



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS DE*
CASCABEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOÃO HENRIQUE DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS
DE *Eugenia pyriformis***

**CASCABEL – PR
2019**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE
*Eugenia pyriformis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre 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

**CASCADEL - PR
2019**

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

Souza, João Henrique de
Avaliação da ação tripanocida e leishmanicida de extratos de *Eugenia pyriformis* / João Henrique de Souza; orientador(a), Rafael Andrade Menolli, 2019.
54 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania* spp. 3. Extratos naturais. 4. Uvaia. I. Menolli, Rafael Andrade . II. Título.

JOÃO HENRIQUE DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS
DE *Eugenia pyriformis*

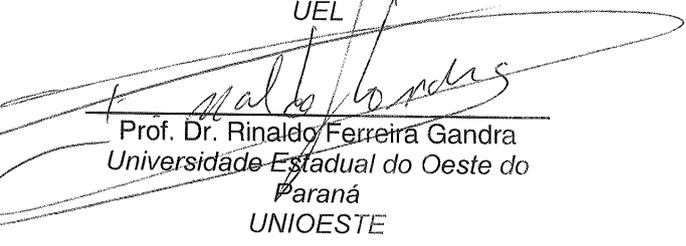
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microorganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

BANCA EXAMINADORA:


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


Prof. Dr. José Vitor Jankevicius
Universidade Estadual de Londrina
UEL


Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

Cascavel - PR
2019

BIOGRAFIA

João Henrique de Souza, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nasceu em 13 de abril de 1987.

Iniciou graduação em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, no ano de 2006, com término no ano de 2010.

No mesmo ano, tornou-se colaborador do Instituto de Hematologia de Cascavel-PR, onde ficou até julho de 2013. Iniciou, nesse ano, o cargo de plantonista do Unilabor, na mesma cidade.

Em agosto de 2014, tornou-se servidor público da prefeitura de Cascavel-PR, onde permanece até os dias de hoje.

É especialista em Qualidade e Segurança no Cuidado ao Paciente pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês, tendo finalizado o curso no ano de 2016.

Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2017 e desenvolve projeto orientado pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli.

“É tudo muito pequeno – coisas microscópicas ou menores ainda, partículas elementares – ou muito grandes, como astros e estrelas. São mundos completamente invisíveis para nós, mas que são revelados pela ciência”.

(Marcelo Gleiser)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida.

Aos meus pais, meu irmão, minha namorada e minha avó que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao professor Rafael, por ter sido peça importante em todo o processo de aprendizagem.

Ao curso de mestrado e às pessoas com quem convivi nesse espaço de tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar tudo que foi possível até hoje.

À minha família, em especial à minha mãe, Mirian, minha avó, Gema, e meu irmão, Dudu. Nada disso seria possível se não fosse o amor e a dedicação de vocês.

À Gabriela, inesperado mais esperado, pelo amor, doçura e paciência nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli, pela orientação, competência, paciência, discernimento, profissionalismo e dedicação. Seus ensinamentos foram importantes para que eu chegasse a esse ponto.

Aos colegas de laboratório, que estiveram presentes durante essa fase, ajudando a fazer ciência e compartilhar as frustrações, risadas e um bom café.

Aos amigos de longa data (Veloso) e aos mais recentes (André e Suzy), estes últimos me pentelharam.

Aos colegas de turma, que ajudaram a compartilhar as agonias e os momentos mais descontraídos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF).

E a todos aqueles que, em algum momento, me apoiaram e incentivaram estar aqui, pois também foram muito importantes nesse processo.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE *Eugenia pyriformis*

Resumo

A doença de Chagas e a leishmaniose são doenças consideradas negligenciadas, presentes principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A doença de Chagas, além de ser transmitida pelo inseto vetor, pode ocorrer também por meio de transfusão de sangue contaminado, que atinge cerca de 5 a 20% dos casos. Os fármacos mais frequentemente usados para o tratamento da tripanosomíase são os compostos nitroheterocíclicos Nifurtimox e Benznidazol, os quais causam toxicidade sistêmica e efeitos adversos. A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, para as quais, historicamente, o tratamento tem sido baseado no uso de antimônios pentavalentes, para os quais há evidências de resistência no tratamento. Assim sendo, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para tratar a doença de Chagas e as leishmanioses tem se tornado de alta prioridade. Este estudo avaliou a ação leishmanicida e tripanocida, assim como a ação imunomodulatória em macrófagos dos extratos obtidos por extração por CO₂ supercrítico (extrato 1) e extração assistida por ultrassom (extrato 2) de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis*). Os resultados mostram, para formas promastigotas de *L. amazonensis*, uma inibição do crescimento, com CI₅₀ de 3.15 µg/mL para o extrato 1 e 12.39 µg/mL para o extrato 2. Já com relação à ação tripanocida, uma queda na contagem, semelhante ao controle benznidazol, foi detectada, principalmente na forma infectante (tripomastigota) com um CL₅₀ de 16.62 µg/mL para o extrato 1 e de 6.23 µg/mL para o extrato 2. Ambos os extratos apresentaram segurança com a *L. amazonensis*, sendo para o extrato 1 até a concentração de 100 µg/mL, e com a forma infectante do *T. cruzi* (promastigota) avaliada pelo seu Índice de Seletividade (IS). Na avaliação da capacidade de estimular a produção de óxido nítrico e superóxido, os dois extratos se mostraram capazes de estimular em algumas concentrações. A capacidade fagocítica foi avaliada, não apresentando diferenças significativas em relação aos controles utilizados. Sendo assim, este estudo revelou a capacidade de ação dos extratos de uvaia contra os microrganismos causadores da doença de Chagas e da leishmaniose, assim como alguma ação sobre macrófagos murinos, justificando estudos mais aprofundados para futuros testes *in vivo* como uma alternativa terapêutica potencial para as patologias tratadas neste estudo.

Palavras-chave:

Trypanosoma cruzi, *Leishmania spp*, extratos naturais, ação imunomodulatória, uvaia.

