia

A parasitemia foi avaliada utilizando a técnica de Brener e colaboradores (1963), realizada através de 5 µL de sangue, obtidos da cauda do animal e analisado 50 campos entre lâmina e lamínula (22 mm x 22 mm) a cada dois dias, do quarto ao último dia de infecção. A curva foi determinada utilizando a média da contagem de parasitas dos animais inoculados nos dois grupos.

4.9.3 Contagem de leucócitos e eritrócitos

Os leucócitos e eritrócitos dos camundongos foram coletados sob anestesia por um pequeno corte na extremidade da cauda. O sangue periférico foi diluído com PBS e líquido de Turk, para contagem de leucócitos 1/10 e para contagem de eritrócitos 1/100 em câmara de Neubauer. As análises foram realizadas no 1º, 4º, 8º e 14º dias pós-infecção.

4.9.4 Determinação de citocinas e avaliação da produção de óxido nítrico

Para essa análise os macrófagos peritoneais, células do baço e sangue foram obtidos de animais eutanasiados no 14º dia.

O sangue foi coletado em seringa heparinizada por punção cardíaca do animal anestesiado e o plasma foi obtido por centrifugação do sangue a 3000 rpm por 10 minutos. Após esse procedimento, uma nova dose de anestésico foi aplicada para fim de eutanásia dos camundongos. Os níveis de IL-10 e TNF- α no plasma foram medidos por kits comerciais de ELISA (Peprotech® Inc.) seguindo as instruções do fabricante.

Os macrófagos peritoneais foram coletados de acordo com o item 4.3 e a dosagem de NO foi realizada de acordo com o item 4.4. Os níveis de IL-10 e TNF- α nos sobrenadantes foram quantificados como descrito anteriormente.

Os baços foram removidos dos animais e dissociados suavemente em meio RPMI 10% de SFB, usando triturador de tecido. Os glóbulos vermelhos do baço foram lisados por choque hipotônico (PBS / água 1:10, v/v) e o número de esplenócitos viáveis foi determinado em hemocitômetro após adição de azul de tripan 0,2% em PBS. As células viáveis foram plaqueadas, 1×10^6 células por poço, em microplacas de 24 poços e incubadas a 37° C sob 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após 48 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO foi medida como indicado anteriormente. Os níveis de IL-4 e IFN- γ nos sobrenadantes foram medidos por kits comerciais de ELISA (Peprotech® Inc.) seguindo as instruções do fabricante.

4.9.5 Análise histopatológica

Animais de ambos os experimentos tiveram os corações retirados para os achados histológicos, sendo os mesmos fixados com solução de formaldeído 10% em água destilada durante 24 horas. Posteriormente, o material ficou em água corrente durante 48 horas e então foi estocado em álcool 70% até a inclusão em parafina.

O material foi processado em cortes histológicos seriados de 5 micrômetros. A lâmina com o material cortado, ainda em parafina, foi fixada em estufa a 80 °C durante 24 horas. Após isso, a lâmina foi desparafinada, hidratada e corada pela técnica de coloração Hematoxilina – Eosina (ANEXO II).

A técnica histológica utilizada seguiu o protocolo do laboratório de Histologia da Unioeste.

4.10 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a estatística analítica para comparação das médias, através do teste de ANOVA foi utilizado pós-teste de Tukey. Para tanto, adotou-se o nível de confiança de 95%, adotando-se como significativo um $p < 0,05$. Utilizou-se o programa GraphPad Prism®, versão 8.0 e Microsoft Excel, ambos para plataforma Windows 10 da Microsoft.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do extrato

A extração foi realizada em escala laboratorial por extração supercrítica com dióxido de carbono puro (CO₂) e n-hexano como solvente, obtendo rendimento de 1,48%. O Material foi seco em forno a 40° C, por 3 dias, e posteriormente moído. O tamanho médio das partículas (720 µm) das folhas foram determinadas utilizando um analisador de partículas *Master Sizer* (Malvern Instrument LTDA). O teor de umidade das folhas (2,94 ± 0,03% em peso) foi obtido utilizando o método gravimétrico para a amostra a 105° C até a estabilização da massa.

As folhas de embaúba são conhecidas devido a sua alta composição de flavonoides. No extrato de Hoscheid et al. (2020) foram identificados vários compostos como esqualeno, ácido ursólico, ácido pomólico, β-sitosterol, vitamina E, α-amirina, catequina, isovitexina e isoorientina. Sendo 30,35% de ácido ursólico, 15,76% de esqualeno, 12,76% de ácido pomólico, 5,84% de vitamina E, 4,49% de catequina, 2,16% de α-amirina, 0,29% de isovitexina e 0,25% de isoorientina.

Segundo estudo de Machado e colaboradores (2021), os principais compostos encontrados nas folhas de *C. pachystachya* foram flavonas c-glicosiladas, ácidos orgânicos, flavonas o-glicosiladas, catequinas, isoorientinas e orientinas.

Os metabólitos encontrados no extrato das folhas de *C. pachystachya* são principalmente triterpenos, que são compatíveis com a característica não polar supercrítica de CO₂. Da mesma forma, os compostos β-sitosterol, ácidos ursólico e pomólico e α-amirina foram encontrados em extratos obtidos com solventes apolares. Porém, a maioria dos estudos efetuou as extrações utilizando solventes polares, encontrando metabólitos como flavonoides, ácido clorogênico, orientina, vitexina, isoorientina, entre outros. Isso explica as baixas concentrações desses metabólitos no extrato de embaúba (RIBEIRO et al., 2014; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2019b).

Apesar de não ter sido encontrada na literatura a avaliação utilizando embaúba contra *T. cruzi*, os principais compostos presentes no extrato já foram testados *in vitro* contra parasitas da família Trypanosomatidae, como espécies de *T. cruzi* ou *Leishmania*.

O extrato de embaúba através da presença de flavonoides, catequinas, pro-antocianidinas, terpenóides e compostos esteróides tem sido associado a atividade

anti-inflamatórias como demonstrado por Rivera-Mondragón et al. (2019). Extratos apolares das folhas de *C. pachystachya*, como hexano e diclorometano, dois desses constituintes β -sistosterol e o ácido pomólico, reduziram a resposta anti-inflamatória em camundongos induzidos por carragenina (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2019).

5.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Para determinação da viabilidade celular, realizaram-se três experimentos independentes em triplicata, conforme item 4.7.

A reação de MTT foi usada para determinar a viabilidade de macrófagos tratados com o extrato de embaúba. A Figura 3 mostra que o extrato não promoveu alteração na viabilidade celular, pois a atividade mitocondrial das células tratadas com a concentração mais alta do extrato (300 $\mu\text{g/mL}$) foi comparável a obtida pelo controle negativo (apenas meio RPMI), ou seja, os extratos não foram tóxicos para os macrófagos. Considerando que não foi possível obter valor exato de CC_{50} , o índice foi considerado > 400 (maior que 400 $\mu\text{g/mL}$), uma vez que as alterações sofridas pelas células foram baixas em 300 $\mu\text{g/mL}$.

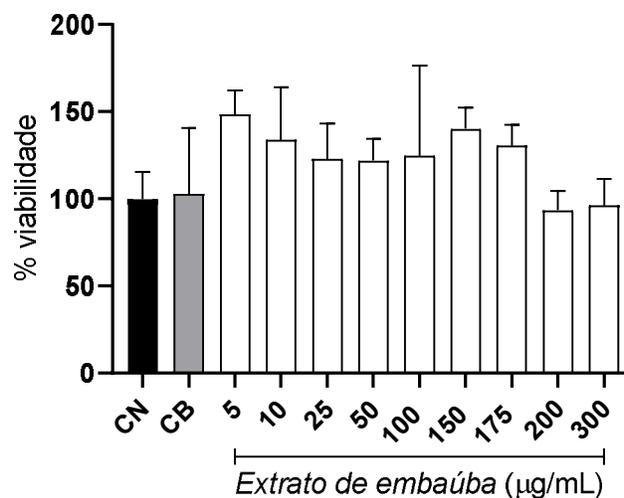


Figura 3 - Viabilidade celular de macrófagos tratados com extrato de embaúba. CN: Controle Negativo (meio RPMI); CB: Controle Branco (meio RPMI + DMSO 0,6%).