EVALUATION OF THE TRYPANOCIDAL AND LEISHMANICIDAL ACTION OF EXTRACTS FROM *Eugenia pyriformis*

Abstract

Chagas disease and Leishmaniasis are diseases considered neglected, present mainly in underdeveloped and developing countries. Chagas disease, beside to being transmitted by the insect vector, can also occur through transfusion of contaminated blood, which affects about 5 to 20% of cases. The most frequently drugs used for the treatment of trypanosomiasis are nitroheterocyclic compounds Nifurtimox and Benznidazole, which cause systemic toxicity and adverse effects. Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoan parasites of more than 20 species of the genus *Leishmania*, for which treatment has historically been based on the use of pentavalent antimony for which there is evidence of resistance. Thus, the development of alternative therapeutic strategies to treat Chagas' disease and Leishmaniasis has become a high priority. This study evaluated leishmanicidal and trypanocidal action as well as immunomodulatory action on macrophages of extracts obtained by supercritical CO₂ extraction (extract 1) and ultrasonic assisted extraction (extract 2) of Uvaia leaves (*Eugenia pyriformis*). The results show a growth inhibition of promastigotes of *L. amazonensis* with IC₅₀ of 3.15 µg/mL for extract 1 and 12.39 µg/mL for extract 2. In trypanocidal tests, an action similar to Benznidazole was detected, mainly in the infective form (trypomastigote), with an LC₅₀ of 16.62 µg/mL for extract 1 and 6.23 µg/mL for extract 2. Both extracts showed safety with *L. amazonensis*, for extract 1 up to the concentration of 100 µg / mL, and with the infective form of *T. cruzi* (promastigote), evaluated by its Selectivity Index (IS). In the evaluation of the ability to stimulate the production of nitric oxide and superoxide, the two extracts were able to stimulate in some concentrations. The phagocytic capacity was evaluated, not presenting significant differences to those of the controls used. Thus, this study revealed the ability of Uvaia extracts to act against microorganisms that cause Chagas disease and Leishmaniasis, as well as some action on murine macrophages, justifying further studies for future in vivo tests as a potential therapeutic alternative, for the pathologies treated in this study.

Key words

Trypanosoma cruzi, *Leishmania spp*, natural extracts, immunomodulatory action, Uvaia.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	6
Objetivo geral	6
Objetivos específicos.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1. <i>Eugenia pyriformis</i>	7
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
3. Doença de Chagas	9
4. Quimioterapia da doença de Chagas	10
5. <i>Leishmania spp.</i>	11
6. Leishmaniose e sua quimioterapia	12
7. Estudos com produtos vegetais	13
8. Métodos de extração.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
1. Extratos de folhas de uvaia	15
2. Atividade antioxidante – método DPPH.....	15
3. Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida sobre formas promastigotas e epimastigotas em meio de cultura.....	16
4. Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas em meio de cultura.....	17
5. Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos	17
6. Determinação da viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-metil-[4-5-48 dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) e dosagem de óxido nítrico (NO)	18
7. Produção de ânion superóxido.....	19
8. Produção de peróxido de hidrogênio.....	19
9. Fagocitose	19
10. Análise estatística.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
Avaliação da capacidade antioxidante	21
Avaliação da atividade leishmanicida.....	23
Avaliação da atividade tripanocida.....	24
Determinação da viabilidade celular	27
Avaliação do estímulo à produção de óxido nítrico (NO).....	29
Avaliação do estímulo à produção do ânion superóxido	31
Avaliação do estímulo à produção de peróxido de hidrogênio	33

Avaliação do estímulo à capacidade fagocítica.....	34
Quantificação e avaliação da α e β -amirina	36
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Porcentagem da atividade antioxidante com desvio padrão (método DPPH) dos extratos obtidos de <i>E. pyrifomis</i> por CO ₂ supercrítico (E1) e assistido por ultrassom (E2). O controle positivo foi realizado com Vitamina E (α -tocoferol).	22
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Aspecto do extrato obtido por CO₂ supercrítico (1) e assistido por ultrassom (2) 15
- Figura 2 Atividade leishmanicida dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 96 horas. GLU – Glucantime (300 µg/mL). *, **, *** e **** significam p<0,05, p<0,01, p<0,001 e p<0,0001, respectivamente, em relação ao meio..... 24
- Figura 3 Atividade tripanocida sobre formas epimastigotas dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 96 horas. BENZ – Benznidazol (50 µg/mL). ** e **** significam p<0,01 e p<0,0001, respectivamente, em relação ao meio..... 25
- Figura 4 Atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 48 horas. BENZ – Benznidazol (50 µg/mL). **, *** e **** significam p<0,01, p<0,001 e p<0,0001, respectivamente, em relação ao meio..... 27
- Figura 5 Viabilidade celular de macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido com CO₂ supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL). 28
- Figura 6 Viabilidade celular de macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL). 29
- Figura 7 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO₂ supercrítico - extrato 1. *, ** e *** significam p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente, em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL)..... 30

- Figura 8 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. * e ** significam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 31
- Figura 9 Produção do ânion superóxido por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO_2 supercrítico - extrato 1. * significa $p < 0,05$ em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 32
- Figura 10 Produção do ânion superóxido por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. * significa $p < 0,05$ em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 33
- Figura 11 Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO_2 supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 34
- Figura 12 Atividade fagocítica de macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO_2 supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 35
- Figura 13 Atividade fagocítica de macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$). 35
- Figura 14 Cromatograma dos padrões de α e β -amirina dos extratos 1 (a) e 2 (b). 36

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas e a leishmaniose são doenças consideradas negligenciadas, presentes principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Além de o seu tratamento apresentar algumas barreiras, estudos revelam que, durante os últimos 6 anos, apenas um medicamento foi aprovado para sua terapêutica.

Milhões de pessoas são infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, sendo difícil sua detecção na fase aguda devido ao baixo percentual de indivíduos que desenvolvem os sintomas, sendo comum a detecção somente na fase crônica. As drogas utilizadas para o tratamento, Nifurtimox e Benznidazol, apresentam algumas adversidades, como toxicidade, longa duração no tratamento e incerteza na eficácia nesta última fase da doença.

A leishmaniose é uma doença endêmica cujo diagnóstico é limitado pelas variações e manifestações subclínicas da doença. Existem alguns medicamentos disponíveis para o seu tratamento, como os antimônios pentavalentes, porém os vários inconvenientes manifestados durante o tratamento dificultam a adesão ao mesmo.