Conforme observado por Mesquita et al. (2018), extratos das folhas de embaúba obtidos a base de etanol apresentam menor custo e baixa toxicidade. O que corrobora com os resultados do experimento com os macrófagos. Resultados obtidos do potencial citotóxico de extratos da embaúba induzem uma baixa toxicidade frente a linhagens tumorais (ANDRADE et al., 2021).

Os flavonoides presentes no extrato da planta apresentam diversas atividades biológicas, agem como antioxidantes na ativação dos radicais livres e possuem ação sobre a inflamação e também no sistema imunológico, podendo ser associado à sua solubilidade e aos grupos fenólicos que apresentam afinidade com as proteínas (COSTA; HOSCHEID, 2018).

5.3 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas epimastigotas

Os resultados obtidos através do extrato da embaúba sobre as formas epimastigotas do *T. cruzi*, analisadas até o tempo de 96 horas, apontam que houve uma redução crescente na quantidade de parasitas até o tempo de 72 horas.

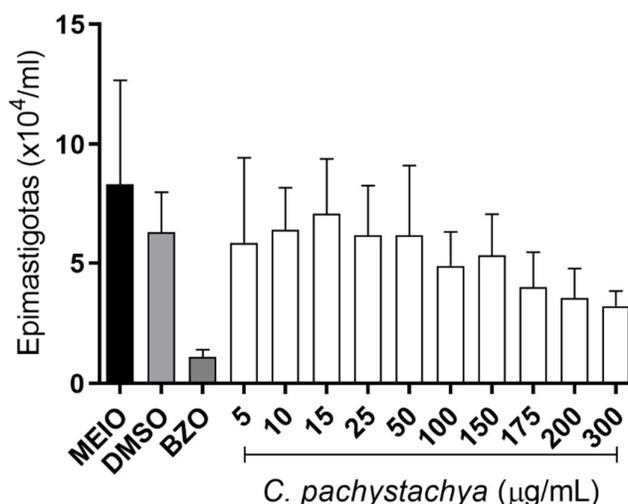


Figura 4 - Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* no tempo de 24 horas. Meio: Controle negativo (Meio de cultura LIT). DMSO: Controle Branco (DMSO 0,6% + LIT). BZO: Controle Positivo (Benzonidazol).

Na Figura 4 pode ser observado que o número de epimastigotas no tempo de 24 horas não diferenciou no meio e no DMSO, mostrando que o diluente do extrato não interferiu no experimento.

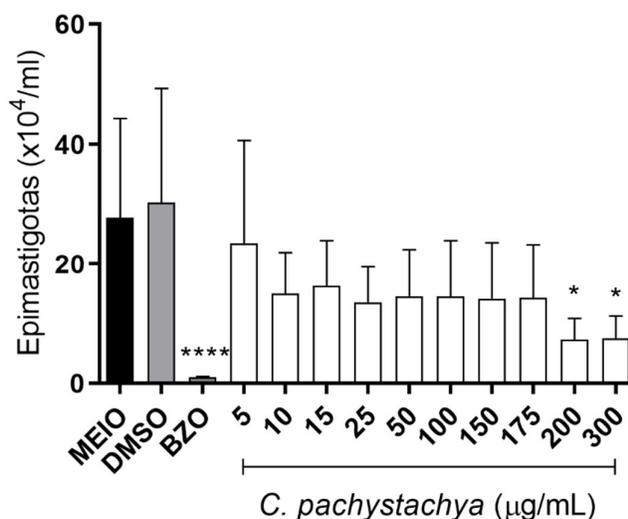


Figura 5 - Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* no tempo de 48 horas. * significativamente diferentes do controle (Meio) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ respectivamente. Meio: Controle negativo (LIT). DMSO: Controle Branco (DMSO 0,6% + LIT). BZO: Controle Positivo (Benzonidazol).

Na Figura 5, podemos observar que o extrato inibiu efetivamente o crescimento dos parasitas em 48 horas. É possível verificar que houve diferença significativa entre as maiores concentrações do extrato (200 e 300 µg/mL) e do parasitas tratados com BZN, quando comparado com o meio ($p < 0,05$). Isso mostra que houve uma diminuição de 63,8% das epimastigotas, na concentração de 200 µg/mL, e de 62,8%, na concentração de 300 µg/mL.

Com 72 horas de tratamento, observou-se que o crescimento dos parasitas foi inibido também, sendo resultante da ação dos extratos, tendo em vista que o DMSO não estava influenciando nesse evento, como pode ser visualizado na Figura 6. Nas concentrações de 200 e 300 µg/mL o extrato foi capaz de inibir significativamente o crescimento das epimastigotas, com diferença para o controle negativo.

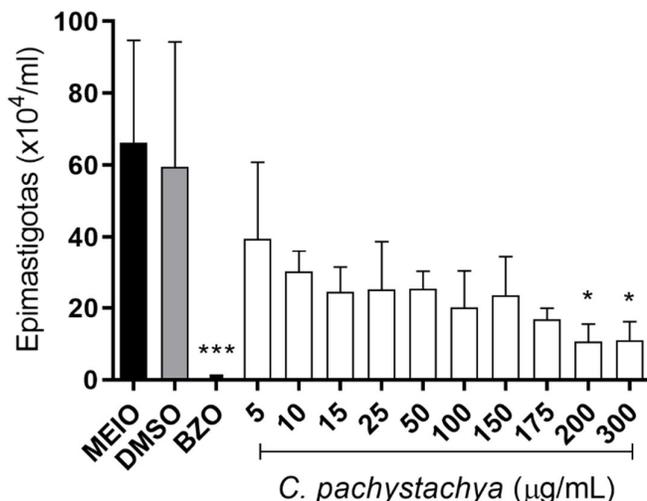


Figura 6 - Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* no tempo de 72 horas. * significativamente diferente do meio. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ respectivamente. Meio: Controle negativo (LIT). DMSO: Controle Branco (DMSO 0,6% + LIT). BZO: Controle Positivo (Benzonidazol).

Faria e colaboradores (2017) testaram uma mistura contendo ácido ursólico, quercetina e miricetina contra formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e obtiveram inibição próxima a 80%, após 72 horas na concentração de 10 µg/ml, enquanto o extrato de embaúba atingiu inibição semelhante (75%) na maior concentração testada (300 µg/ml). No entanto, o outro metabólito encontrado no extrato de embaúba, o β -sitosterol, não exerceu atividade antiprotozoária, conforme relatado anteriormente na literatura (EZZAT et al., 2017).

Extrações diferentes levam a composições diferentes, e isso afeta diretamente o grau de atividade. Ribeiro e colaboradores (2014) não relataram atividade de extratos etanólicos ou hexânicos contra *L. amazonensis*, e, embora não tenham apresentado seus compostos, os resultados foram muito diferentes dos obtidos por Cruz et al. (2013) que caracterizaram o flavonoide orientina como grande responsável pela inibição apresentada por uma fração de um extrato etanólico.

Um extrato com ácido pomólico e β -sitosterol apresentou ação contra *Plasmodium falciparum* e promastigotas de *L. donovani* com alto índice de seletividade. Porém, quando os compostos presentes no extrato foram testados isolados, a atividade foi atribuída às naftoquinonas, uma vez que o ácido pomólico não demonstrou atividade isolada (TANTANGMO et al., 2010). Portanto, a ação tripanocida do extrato de embaúba provavelmente se deve ao ácido ursólico, pois está em maior quantidade no extrato, uma vez que os outros compostos não atuaram dessa forma na literatura.

Observou-se ainda, que a inibição máxima alcançada pelo extrato foi de 81,7%, após 96 horas na concentração de 300 µg/mL, e a CI_{50} , após 96 horas de incubação foi de $17,9 \pm 1,2$ µg/mL (Tabela 1).

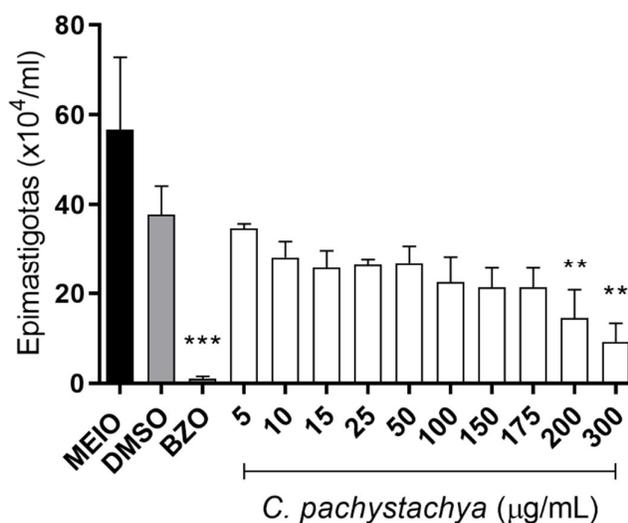


Figura 7 - Efeitos do extrato de embaúba sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* no tempo de 96 horas. * significativamente diferente do meio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,001$ respectivamente. Meio: Controle negativo (LIT). DMSO: Controle Branco (DMSO 0,6% + LIT). BZN: Controle Positivo (Benzonidazol).

O solvente do extrato (DMSO) não influenciou na inibição dos parasitas, como mostra a Figura 7, visto que os parasitas tratados com meio de cultura, mais o DMSO, não promoveram inibição. Além disso, o BZN, medicamento de referência, utilizado como controle positivo, inibiu o crescimento do *T. cruzi* conforme o esperado, com inibição máxima de 98,8%.

5.4 Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas

O efeito tripanocida do extrato sobre as formas tripomastigotas foi demonstrado após 48 horas, conforme Figura 8. O extrato mais RPMI apresentou diferença para as concentrações superiores a 100 µg/mL, demonstrando que o extrato de embaúba nessas concentrações possui ação contra o parasita. O meio também diferiu significativamente do BZN (50 µg/mL), que inibiu o crescimento do *T. cruzi*, como esperado.

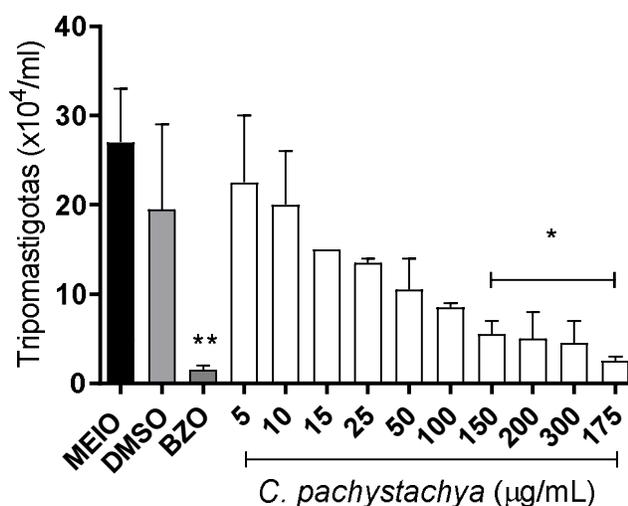


Figura 8 - Atividade tripanocida do extrato de embaúba nas tripomastigotas do *T. cruzi* após 48 horas de tratamento. Os valores são a média \pm SEM de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata (*) significativamente diferente do meio, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Meio: RPMI; DMSO: RPMI mais DMSO (0,6%); BZN: Benzonidazol (50 $\mu\text{g/ml}$).

Após às 48 horas de incubação, a CL_{50} foi calculada e resultou em $26,73 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, sendo que o percentual de mortalidade na maior concentração (300 $\mu\text{g/mL}$) foi de 90,7%, enquanto o controle positivo BZN atingiu 94,4% a 50 $\mu\text{g/mL}$, como mostra a Tabela 1.

Os dados mostram que o extrato de embaúba tem um alto potencial de diferenciação de células mamíferas e do parasita, com um $IS > 22,35$ quando comparado com o medicamento referência para tratamento da doença de Chagas, IS 31,40.

Tabela 1 - Dados de CI_{50} , CL_{50} e CC_{50} obtidos de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e macrófagos murinos tratados com extrato de embaúba.

| Composto | Epimastigotas (96 h) CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | Tripomastigotas (24 h) CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | Macrófagos CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | IS (epi) | IS (tripo) |
|----------|---|---|--|------------|--------------|
| Extrato | $17,90 \pm 1,2$ | $26,73 \pm 1,2$ | >400 | >22,35 | >14,96 |
| BZO | $3,13 \pm 1,1$ | $7,30 \pm 2,0$ | $98,4 \pm 1,3$ | 31,40 | 13,50 |

Tabela 1 - Extrato supercrítico de CO_2 de embaúba: Benzonidazol. IS (índice de seletividade): CC_{50} / CI_{50} ou CL_{50} . A concentração inibitória ou letal de 50% (CI_{50} ou CL_{50}) foi calculada com base na redução percentual média de parasitas em comparação com os controles não tratados por regressão não linear. A atividade citotóxica de 50% (CC_{50}) foi calculada com base na redução da viabilidade das células por meio de regressão não linear. Os resultados apresentados como média \pm desvio padrão (exceto para CC_{50} de embaúba, que foi impossível determinar um valor exato) de pelo menos três ensaios representativos conduzidos em triplicata.

O BZN é ativado por uma enzima nitrorredutase mitocondrial, dependente de NADH, levando a geração intracelular de radicais nitritos que são responsáveis pelo efeito tripanocida (ALEXANDRE et al., 2014). Assim como os flavonoides e procianidinas presentes no extrato atuam como removedores dos íons superóxidos e radicais hidroxol, também reduzem a oxidação de membranas celulares por restringirem o acesso de ROS, quelando metais participantes da reação de Fenton (OLIVEIRA; ESPESCHIT; PELUZIO, 2006).

5.5 Experimento *in vivo*

5.5.1 Atividade do extrato de embaúba

Os animais dos dois grupos foram infectados com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, após a infecção houve a contagem dos parasitas como no Item 4.8.2 a partir do 4º dia de infecção, até o último dia do experimento.

A Figura 9 mostra que os animais infectados com a menor dose denominados Grupo 01 e tratados com o extrato apresentaram maior nível de parasitas durante todo o período de contagem e, no 10º dia da infecção, com diferença significativa se comparado ao grupo não tratado.

O mesmo comportamento foi demonstrado nos níveis de parasitemia na infecção feita com maior quantidade de parasitas no experimento denominados Grupo 02, como mostra a Figura 10. Contudo, diferenças foram detectadas em dois dias de seguimento (12º e 14º) onde houveram picos de parasitemia.

Segundo estudos de Tatakihara et al. (2008), camundongos BALB / c infectados com a cepa Y e tratados com aspirina (inibidor da COX-1) e celecoxibe (inibidor COX-2) apresentaram aumento da carga parasitária a partir do 13º dia de infecção. O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem seletivamente a produção de IFN- γ e TNF- α nas células do baço e NK, a alta letalidade após o tratamento pode estar relacionada ao quadro sistêmico acentuado e a inibição da produção de NO.

O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxiurs-12-en-28-óico) é um triterpenóide pentacíclico, utilizado como anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico, entre outros. Estudos demonstram que a administração de ácido ursólico diminui os níveis de

interleucinas IL-1, IL-12, e IFN- γ . Além disso, esse composto pode promover a expressão de genes que codificam citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (GUDOITYTE et al., 2021)

No estudo de Falkowski-Temporini et al. (2018), utilizando camundongos Swiss, infectados com $1,4 \times 10^3$, houve um pico de parasitemia no 8º dia de infecção. Apesar de serem cepas de camundongos diferentes, os animais Swiss tem perfil de suscetibilidade semelhante ao do BALB / c, o que justifica essa semelhança.