Hoje sabemos que produtos naturais, como extratos e compostos isolados, fornecem uma gama de opções de compostos que podem servir de alicerce para o desenvolvimento de novas drogas. Algumas classes de metabólitos se destacam por diversas atividades já detectadas, tais como os alcaloides, os quais são substâncias de caráter básico que representam uma classe de diversos metabólitos secundários, podendo apresentar propriedades farmacológicas. Essa característica é evidenciada em estudos que mostram preparações no noroeste da Amazônia contra febre e reumatismo, e que tiveram atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro*. Os flavonoides também são uma classe abundante no reino vegetal, que apresentam muita atividade biológica e são encontrados principalmente em frutas e flores. Muitos dos extratos que contêm flavonoides são descritos como substâncias que possuem atividade antitripanosoma. Por fim, os triterpenos isolados de plantas têm apresentado atividades antitumoral, antiviral, imunodepressora e leishmanicida. Estes podem ser encontrados em extrações de frutas, como, por exemplo, da casca da bananeira.

Em síntese, os produtos naturais apresentam uma rica fonte de compostos ativos que merecem cada vez mais destaque na comunidade científica. Devido a uma

quimioterapia insatisfatória, infecções por *Trypanosoma* e *Leishmania* são potenciais alvos de estudos, revelando o benefício da introdução de agentes com produtos naturais para o tratamento dessas infecções. Assim, sabendo-se da presença de vários constituintes importantes nos extratos de uvaia (*Eugenia pyriformis*), realizou-se aqui um estudo sobre as suas atividades antiparasitárias e imunomodulatórias.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o efeito leishmanicida e tripanocida, assim como a toxicidade e os efeitos imunomodulatórios sobre macrófagos murinos, de extratos obtidos por extrações a CO₂ supercrítico e assistido por ultrassom da folha de uvaia (*Eugenia pyriformis*), utilizando-se de *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e macrófagos murinos.

Objetivos específicos

- Verificar o potencial leishmanicida (*L. amazonensis*) e tripanocida (*T. cruzi*) dos extratos sobre formas de cultura (promastigotas e epimastigotas, respectivamente);
 - Verificar o potencial tripanocida (*T. cruzi*) dos extratos sobre formas infectantes (tripomastigotas);
 - Verificar a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à ação dos extratos;
 - Verificar a capacidade de imunomodulação sobre macrófagos peritoneais de camundongos, dosando-se óxido nítrico (NO), superóxidos, peróxido de hidrogênio e capacidade fagocítica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Eugenia pyriformis*

Atualmente há um grande interesse das indústrias farmacêuticas no uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. A integração das indústrias farmacêuticas com as universidades que realizam pesquisas com recursos naturais bioprospectivos em busca de novos medicamentos tem se destacado (CHAVASCO et al., 2014).

As Myrtaceae são uma grande família de plantas com flores. Compreendem 142 gêneros e 5.500 espécies, predominantemente encontrados no hemisfério sul, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais e sendo uma das principais famílias de fruteiras da Mata Atlântica brasileira (THORNHILL et al., 2015).

A uvaia pertence à família das Myrtaceae, mesma família da pitanga, da jabuticaba e de outras plantas atualmente estudadas devido às suas propriedades antioxidantes (PERES et al., 2013).

Eugenia pyriformis Cambess, popularmente conhecida como uvaia, tem uma fruta amarela, comestível e pode ser usada para fazer sucos, vinagre e vinho. O fruto de *Eugenia pyriformis* tem atividade bacteriostática quando testado contra isolados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (CHAVASCO et al., 2014).

O efeito protetor exercido pelas frutas foi atribuído à presença de compostos antioxidantes, com ênfase nas vitaminas e em alguns metabólitos especiais, como compostos fenólicos e carotenoides (PEREIRA et al., 2012).

A uvaia se destacou com o maior conteúdo total de carotenoides, com 3 e 22 vezes os valores encontrados para guabiroba e goiaba amarela, respectivamente. Além disso, a uvaia mostrou quantidades mais elevadas de todos os carotenoides individuais identificados, embora não difiram significativamente da guabiroba quanto às quantidades de zeaxantina e de criptoxantina (PEREIRA et al., 2012).

Terpenos são uma característica definidora das Myrtaceae, que são conhecidas por terem algumas das maiores concentrações de terpenos foliares no reino vegetal (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008; PADOVAN et al., 2014). São, indiscutivelmente, um dos grupos mais importantes de compostos no reino vegetal porque eles formam uma classe muito grande de metabólitos secundários de plantas e desempenham vários papéis na vida das plantas (PADOVAN et al., 2014).

Os terpenos são encontrados continuamente na busca por compostos bioativos isolados de plantas, que são metabólitos secundários de origem vegetal que podem afetar vários alvos no parasita *Leishmania*, como a adenina fosforribosiltransferase, proteases de cisteína e microtúbulos (DA SILVA et al., 2018).

Os triterpenos pentacíclicos são distribuídos por todo o reino vegetal em forma livre como agliconas ou em formas combinadas, e têm sido conhecidos por terem uma série de efeitos biológicos. Os compostos α -amirina e β -amirina e seus análogos são comumente encontrados em plantas medicinais, sendo estudados devido às suas propriedades químicas e farmacológicas (VÁZQUEZ et al., 2011).

Os triterpenos α -amirina e β -amirina e seus derivados estão sendo amplamente estudados nos últimos anos, com potencial para as mais variadas aplicações biológicas e farmacológicas, tais como: citotóxica, gastroprotetiva, antidepressiva, inseticida, antinociceptiva, anti-hiperglicêmico, hipocolesterolêmico, antipruriginoso, antimicrobiana, antiagregante plaquetário e anti-inflamatória (KLEIN et al., 2018).

A revisão da literatura apresenta a uvaia como uma espécie frutífera bastante comum na região sul do Brasil, mas pouco estudada em relação à composição e aos possíveis usos dos extratos obtidos de suas folhas, sendo que não foram encontrados estudos de extrações não convencionais (extração com fluido supercrítico e extração assistida por ultrassom) (KLEIN et al., 2018).

2. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, endêmica em 21 países da América Latina. A migração e as viagens contribuíram adicionalmente para a propagação da doença de Chagas para outros continentes, incluindo a América do Norte e a Europa (CAL et al., 2016).

É um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Esse parasita possui três formas evolutivas distintas (epimastigota, tripomastigota e amastigota), que se diferenciam morfológicamente pela posição de emergência do flagelo, pelo tamanho e pela posição do cinetoplasto relativa ao núcleo (PRATA, 2001).

As formas tripomastigotas têm aproximadamente 15 μ m de comprimento e são fusiformes. O cinetoplasto possui a forma redonda e encontra-se na região posterior ao núcleo. São as formas infectivas, não multiplicativas do parasita, encontradas no sangue do hospedeiro (homem, mamífero) e no intestino posterior do inseto vetor

(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). O flagelo emerge da região posterior do corpo e se dirige para a região anterior, aderido à membrana plasmática. As formas epimastigotas têm cerca de 20 μm de comprimento e são também fusiformes. O cinetoplasto é em forma de barra e encontra-se na região anterior ao núcleo. Estas são as formas proliferativas no intestino do triatomíneo e as predominantes em culturas acelulares. Por esta razão, são as formas mais frequentemente utilizadas em estudos bioquímicos e de biologia celular (PRATA, 2001).

As formas amastigotas possuem aproximadamente 2 μm de diâmetro, são arredondadas, não possuem um flagelo emergente e seu cinetoplasto apresenta-se em forma de barra. Essas formas se multiplicam por divisão binária no interior das células do hospedeiro (homem, mamífero) e se diferenciam em tripomastigotas, que, com a ruptura da célula hospedeira, são liberadas no sangue, podendo então invadir novas células (PRATA, 2001).

T. cruzi é um parasita intracelular que invade diferentes tipos de células, onde se multiplica. A diversidade biológica, bioquímica e genética dos isolados de *T. cruzi* tem sido reconhecida ao longo da complexidade ecoepidemiológica (WHO, 2012).

3. Doença de Chagas

A doença de Chagas tem esse nome por causa de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e pesquisador brasileiro que descobriu a doença em 1909. Também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma doença potencialmente fatal, causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas com *T. cruzi* (WHO, 2017).

A fase aguda da doença de Chagas é reconhecida apenas em 1% a 2% dos indivíduos infectados. Na fase aguda, os sintomas são variáveis, tais como: febre, mal-estar, distúrbios cardíacos, vermelhidão e inchaço nos olhos, os quais diminuem espontaneamente depois de 4 a 8 semanas. O tratamento adequado pode eliminar o parasita durante esta fase. Na fase crônica, aproximadamente 70% dos indivíduos soropositivos são assintomáticos (forma indeterminada), enquanto 30% desenvolvem patologias cardíacas e/ou digestivas graves. Podem ocorrer lesões inflamatórias circunscritas ou necrotizantes na matéria cinzenta no sistema nervoso central (SNC). O resultado da infecção, em um indivíduo em particular, é o resultado de um conjunto de interações complexas entre a composição genética do parasita, o fundo imunogênico do hospedeiro e os fatores ambientais (WHO, 2012).

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública na América Latina atualmente, afetando cerca de 8 milhões de pessoas em 21 países e espalhando por migração humana para uma série de regiões não endêmicas. Desde 1990, as iniciativas de controle regional reduziram substancialmente o número de novas infecções na América Latina. O número de infecções relacionadas à transfusão também diminuiu substancialmente em todos os países da América Latina, uma vez que a triagem do banco de sangue tornou-se obrigatória (WHO, 2012).

Não obstante o considerável impacto das atividades de prevenção e controle adotadas no âmbito das políticas nacionais, estima-se que ainda exista mais de um milhão de pessoas vivendo com a infecção por *T. cruzi* no Brasil (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016).

O cenário tradicional de transmissão vetorial intradomiciliar, majoritário desde a descoberta da doença e responsável por dezenas de milhares de casos ocorridos anualmente, cedeu lugar à transmissão ligada ao ciclo silvestre do parasita e, atualmente, concentra-se na região amazônica, refletindo-se em cerca de 150 casos novos/ano (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015).

É notável que 13,4% dos pacientes descontinuam o tratamento de forma permanente com Benznidazol, devido a eventos adversos. Essa taxa é menor do que a relatada em observações de ensaios randomizados realizados antes de 2015. Isso mostra que os tratamentos repetidos contra o parasita podem ser eficazes e viáveis (MORILLO et al., 2015).

4. Quimioterapia da doença de Chagas

Progressivamente, tem-se ressaltado que o tratamento das pessoas infectadas por *T. cruzi* não deve se restringir apenas à farmacoterapia específica e sintomática, cabendo proporcionar-lhes uma atenção integral, independentemente da forma clínica (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016).

Na ausência de uma vacina, a única opção de tratamento é a quimioterapia. No entanto, as drogas existentes, Benznidazol e Nifurtimox, têm várias limitações, nomeadamente em relação aos seus efeitos adversos graves e contraindicações. São urgentes medicamentos mais seguros (CAL et al., 2016).

As falhas terapêuticas do Benznidazol e do Nifurtimox estão documentadas na doença de Chagas. O sucesso terapêutico parece depender da interação entre a

susceptibilidade a drogas de cepas de *T. cruzi*, o acesso e acúmulo de drogas em diferentes ambientes e a resposta imune do hospedeiro (WHO, 2012).

O Nifurtimox e o Benznidazol causam toxicidade sistêmica e efeitos adversos que incluem anorexia, náusea, vômito, febre, dermatites, dores musculares e polineuropatia periférica (KIRCHHOFF, 2000).

O Benznidazol normalmente limpa a detecção de parasitas em aproximadamente 94% dos pacientes que estão na fase indeterminada da doença (ou seja, apresentam achados sorológicos positivos, mas não evidenciam danos cardíacos), com efeitos sustentados durante, pelo menos, 1 ano (MOLINA et al., 2014). Em contraste, no estudo envolvendo apenas pacientes com cardiopatia chagásica estabelecida, a eficácia do tratamento avaliada pela conversão para resultados negativos da PCR foi mais modesta, com taxas de 66% no final do tratamento e de 46,7% após 5 anos ou mais, o que sugere que o regime padrão de Benznidazol pode ser menos efetivo em pacientes com cardiomiopatia estabelecida (MORILLO et al., 2015).