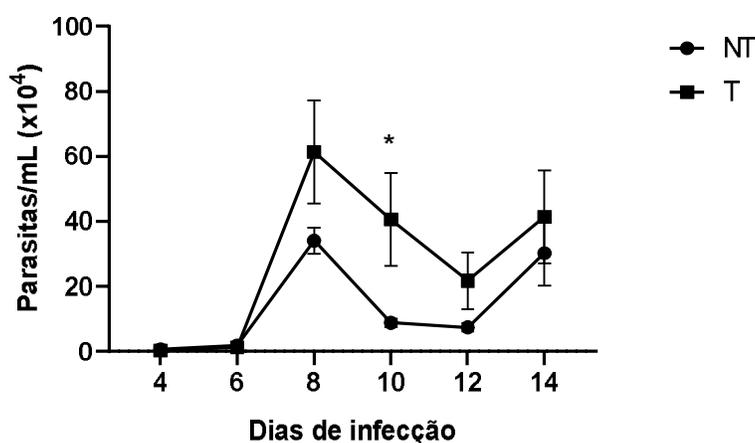


Figura 9 - Curva de parasitemia de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y) (média \pm desvio padrão). Camundongos tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e camundongos não tratados (NT). (*) significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$.

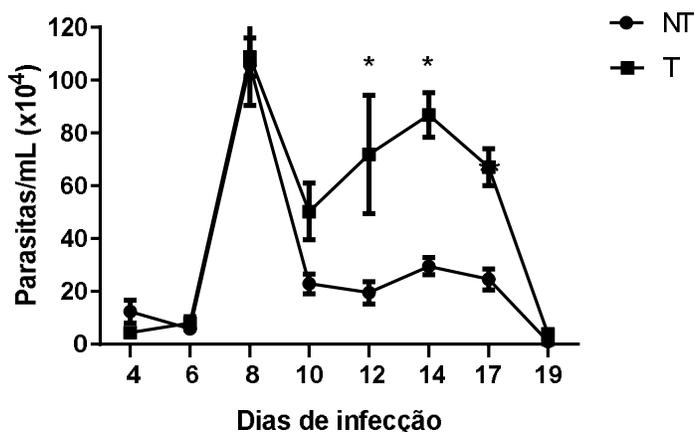


Figura 10 - Curva de parasitemia de camundongos BALB / c do Grupo 02 infectados com 1×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y), (média \pm desvio padrão). Camundongos tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e de camundongos não tratados (NT). (*) significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$.

Os animais do segundo experimento, infectados com a maior dose de *T. cruzi* foram acompanhados até o 20º dia de infecção e, nesse momento, os animais tratados tiveram apenas 20% de sobrevivência, enquanto os não tratados apresentaram 80% de sobrevivência como mostra a Figura 11.

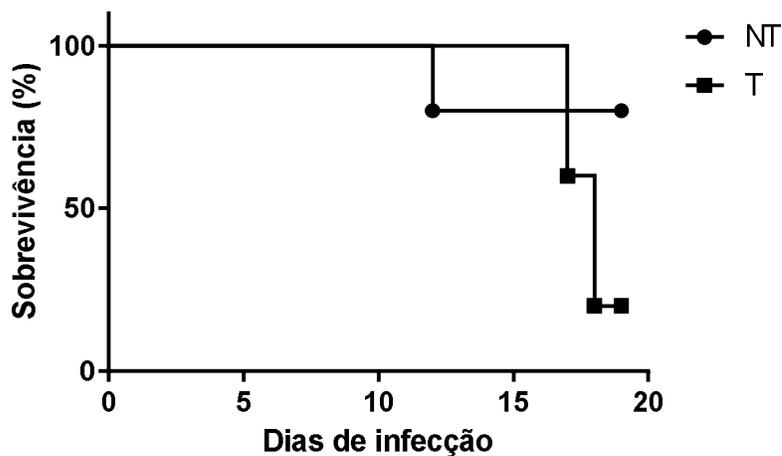


Figura 11 - Taxa de sobrevivência de camundongos BALB / c do Grupo 02 infectados com 1×10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y) tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e não tratados (NT).

Os animais foram pesados em dias alternados durante o período de infecção. A Figura 12 mostra que os animais infectados, mas que não foram tratados, ganharam peso, enquanto que com os animais infectados e tratados com o extrato de embaúba não houve alteração em relação a perda ou ganho de peso. Além disso, após o final do experimento foi observado uma diferença significativa entre os animais tratados e não-tratados, com o grupo não-tratado mostrando maior peso.

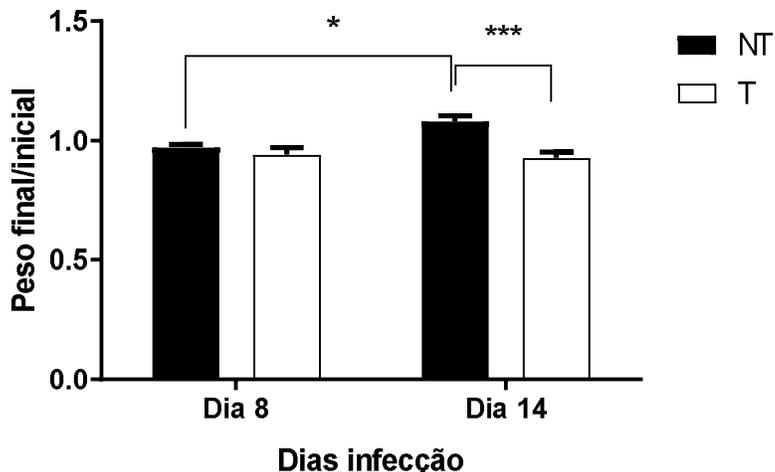


Figura 12 – Relação entre peso atual e peso inicial no oitavo e décimo quarto dia de infecção de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). Média \pm desvio padrão dos camundongos tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e dos camundongos não tratados (NT). * significativamente diferente entre os grupos ou entre os períodos, * $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

Nos animais submetidos à eutanásia, no 14º dia de infecção, foram contados eritrócitos e leucócitos sanguíneos. A anemia característica da doença de Chagas experimental aguda foi observada no dia 4º dia após a inoculação como mostra a Figura 13.

Os achados hematológicos presentes na doença de Chagas são variados, como moderada leucocitose, anemia e presença de linfócitos atípicos (PINTO et al., 2008). A infecção por *T. cruzi* está associada as graves alterações hematológicas, incluindo a trombocitopenia e neutropenia (TATAKIHARA et al., 2008). A anemia se dá pela deficiência de ferro, que conduz ao estado de imunodeficiência, aumentando a suscetibilidade à infecção, uma vez que o ferro é essencial para manutenção dos fluidos orgânicos e na atuação de energia celular e metabolismo (MIRANDA; BOTON; ROCHA, 2014).

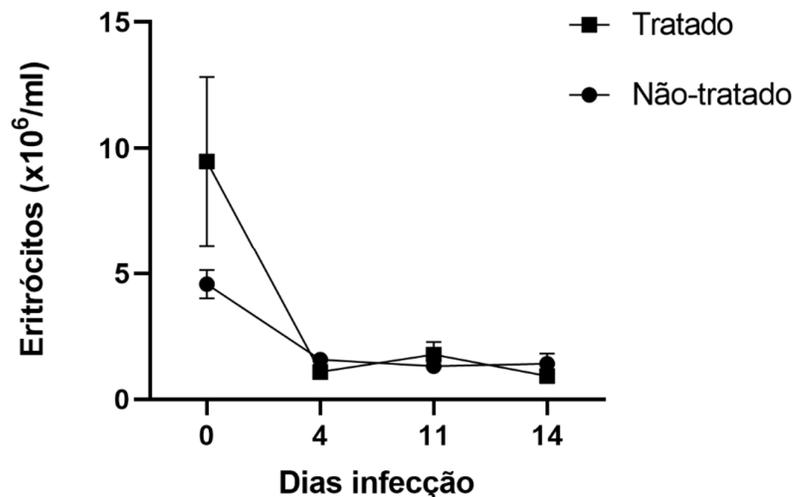


Figura 13 - Concentração de hemácias de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y) e tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e não-tratados (NT). Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

Outro parâmetro avaliado foi a contagem global de leucócitos, como observado na Figura 14, ambos os grupos tiveram o mesmo comportamento. No início da infecção houve aumento dos leucócitos, já no pico da infecção, no 11º dia, registrou-se leucopenia. A partir desse ponto, quando o nível de parasitas diminuiu, os níveis de leucócitos atingiram valores mais altos. Guerdes et al. (2012) também observaram uma relação não significativa entre os números de células sanguíneas e a parasitemia.

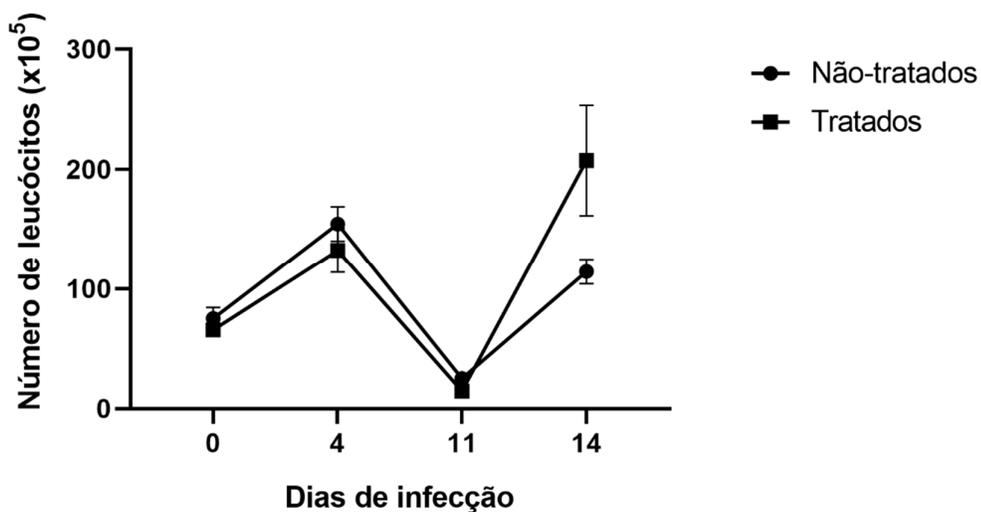


Figura 14 – Número de leucócitos sanguíneos de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y) e tratados com extrato de embaúba (100 mg/kg/dia) (T) e de camundongos não tratados (NT). Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

5.5.2 Determinação das citocinas e dosagem de óxido nítrico

Para avaliar o efeito sistêmico da infecção os macrófagos foram coletados e os parâmetros imunológicos medidos após os 14 dias da inoculação, os resultados demonstraram que o tratamento com extrato de embaúba apresentou uma diferença significativa entre os dois grupos, cujo grupo não tratado (controle) produziu maiores quantidades de NO nas condições não estimuladas e estimuladas por LPS, como mostram as Figuras 15 e 16.

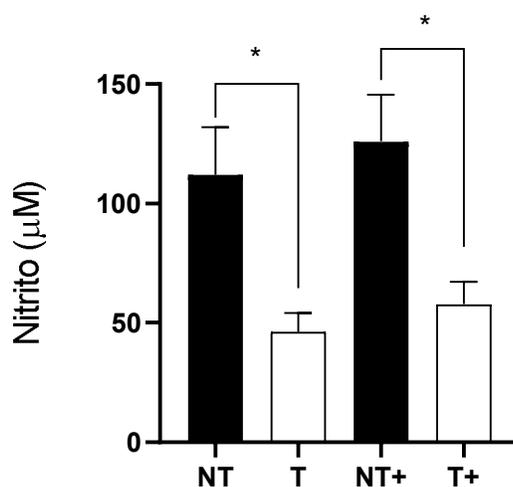


Figura 15 - Dosagem de NO após 48h de incubação produzidos por macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). NT: Não tratados com extrato de embaúba; NT+: Não tratados com extrato de embaúba + adição de LPS; T: Tratados com extrato de embaúba; T+: Tratados com extrato de embaúba + adição de LPS. * significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

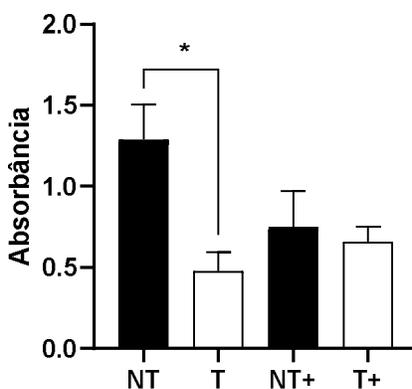


Figura 16 – Atividade de arginase após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c do Grupo 01 infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). NT: Não tratados com extrato de embaúba; NT+: Não tratados com extrato de embaúba + adição de LPS; T: Tratados com extrato de embaúba; T+: Tratados com extrato de embaúba + adição de LPS. * significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

De modo geral as citocinas IL-4 e IL-13 medeiam o desenvolvimento de macrófagos ativadas através da ligação a cadeia alfa do receptor IL-4, a indução de arginase (Arg)-1 nessas células está associado a maior suscetibilidade à infecção por parasitas da família *Trypanosomatidae*. Nesse contexto, existem dois mecanismos pelos quais a Arginase induzido por IL-4 pode neutralizar a função efetora contra o parasita em macrófagos (DAR; HÖLSCHER, 2018).

Como a Figura 16 mostra a atividade da arginase após 48 horas de incubação, podemos verificar que a atividade maior ocorreu nos grupos não tratados e que o LPS não teve influência significativa.

Sabe-se que os macrófagos envolvidos na resposta Th1 produzem NO e ROS induzindo a inflamação, e que o LPS presente em vários microrganismos é uma molécula que ativa os macrófagos envolvidos nessa resposta (MACHADO et al., 2004).

A secreção de TNF- α foi detectada no sobrenadante de macrófagos peritoneais e não mostrou diferença em condições não estimuladas, mas os macrófagos das células que foram estimulados com LPS apresentaram diferença. Nessas condições, o grupo não tratado produziu uma quantidade substancial de TNF- α ($p < 0,05$), enquanto as células do grupo tratado não produziram (Figura 17).

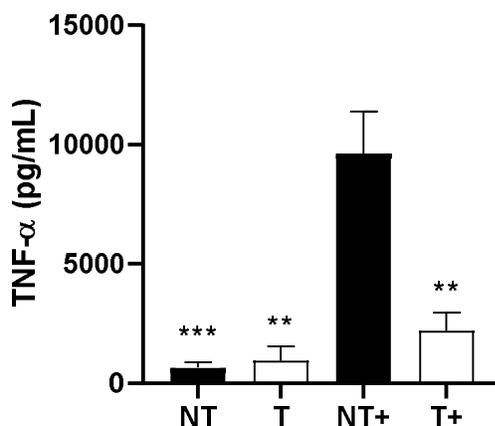


Figura 17 – Dosagem de TNF- α após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). NT: Não tratados com extrato de embaúba; NT+: Não tratados com extrato de embaúba + adição de LPS; T: Tratados com extrato de embaúba; T+: Tratados com extrato de embaúba + adição de LPS. * significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

O tratamento dos animais com extrato não pareceu influenciar na capacidade de secreção de IL-10 em macrófagos peritoneais *in vivo*, mesmo na condição estimulada por LPS, como mostra a Figura 18.

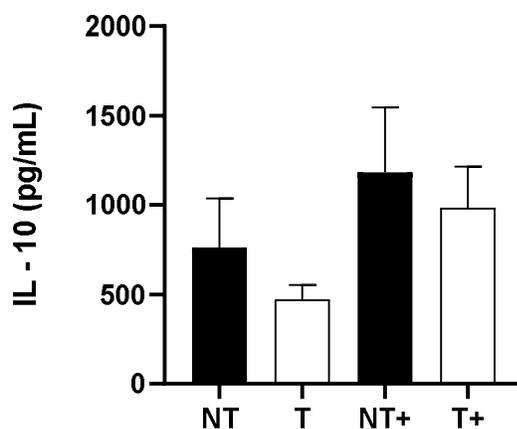


Figura 18 – Dosagem de IL-10 após 48h de incubação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). NT: Não tratados com extrato de embaúba; NT+: Não tratados com extrato de embaúba + adição de LPS; T: Tratados com extrato de embaúba; T+: Tratados com extrato de embaúba + adição de LPS. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

As células do baço dos animais confirmaram a situação obtida nos macrófagos peritoneais, visto que os esplenócitos dos camundongos não tratados secretaram mais NO em comparação aos que receberam tratamento com o extrato de embaúba (Figura 19).