O papel do tratamento em pacientes com doença de Chagas crônica e o efeito de tal tratamento sobre a progressão da doença não são claros, uma vez que os dados foram relatados apenas a partir de pequenos estudos randomizados (MORILLO et al., 2015).

5. *Leishmania spp*

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*, que são transmitidas para os humanos pela picada da fêmea infectada do flebotomíneo (DESJEUX, 2004).

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxênico, alternando entre formas promastigotas (extracelulares) e amastigotas (intracelulares). Promastigotas são transmitidas exclusivamente pelo hospedeiro invertebrado, que são mosquitos flebotomos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. Estes inoculam as formas promastigotas metacíclicas, infectando o hospedeiro vertebrado. Uma vez no interior do hospedeiro, as formas promastigotas são internalizadas pelos macrófagos, onde se diferenciam em formas amastigotas imóveis, constituindo o principal alvo das quimioterapias para a leishmaniose (CUNNINGHAM, 2002).

A leishmaniose manifesta-se em um amplo espectro de formas clínicas, que dependem da espécie ou subespécie do parasita infectante, da distribuição dos

macrófagos infectados e, especialmente, da resposta imune do hospedeiro. As principais síndromes de leishmaniose humana, em ordem crescente de acometimento sistêmico e provável gravidade clínica, classificam-se como: formas cutâneas, mucocutâneas e visceral. A resposta às diferentes espécies tem ligação com os tipos celulares envolvidos na resposta, com formas resistentes estando ligadas aos linfócitos TH1, enquanto, nas formas suscetíveis, existe um predomínio de linfócitos TH2 (ASHOK; ACHA-ORBEA, 2014).

6. Leishmaniose e sua quimioterapia

A leishmaniose compreende uma das seis doenças tropicais generalizadas que são endêmicas em 98 países, afetando 12 milhões de pessoas em todo o mundo (DA SILVA et al., 2018).

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença infecciosa não contagiosa causada por parasitas do gênero *Leishmania*, afetando a pele (leishmaniose cutânea) e mucosa (leishmaniose mucocutânea). No Brasil, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são as principais espécies dermatrópicas. As duas últimas espécies são amplamente distribuídas no país, com casos de infecções relatados em todos os estados brasileiros (GARCIA et al., 2017).

Desde a década de 1940, a terapia de primeira escolha para leishmaniose tem sido os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Essas drogas são os principais tratamentos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e são administradas por via parenteral ou oral (DA SILVA et al., 2018).

A administração parenteral desses compostos é ainda a primeira escolha terapêutica; no entanto, a resistência do parasita vem crescendo e seus efeitos colaterais, como artralgias, mialgias, pancreatites, leucopenia e cardiotoxicidade, são problemas importantes vivenciados por pacientes (VALADARES et al., 2012).

Até a data, não existe vacina adequada contra *Leishmania*. No entanto, várias preparações de vacinas estão em estágios de teste. As vacinas avaliadas até agora incluem o parasita vivo, vivo atenuado (contendo os que são infecciosos, mas não patogênicos) e mortos (com propósito profilático ou terapêutico) (BACON et al., 2014; MUTISO et al., 2013).

Assim sendo, o desenvolvimento de estratégias alternativas terapêuticas para tratar a leishmaniose tem se tornado de alta prioridade. Nas últimas décadas, maior

ênfase tem sido dada para a identificação de novas formulações para as vias oral e tópica para o tratamento da doença (VALADARES et al., 2012).

Vários compostos isolados de plantas, como terpenoides, esteróis, flavonoides, alcaloides, fenólicos e naftoquinonas, foram estudados para avaliar seus efeitos sobre *Leishmania spp* (SILVA et al., 2014).

Nesse contexto, novas rotas de tratamento, comparadas com a administração parenteral, representam uma interessante abordagem e oferecem várias vantagens, incluindo melhora na segurança, melhor conformidade e uma menor dor produzida pelo uso da agulha (VALADARES et al., 2012).

7. Estudos com produtos vegetais

O uso indiscriminado de antimicrobianos pela população em geral tem causado graves problemas de saúde pública em todo o mundo, devido ao fato de que os microrganismos têm a capacidade de desenvolver resistência a esses agentes terapêuticos (CHAVASCO et al., 2014).

Historicamente, os produtos naturais são uma boa estratégia quando procuramos por novos compostos bioativos. Eles fornecem uma base para a concepção e síntese de compostos derivados que podem otimizar a atividade biológica e minimizar efeitos colaterais (SCOTTI et al., 2016).

Os remédios de ervas foram considerados importantes fontes para conduzir compostos ou como fitoterapia, devido ao seu uso no tratamento de diferentes doenças desde a antiguidade. No entanto, apenas 20% das plantas com bioatividade foram submetidas a triagens e bioensaios (MWANGI et al., 2010).

Nas últimas décadas, houve um movimento chamado de “volta à natureza”, com a redescoberta da fitoterapia, reforçada pelo sucesso obtido por produtos naturais com taxol para o tratamento de câncer e artemisinina para malária. As plantas já forneceram muitas substâncias para a medicina no passado e permanecem como importante fonte no desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados como agentes quimioterápicos. Diversos estudos já demonstraram a atividade biológica de algumas plantas sobre parasitos (PHILLIPSON, 2003).

O Brasil é reconhecido pela imensa diversidade biológica de sua flora e é considerado um dos principais centros de diversidade genética para as espécies de frutas no mundo. No entanto, a maior parte dessa riqueza permanece subutilizada e seu potencial desconhecido (PEREIRA et al., 2012).

8. Métodos de extração

A extração é um importante passo para a separação, a identificação e o uso de valiosos compostos de diferentes plantas, sendo que, a partir da escolha do método de extração, pode-se obter alto rendimento e pureza dos compostos de interesse (DANLAMI et al., 2014).