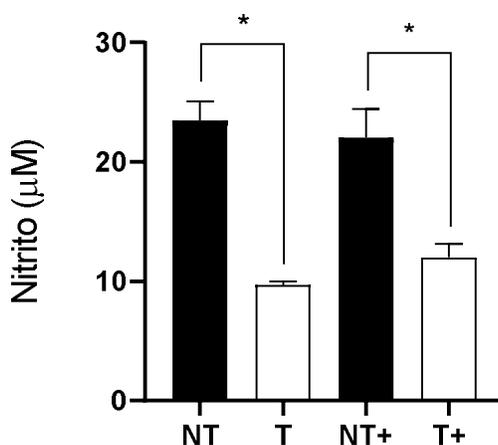


Figura 19 – Dosagem de NO em 48 horas de células do baço de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y). NT: Não tratados com extrato de embaúba; NT+: Não tratados com extrato de embaúba + adição de LPS; T: Tratados com extrato de embaúba; T+: Tratados com extrato de embaúba + adição de LPS. * significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

A secreção de IL-4 foi maior em camundongos tratados do que em não tratados, ou seja, os esplenócitos secretaram mais IL-4 nos camundongos que receberam o extrato de embaúba, isso mostra um perfil anti-inflamatório do baço nos animais que receberam extrato (Figura 20).

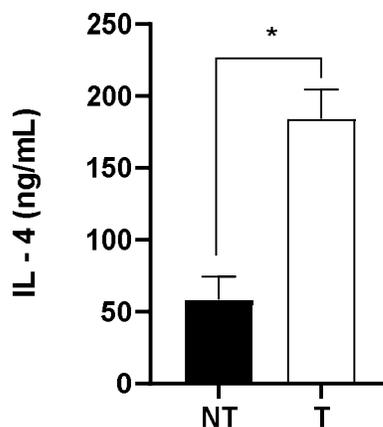


Figura 20 – Dosagem de IL-4 após 48h de incubação de células do baço de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y), Animais não tratados com extrato de embaúba (NT). Animais tratados com extrato de embaúba (T). * significativamente diferente entre os grupos, * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, produzida por células T do padrão Th2 e relacionada a suscetibilidade à infecção por parasitas como o *T. cruzi*. A IL-4 reduz a produção de IFN- γ , bloqueando as citocinas do padrão Th1, permitindo a persistência do *T. cruzi* e piorando o estado de infecção do animal, levando a sobrevida da infecção que acarreta no pior prognóstico do animal (DA SILVA et al., 2018; PAVANELLI, 2008).

Além da citocina IL-4 dosada no sobrenadante, o IFN- γ também foi analisado. Segundo Scarer e colaboradores. (2021), altos níveis de IFN- γ são produzidos durante a fase aguda da doença, essa produção ocorre devido ao intenso estímulo do macrófago para produzir IL-12 e IL-18. Através da dosagem dos níveis de IFN- γ , observou-se que os resultados foram semelhantes nos sobrenadantes de ambos os grupos (Figura 21), mostrando que o extrato não interferiu na produção da IFN- γ frente a infecção.

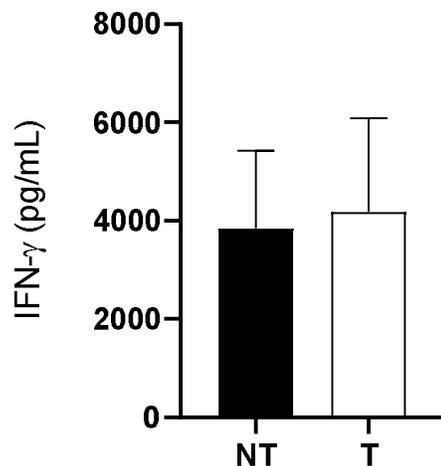


Figura 21 – Dosagem de IFN- γ de células do baço de camundongos BALB / c infectados com *T. cruzi*. Animais não tratados com extrato de embaúba (NT). Animais tratados com extrato de embaúba (T).

As células T CD4⁺ aumentam a produção de TNF- α devido a infecção pelo *T. cruzi*, diminuindo os fatores anti-inflamatórios como a IL-10 (RIOS et al., 2019). Sendo assim, as citocinas plasmáticas dos animais reforçaram o perfil anti-inflamatório no grupo tratado com os níveis de IL-10, sendo significativamente maiores em camundongos que receberam o extrato de embaúba, do que naqueles que não receberam como mostrado na Figura 22.

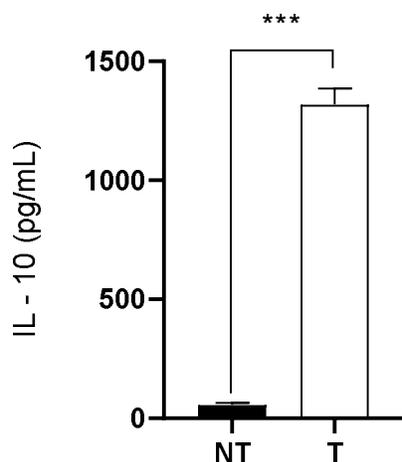


Figura 22 – Dosagem de IL-10 de plasma de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Y) e tratados ou não com extrato de embaúba. Animais não tratados com extrato de embaúba (NT). Animais tratados com extrato de embaúba (T). * significativamente diferente entre os grupos, *** $p < 0,001$. Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

A dosagem de TNF- α do plasma não diferiu no grupo tratado do grupo não tratado como mostra a Figura 23. O estudo de Duarte-Silva et al. (2020) observou níveis aumentados de TNF- α no plasma após infecção por *T. cruzi*.

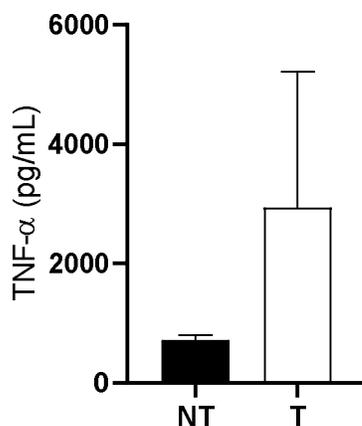


Figura 23 – Dosagem de TNF- α no plasma de camundongos BALB / c infectados com 5×10^2 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tratados ou não com extrato de embaúba. Animais não tratados com extrato de embaúba (NT). Animais tratados com extrato de embaúba (T). Os resultados são mostrados como Média \pm desvio padrão dos animais dos grupos.

Durante a infecção aguda da doença de Chagas o TNF- α é uma das citocinas que atuam na resistência ao parasita (SOARES et al., 2010). Na fase crônica da doença a função das células T são alteradas, ocorrendo a diminuição da secreção da IFN- γ conforme a progressão da doença (RIPOLL et al., 2018).

Segundo estudo de Pissetti et al. (2009), as dosagens de IFN- γ , IL-10 e de TNF- α não apresentaram diferenças significativas entre os camundongos infectados com *T. cruzi* e de camundongos não infectados.

5.6 Análise Histológica

Através da análise histológica dos dois grupos de animais, observou-se os ninhos de amastigotas nos segmentos do corte histológico do coração. Como mostra a Figura 24.

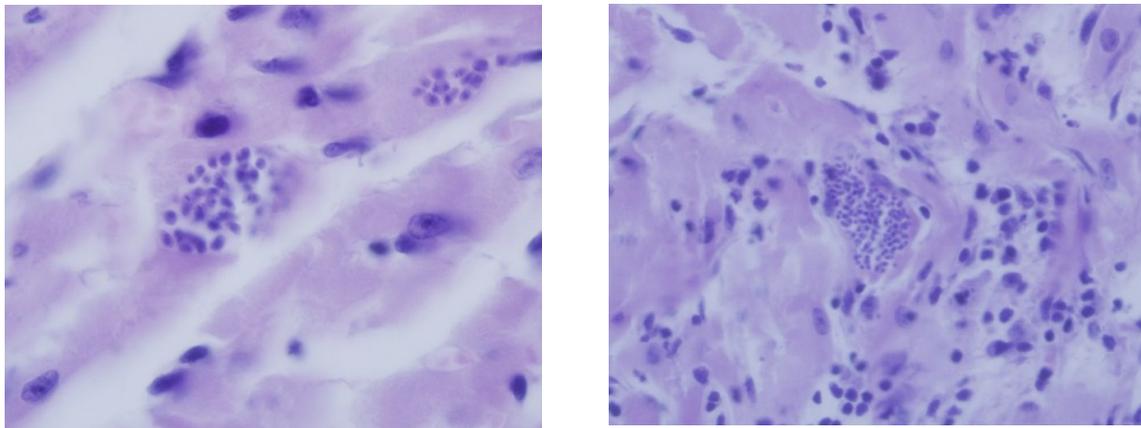


Figura 24 – Fotomicrografia de lâminas histológicas das lesões provocadas por *T. cruzi* nos corações dos camundongos BALB / c, corados com H&E, em aumento de 1000x (esquerda) e 400x (direita).

6 CONCLUSÕES

A utilização do extrato de *C. pachystachya* (embaúba), obtido por extração por CO₂ supercrítico, teve ação tripanocida contra as formas epimastigotas e tripomastigotas *in vitro*, a qual se deve provavelmente pela presença do composto ácido ursólico, pois os outros compostos presentes em maiores quantidades têm baixa atividade relatada na literatura.

O extrato de embaúba, utilizado *in vivo* oralmente em animais infectados por *T. cruzi*, promoveu a piora do quadro dos animais em comparação com animais não-tratados, quando analisados a parasitemia e a curva de sobrevivência. Essa piora do quadro provavelmente se deve à ação anti-inflamatória do extrato, o qual promoveu aumento de citocinas de perfil anti-inflamatório, tanto no plasma, quanto no baço, além de diminuir a produção de NO.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, J. P. D. O. et al. Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas : Um Antigo Problema De Saúde Pública. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 91–96, 2014.

ANDRADE, B. R. D. DE et al. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato Etanólico de Folhas da *Cecropia pachystachya* t. (Embaúba). **Research, Society and Developmen**, v. 2021, p. 1–7, 2021.

ARRAIS, F. M. DE A. et al. Perfil entomológico da doença de Chagas no município de Potengi – CE, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 45, n. 1, 2019.

BARBOSA, C. G. et al. Trypanosoma cruzi Mexican Strains Differentially Modulate Surface Markers and Cytokine Production in Bone Marrow- Derived Dendritic Cells from C57BL / 6 and BALB / c Mice. v. 2019, 2019.

BATISTA, C. et al. A four-step process for building sustainable access to diagnosis and treatment of Chagas disease. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 43, p. 1–9, 2019.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BORGES, C. R. B. et al. Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 170–174, 2009.

BRASIL. Boletim epidemiológico. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério as Saúde. 49(nov.), 2018.

BRASIL. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7–86, 2016.

BRASIL. Portal da doença de Chagas. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/>>. Acesso em: 24 jun, 2017.

BRENER, Z.; CHIARI, E. **Variações Morfológicas Observadas em Diferentes**

Amostras de Trypanosoma Cruzi *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 1963.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The Determinants of Chagas Disease : Connecting Parasite and Host Genetics. v. 1, n. 310, p. 549–562, 2004.

CAVALCANTI, M. A. F. et al. Manifestations and strategies of coping with chagas disease that interfere in the quality of life of the individual: A systematic review. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 4, p. 1405–1416, 2019.

COSTA, J. C. F. DA; HOSCHEID, J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 175–185, 2018.

CRUZ, E. M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry** 89: 71–77, 2013.

DAR, M. A.; HÖLSCHER, C. Arginase-1 is responsible for IL-13-mediated susceptibility to trypanosoma cruzi infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–11, 2018.

DA SILVA, M. A. B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 549–562, 2010.

DA SILVA, M. V. et al. Upregulation of Cardiac IL-10 and Downregulation of IFN- γ in Balb/c IL-4 $-/-$ in Acute Chagasic Myocarditis due to Colombian Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

DA SILVA MATHIAS, M.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, R. Differentiation of the phenolic chemical profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 1, p. 73–82, 2019.

DAGA, M. A.; AYALA, T. S.; MENOLLI, R. A. A Review Of The Anti-Inflammatory And Antimicrobial Activities Of The Components Of The *Cecropia* Genus. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 13, n. 8, p. 13–20, 4 jun. 2020.

DINIZ, Y. C. M. et al. Chromoblastomycosis and Chagas' disease: a case study in the

Brazilian Northeast. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 21115–21130, 2019.

Drugs for Neglected Diseases initiative. The BENDITA study: A phase II study to assess safety, tolerability, and efficacy of different benznidazole regimens, alone and in combination with fosravuconazole. Maio, 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/03/2page_BenditastudyOverview_ENG.pdf. Acesso em: 10 de agosto 2020.

DUARTE-SILVA, E. et al. Shared neuroimmune and oxidative pathways underpinning Chagas disease and major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, 2020.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

EZZAT, S. M. et al. Antiprotozoal activity of major constituents from the bioactive fraction of *Verbesina encelioides*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 6, p. 676–680, 2017.

FARIA, R. X. et al. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 49, n. 6, p. 473–483, 2017.

FALKOWSKI-TEMPORINI, G. J.; RIBEIRO, C.; FERNANDA, P.; et al. Associação de medicamentos homeopáticos promove diminuição da parasitemia e melhora clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* mais eficientes e com menos efeitos colaterais . n . 971 / 2006 , regulame. v. 1, p. 36–45, 2018.

FONSECA-BERZAL, C. et al. Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3367–3380, 2018.

GUEDES, P. M. M. et al. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 21, n. 2, p. 151–156, 2012.

GIL-JARAMILLO, N. et al. Dendritic cells: A double-edged sword in immune responses

during chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–12, 2016.

GIRARD, C. M.; et al. Evaluation of the immune response against *Trypanosoma cruzi* cytosolic trypanredoxin peroxidase in human natural infection. **Immunology**. 155: 367-378, 2018.

GONZALEZ, J. M.; CUÉLLAR, A.; J. PUERTA, C. La respuesta inmunitaria adaptativa en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 41, n. 161, p. 456, 2018.

GUDOITYTE, E. et al. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential. 2021.

HE, M.; MIN, JW.; KONG, WL.; HE, XH.; LI, JX.; PENG, BW. A review on the pharmaceutical effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**. 115: 74–85, 2016.

HIDEKO TATAKIHARA, V. L. et al. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 47–58, 2008.

HOSCHEID, J. et al. Extraction of *Cecropia Pachystachya* Leaves by Supercritical Carbon Dioxide: Kinetics, Phytochemical Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 4, p. 570, 19 out. 2020.

IMPROTA-CARIA, A. C.; ARAS, R. Treinamento com Exercício Físico e Doença de Chagas: Função Potencial dos MicroRNAs. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 1, p. 132–141, 2021.

JELICKS, L. A.; TANOWITZ, H. B. **Advances in Imaging of Animal Models of Chagas Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. v. 75

KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. p. 4807–4823, 2015.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 2015.

KUPER, H. Neglected tropical diseases and disability—what is the link? **Transactions**

of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, p. 1–6, 2019.

LOYANE, G.; CARVALHO, B. Doença e Chagas : Sua transmissão através do consumo de açaí. v. 01, p. 24–36, 2018.

MACHADO, C. D. et al. Ethnopharmacological investigations of the leaves of *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae): A native Brazilian tree species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, n. October 2020, p. 113740, abr. 2021.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, 2004.

MAQUIAVELI, C. C. et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. PART A, p. 49–57, 2014.