Extração assistida por ultrassom: Ultrassom é um tipo de onda sonora, inaudível pelo sistema auditivo humano, geralmente com frequências entre 20 kHz e 10 MHz. Essas ondas passam através do meio, criando compressão e expansão, gerando um processo conhecido como cavitação, no qual bolhas são produzidas, crescem e sofrem colapso (AZMIR et al., 2013).

Os mecanismos da extração assistida por ultrassom são atribuídos aos efeitos térmicos, mecânicos e de cavitação, que resultam na ruptura das paredes celulares e redução do tamanho das partículas da matriz vegetal, facilitando a transferência de massa (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

Extração por CO₂ supercrítico: A extração supercrítica baseia-se no poder de solvatação de fluidos no estado supercrítico, ou seja, quando a pressão e a temperatura estão acima de seu ponto crítico (SHARIF et al., 2014).

No estado supercrítico, o poder de solvatação dos fluidos pode ser manipulado por mudanças na pressão e/ou temperatura do processo, possibilitando uma alta seletividade dos compostos a serem extraídos (VIGANÓ et al., 2016).

O dióxido de carbono (CO₂) é amplamente utilizado na extração com fluido supercrítico por apresentar baixa pressão e temperatura crítica, pela facilidade de remoção de solvente residual (pela redução de pressão) e pelo fato de não apresentar toxicidade e não ser inflamável (KLEIN et al., 2018).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Extratos de folhas de uvaia

As folhas de uvaia foram coletadas em uma propriedade particular em Marechal Cândido Rondon, identificadas e registradas pelo herbário da Unioeste (UNOP-UNIOESTE) sob o número 2614. Elas foram secas em temperatura ambiente por sete dias e trituradas em liquidificador doméstico. Após, foram separadas por peneiramento, sendo utilizadas as partículas resultantes de 20/28 mesh. O material obtido foi submetido a dois tipos de extrações: extração com CO₂ supercrítico (pressão de 150 bar e temperatura de 50 °C) e extração assistida por ultrassom (potência 50%, razão massa/solvente 1:15 g/mL e temperatura de 50 °C) utilizando n-hexano como solvente, cedido gentilmente pelo Departamento de Engenharia Química da Unioeste de Toledo - PR.

Ambas as extrações resultaram em uma pequena quantidade de pó, as quais foram misturadas à DMSO (Dimetilsulfóxido) para utilização nos demais testes, sendo para o extrato obtido por CO₂ diluído em DMSO 100% (40 mg/mL) e para o extrato obtido por ultrassom diluído em DMSO 50% (9 mg/mL), com água destilada e DMSO. Na Figura 1, mostra-se o aspecto dos extratos da folha de uvaia, após as extrações.

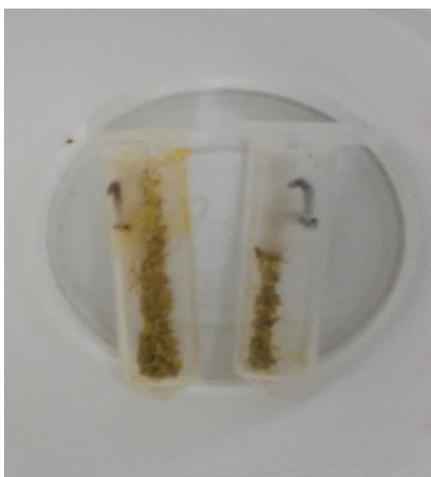


Figura 1 Aspecto do extrato obtido por CO₂ supercrítico (1) e assistido por ultrassom (2)

2. Atividade antioxidante – método DPPH

Para testar a capacidade antioxidante dos extratos, foi utilizado o ensaio DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), empregando a técnica, segundo Arasu et al. (2014).

O DPPH funciona como doador de elétrons, e a substância em teste, tendo poder antioxidante, recebe o elétron fornecido. Foi utilizado, como controle positivo, o α -tocoferol – vitamina E e, como controle negativo, DMSO + DPPH 0.1 mM. O α -tocoferol foi preparado com as mesmas concentrações dos extratos. Para o preparo dos extratos nos tubos (triplicata), foram pipetados os seguintes volumes a partir de uma solução de 2 mg/mL: 87,5 μ L (representando um total de 175 μ g de extrato), 75 μ L (representando um total de 150 μ g de extrato), 50 μ L (representando um total de 100 μ g de extrato), 25 μ L (representando um total de 50 μ g de extrato), 7,5 μ L (representando um total de 15 μ g de extrato), 5 μ L (representando um total de 10 μ g de extrato) e 2,5 μ L (representando um total de 5 μ g de extrato). Por fim, foi adicionado 1 mL da solução 0,1 mM de DPPH em todos os tubos (extratos e controles). Após uma incubação no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, foi realizada leitura em espectrofotômetro (517 nm). Para o branco, foi preparado o DMSO nas mesmas concentrações dos extratos. Os dados foram convertidos em porcentagem de radical scavenging pela fórmula:

$$= \left\{ 1 - \left(\frac{abs amostra - abs branco}{abs controle negativo} \right) \right\} \times 100$$

3. Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida sobre formas promastigotas e epimastigotas em meio de cultura

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram mantidas por meio de repiques semanais em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino a 10%, enquanto formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidas em meio LIT (liver infusion triptose) por repiques semanais. Elas foram submetidas na quantidade de 1×10^5 parasitas para a *Leishmania* e para o extrato 1 contra *T. cruzi*. Para o extrato 2, a quantidade submetida com epimastigotas foi de $2,5 \times 10^5$, em diferentes concentrações dos extratos (5, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 μ g/mL), durante 96 horas, após as quais foram contados em câmara de Neubauer. Somente o meio foi utilizado como controle, assim como meio mais DMSO (0,6%), para avaliar sua interferência. As diferentes concentrações dos compostos foram utilizadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas (CI50). O valor da CI50 foi determinado com base na porcentagem de inibição do

crescimento parasitário por meio de regressão não linear. Os fármacos padrão utilizados como controles positivos foram o Glucantime® 300 µg/mL (*L. amazonensis*) e o Benznidazol 50 µg/mL (*T. cruzi*), tendo sido ambos testados nas mesmas concentrações dos extratos para o cálculo de suas respectivas CI50.