MESQUITA, A. S. et al. Avaliação do perfil farmacognóstico e do potencial antimicrobiano do extrato etanólico do caule da *Cecropia pachystachya* T. (embaúba). **Infarma**, v. 30, n. 2, p. 115–122, 2018.

MIRANDA, C. P.; BOTON, F. A.; ROCHA, M. Ó. C. Metabolismo do ferro na cardiomiopatia chagásica crônica Iron metabolism in chronic Chagas cardiomyopathy. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 136–137, 2014.

MOTA, J. C. DA et al. Estimativa de taxa de mortalidade e taxa de incidência de sequelas cardíacas e digestivas por doença de Chagas no Brasil, 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 711–720, 2014.

NIELEBOCK, M. A. P. et al. Soroprevalência da doença de Chagas em cardiopatas internados em um hospital de referência da região Serrana do estado do Rio de Janeiro , Brasil. **Cadernos UniFOA**, n. 33, p. 131–138, 2017.

OLIVEIRA, V. P. DE; ESPESCHIT, A. C. R.; PELUZIO, M. DO C. G. Flavonóides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 16, n. 4, p. 234–238, 2006.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças

tropicais negligenciadas. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/7680>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

OPAS/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization). OPAS divulga novo guia para diagnóstico e tratamento da doença de Chagas. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5844:opas-divulga-novo-guia-para-diagnostico-e-tratamento-da-doenca-de-chagas&Itemid=812>. Acesso em: 26 jun. 2019.

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

PAVANELLI, R. Citocinas e óxido nítrico na Doença de Chagas Cytokines and nitric oxide in Chagas Disease. n. 10, p. 147–146, 2008.

PINTO, A. Y. DAS N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, 2008.

PISSETTI, C. W. et al. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 425–430, 2009.

REVOLLO, S.; OURY, B.; VELA, A.; TIBAYRENC, M.; SERENO, D. *In vitro* Benznidazole and Nifurtimox susceptibility profile of *Trypanosoma cruzi* strains belonging to discrete typing units TcI, TcII, and TcV. **Pathogens**. 8(4),197, 2019.

REIGOTA, K. C. DA F. R.; OLIVEIRA, A. P. DE. Resposta imune na patogênese da cardiopatia chagásica crônica. **Revista Corpus Hippocraticum**, v. 1, n. 1, 2017.

RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 60–68, 2014.

RIOS, L. E. et al. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 200, n. March, p. 105168, 2019.

RIPOLL, J. G. et al. T cells responding to *Trypanosoma cruzi* detected by membrane TNF- α and CD154 in chagasic patients: **Immunity Inflammation and Disease**, v. 6, n. 1, p. 47–57, 2018.

RIVERA-MONDRAGÓN, A. et al. Phytochemical characterization and comparative studies of four *Cecropia* species collected in Panama using multivariate data analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

SANTILIANO, F. C.; ALMEIDA, B. R. DE. Resposta Imune E Mecanismos De Evasão Desenvolvidos Pelo Protozoário Parasita *Trypanosoma Cruzi*, Agente Causador Da Doença De Chagas. **Enciclopedia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1625–1636, 2012.

SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, L. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 39, n. 5, p. 279–289, 2020.

SCARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: When autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 4, p. 546–559, 2001.

SOARES, C. S. et al. Production of tumoral necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide during *Trypanosoma cruzi* infection in mice submitted to exercise. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 57–60, 2010.

SOARES, R. C. O. et al. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 1, p. 51–57, 2012.

SOUZA, D. O. et al. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 121–132, 2014.

STRADA, C. L. et al. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the brazilian crude drug extracts of *echinodorus scaber* and *E. Grandiflorus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 619–626, 2017.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure–activity relationship, and quantitative structure–activity relationship studies. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50, 1352–1364, 2006.

TAKAMIYA, N. T. et al. Investigation of Chagas disease within the same family: Case study. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 6, p. 693–704, 2019.

TANTANGMO, F. et al. Antiprotozoal activities of some constituents of *Markhamia tomentosa* (Bignoniaceae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, n. 5, p. 391–398, 2010.

TARLETON, R. L. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 10, p. 835–838, 2016.

TEIXEIRA, R. B. Perfil de pacientes portadores de Doença de Chagas em Rio Branco, Acre, Brasil. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 13, n. 4, p. 262–265, 2015.

UCHÔA, V. T. et al. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82–91, 2010.

VASCONCELOS, S. et al. Doenças Negligenciadas: Revisão da Literatura Sobre As Intervenções Propostas. **Saúde & Transformação Social / Health & Social Change**, v. 6, n. 2, p. 114–131, 2015.

WEDLER, J. et al. In vitro anti-inflammatory and wound-healing potential of a *Phyllostachys edulis* leaf extract - Identification of isoorientin as an active compound. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1678–1684, 2014.

WHO (World Health Organization). Neglected tropical diseases. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 20 jun. 2021.

8. ANEXOS



Autorização

O Protocolo nº 21-19 intitulado “Avaliação da ação anti-Trypanosoma cruzi de extrato obtido por extração a CO2 supercrítico de folhas de Embaúba (*Cecropia pachystachya*)” sob a responsabilidade de Rafael Andrade Menolli que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 05/07/2019. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

| | |
|-------------------------|--|
| FINALIDADE | Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 01/08/2019 a 31/07/2020 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo isogênico Balb/c |
| N. de animais | 21 |
| Peso/Idade | 60 dias/ 25 gramas |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná |

Cascavel, 18/07/2019



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Autorização

O Protocolo nº 29/19 intitulado “Manutenção de cepa infecciosa do protozoário *Trypanosoma cruzi* em camundongos suscetíveis”, sob a responsabilidade de Rafael Andrade Menolli que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de - 16/08/2019. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

| | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| FINALIDADE | Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 01/08/2019 - Término:31/07/2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo heterogênico - Balb/ C |
| N. de animais | 312 |
| Peso/Idade | Qualquer peso - qualquer idade |
| Sexo | Qualquer sexo |
| Origem | Biotério da Unioeste-Cascavel/PR |

Cascavel, 19/08/2019

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
 Coordenadora do CEUA
 Portaria nº 3126/2018-GRE

Autorização

O Protocolo nº 02-21 intitulado “Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extrato de *Cecropia pachystachya*”, sob a responsabilidade de **Rafael Andrade Menolli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 09/04/2021. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| FINALIDADE | Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 09/04/2021 a 31/12/2021 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo isogênico - Balb/C |
| N. de animais | 20 |
| Peso/Idade | 30 gr - 60 dias |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério da Unioeste |

Cascavel, 13/04/2021



Profa. Dra. Sara Cristina Sagae Schneider
 Vice Coordenadora do CEUA

ANEXO II

Montagem (inclusão) de material em parafina (Paraplast®)

➤ **Fixação:**

Colocar as peças (material) em formol 10% tamponado (tampão fosfato).

Fixar por 24 horas e lavar em água corrente por 48 horas.

Estocar em álcool 70% até o início da inclusão.

➤ **Desidratação:**

Material estocado em álcool 70%.

30 minutos em álcool 80% → 2 vezes.

30 minutos em álcool 95% → 2 vezes.

30 minutos em álcool 100% → 2 vezes.

➤ **Diafanização:**

Xilol + álcool 100% (1:1) → 30 minutos.

Xilol 100% (1 e 2) → 20 minutos.

Xilol PA → 20 minutos.

Infiltração:

Paraplast® + Xilol → 2 horas a partir do momento em que o Paraplast® derreter.

Paraplast® puro II → overnight stay (pernoite) +/- 14 horas.

Paraplast® puro III → 3 horas.

➤ **Inclusão:**

Montar as caixinhas de papel no tamanho do material a ser incluído.

Pegar Paraplast® puro, encher a caixinha e orientar a peça.

Deixar endurecer a temperatura ambiente.

➤ **Coloração Hematoxilina – eosina.**

Desparafinar, hidratar.

Hematoxilina 10 minutos → lavar 5 minutos em água destilada.

Álcool Absoluto por 30 segundos.

Eosina 5 minutos → lavar para retirar o excesso.

Desidratar, diafanizar e montar.