4. Avaliação da atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas em meio de cultura

Formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidas por meio de repiques semanais em camundongos para manter a infectividade dos mesmos. Os parasitas foram coletados por punção cardíaca para a realização dos ensaios de atividade tripanocida. Neste ensaio, os parasitas (1×10^5 tripomastigotas/poço) foram incubados em placa de 96 poços, em triplicata, em meio de cultura LIT (liver infusion triptose), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina na presença dos compostos em diferentes concentrações (5, 10, 15, 50, 100, 150, 175 µg/mL). 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. As diferentes concentrações dos compostos foram utilizadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% a viabilidade dos parasitas (CL50). O valor da CL50 foi determinado com base na porcentagem de inibição da viabilidade parasitária por meio de regressão não linear. O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi o Benznidazol 50 µg/mL, tendo sido testado nas mesmas concentrações dos extratos para cálculo de sua CL50.

5. Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos

Para os experimentos de citotoxicidade, produção de NO, superóxido, peróxido de hidrogênio e fagocitose, foram utilizadas células obtidas de camundongos com 8 semanas de vida, mantidos em biotério com água *ad libitum* e ração comercial, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos adotados seguiram a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, com o projeto autorizado para realização pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unioeste. Os macrófagos peritoneais foram obtidos por meio da infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C na cavidade peritoneal dos camundongos. Esse PBS foi retirado com a própria agulha e seringa de inoculação e a suspensão resultante centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm)

por 06 minutos a 4 °C, sendo a seguir o “pellet” ressuspenso em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg/mL de gentamicina. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas nas concentrações específicas para cada experimento. Após a incubação por 2 horas, a 37 °C sob 5% de CO₂, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C e os macrófagos aderentes foram incubados na presença ou não dos extratos nas concentrações de 5, 10, 15, 50, 100, 150, 175 µg/mL.

6. Determinação da viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-metil-[4-5-48 dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) e dosagem de óxido nítrico (NO)

A determinação da citotoxicidade dos extratos foi realizada com o uso de MTT, segundo Reilly et al. (1998). Os macrófagos foram plaqueados a 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços, deixando-se aderir a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 2 horas. O meio de cultura foi retirado (100 µL) e adicionado em uma nova placa para a verificação da produção de óxido nítrico (NO). O volume restante foi removido e adicionado ao poço, com o meio de cultura contendo diferentes concentrações dos extratos e somente meio de cultura como controle negativo. Deixou-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida, o meio foi retirado e foram adicionados 200 µL de HBSS (solução balanceada de Hank) com MTT a 5 mg/mL, sendo incubado a 37 °C sob 5% de CO₂ por 3 horas. Após, foi removido o sobrenadante e o cristal de formazan formado foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido). Aguardaram-se então 10 minutos para a total solubilização dos cristais de formazan para ser realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm.

Já a detecção de NO foi verificada após 48 horas de incubação de 2×10^5 células pela dosagem de nitrito no sobrenadante, utilizando a reação de Griess, método baseado em Green et al. (1982), com LPS 1 µg/mL como controle positivo.

Para a realização da curva padrão e leitura do NO, prepararam-se 100 µL de uma curva de nitrito de sódio nas concentrações de 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM e 100 µM em uma placa, em triplicata, e, em seguida, adicionaram-se mais 100 µL de reagente de Griess.

7. Produção de ânion superóxido

A produção pelos macrófagos do ânion superóxido foi realizada conforme Bonatto et al. (2012), a partir de 2×10^5 células em uma placa de 96 poços. Após 48 horas de incubação com os extratos e os controles, em cada poço adicionou-se Solução para Ânion Superóxido (0,02% NBT e PMA $1 \mu\text{g/mL}$ ou $0,162 \mu\text{M}$ em PBS), sendo incubado por 1 hora, realizando-se leitura em espectrofotômetro a 550 nm, com os resultados sendo avaliados como % em relação ao controle negativo, assumindo este a condição de 100%.

8. Produção de peróxido de hidrogênio

A produção pelos macrófagos de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme Pick and Keisari (1980), com algumas modificações. Foram inseridas 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços. Após a aderência dos macrófagos, foi retirado o meio de cultura e cada poço foi lavado 1 vez com PBS estéril. As diluições dos extratos, o meio RPMI e os controles (LPS/DMSO) foram adicionados e incubados na estufa de CO_2 por 48 horas. Após o tempo de incubação, cada poço foi lavado 1 vez com PBS estéril e foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da solução para H_2O_2 (Solução para peróxido de hidrogênio – glicose $0,01 \text{ g}$ + vermelho de fenol $0,002 \text{ g}$ + peroxidase $0,0010 \text{ g}$ + PBS estéril 10 mL) em todos os poços e $12,3 \mu\text{L}$ de PMA ($0,1 \mu\text{g/mL}$) somente em metade dos poços, o que foi seguido de uma incubação de 30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 no escuro. Foram adicionados $100 \mu\text{L}$ das concentrações dos extratos e da curva em triplicata em uma placa de 96 poços. O branco foi só a solução padrão de peróxido de hidrogênio 30% 10 mM . Para revelação, $10 \mu\text{L}$ de NaOH 1M foram pipetados em todos os poços (testes, controles e curva). Foi realizada a leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro 610 nm , e foram calculadas as concentrações a partir da curva.

9. Fagocitose

Para avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos expostos aos extratos, foi utilizada a técnica descrita por Bonatto et al. (2012). Após a obtenção dos macrófagos, foram transferidos 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços. Após a aderência dos macrófagos, foi retirado o meio de cultura e cada poço foi lavado 1 vez com PBS estéril. As diluições dos extratos, o meio RPMI e os controles (LPS/DMSO) foram

adicionados e incubados na estufa de CO₂ por 48 horas. Após, foram adicionados 100 µL de uma solução contendo Zimosan 0,02 g + vermelho neutro 0,3 mL + 3 mL de PBS estéril, ajustada em $2,3 \times 10^6$ partículas/poço (10 partículas por célula), sendo incubados por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. Após isso, cada poço foi lavado com PBS (mais de uma vez se necessário) e foram adicionados 100 µL de fixador de Baker. Seguiu-se uma incubação de 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. Por último, foram pipetados 100 µL de solução de extração com posterior incubação de 30 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram avaliados como % em relação ao controle negativo, assumindo este a condição de 100%.

10. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) das médias, seguida pelo pós-teste de Tukey, onde um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados em três experimentos em triplicata, sendo representados pela média \pm erro padrão. Utilizamos para os cálculos o programa GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da capacidade antioxidante

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antiga, tendo sido sugerido originalmente em 1950 para descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde, foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos, tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura, absorvendo a um comprimento de onda máximo de, aproximadamente, 516 nm (MONIRUZZAMAN et al., 2012).

A Tabela 1 mostra o resultado do teste de DPPH realizado com os extratos de *E. pyrifomis*. Observando os extratos com seus respectivos controles, verificamos que, conforme a concentração do extrato aumentava, a porcentagem da atividade antioxidante acompanhou tal aumento, o que é demonstrado pelos crescentes valores da porcentagem.

Verifica-se também que o controle positivo apresentou valores maiores a partir da concentração de 10 µg/mL, para o extrato 1, e desde a primeira concentração, para o extrato 2. Através de análise estatística por meio da variância, tanto o extrato 1 quanto o extrato 2 não tiveram significância estatística entre o controle positivo e sua respectiva concentração no extrato, demonstrando a sua capacidade antioxidante.

Tabela 1 Porcentagem da atividade antioxidante com desvio padrão (método DPPH) dos extratos obtidos de *E. pyriformis* por CO₂ supercrítico (E1) e assistido por ultrassom (E2). O controle positivo foi realizado com Vitamina E (α -tocoferol).

CONCENTRAÇÃO	AMOSTRAS E1 (% AA*)	CONTROLE + (% AA)	AMOSTRAS E2 (% AA)	CONTROLE + (% AA)
5 $\mu\text{g/mL}$	12,27 \pm 3,41	12,73 \pm 3,45	9,45 \pm 2,13	12,04 \pm 2,21
10 $\mu\text{g/mL}$	16,02 \pm 0,81	20,34 \pm 3,16	10,52 \pm 3,52	14,45 \pm 2,06
15 $\mu\text{g/mL}$	17,99 \pm 3,17	24,85 \pm 2,38	11,79 \pm 2,22	21,86 \pm 1,40
50 $\mu\text{g/mL}$	22,81 \pm 0,83	27,34 \pm 0,64	18,57 \pm 2,28	23,49 \pm 1,89
100 $\mu\text{g/mL}$	25,73 \pm 3,21	33,69 \pm 3,66	21,76 \pm 2,73	26,17 \pm 0,12
150 $\mu\text{g/mL}$	27,60 \pm 3,31	37,30 \pm 3,88	22,01 \pm 2,34	28,63 \pm 3,22
175 $\mu\text{g/mL}$	28,37 \pm 3,07	38,06 \pm 0,53	23,91 \pm 1,70	32,29 \pm 2,24

*AA – atividade antioxidante

As amirinas têm demonstrado atividade antioxidante, onde, os triterpenos α e β -amirina apresentam alta atividade (CARDOSO et al., 2018). O potencial da capacidade antioxidante e antiviral de biomarcadores, incluindo a β -amirina, mostra a eficácia por meio da redução do stress oxidativo das moléculas (PARVEZ et al., 2018).

Inoue et al. (2017) avaliaram a distribuição de vitamina E em 81 plantas de 39 famílias, incluindo as mirtáceas, e observaram que as folhas dessas espécies contêm de 14,5 a 19,6 μg α -tocoferol/g de material seco.

Klein et al. (2018) avaliaram a composição química de extratos de *Eugenia pyriformis* extraídos por fluido supercrítico, por meio da porcentagem da área normalizada, que indica a distribuição relativa dos compostos na amostra por cromatografia gasosa (CG). Uma das principais substâncias detectadas por esse método foi a vitamina E, com 1,92% de área relativa na CG.

Sendo assim, considera-se a presença de pequenas quantidades de vitamina E nos extratos como contribuinte para esta característica antioxidante.

Victoria et al. (2012) mostraram que o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora*, do mesmo gênero da *Eugenia pyriformis*, obteve atividade antioxidante em três diferentes ensaios: método DPPH, inibição do radical 20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico) - ABTS e capacidade de redução antioxidante do íon férrico – FRAP.

Avaliação da atividade leishmanicida

De acordo com a Figura 2.a, no extrato obtido com CO₂ supercrítico (extrato 1), verificou-se uma pequena diminuição na quantidade parasitária nas concentrações testadas.

Na comparação pelo pós-teste de Tukey, onde se avaliaram as médias entre os tratamentos e os controles, foi observado que houve diferença estatística entre o controle negativo (MEIO) e todas as concentrações testadas, exceto a de 10 µg/mL, na leitura com 96 horas. O controle positivo (GLU) não apresentou significância quando comparado com o extrato nas concentrações de 5, 150 e 175 µg/mL, demonstrando a sua eficácia após o período de leitura. A menor média de promastigotas apresentada entre as concentrações testadas foi a de 150 µg/mL, com o valor de $22,3 \times 10^4$ parasitas/mL, na última leitura.

Eugenia uniflora, outra espécie do mesmo gênero de *E. pyriformis*, foi rastreada para a atividade antileishmanial a partir do extrato etanólico das suas folhas, que foi marginalmente ativo contra promastigotas de *L. braziliensis* (65% de inibição a 100 µg/mL), mas inativo contra *L. amazonensis* ou *L. chagasi* (MONZOTE; PIÑÓN; SETZER, 2014), demonstrando, assim, a capacidade inibitória do extrato testado.

Para o extrato obtido por extração assistida por ultrassom (extrato 2), verifica-se uma diminuição gradual da carga parasitária após leitura em 96 horas, como mostra a Figura 2.b. Observamos que o MEIO apresentou diferença estatística quando comparado com todas as concentrações do extrato e o controle positivo. As maiores concentrações, de 150 e 175 µg/mL, assim como no extrato 1, não apresentaram significância estatística com o controle positivo, demonstrando sua atividade compatível com o Glucantime®. Neste caso, a menor média de parasitas contados foi de $19,1 \times 10^4$ promastigotas/mL para a concentração de 175 µg/mL, no quarto dia de leitura.

O valor de CI₅₀ para o extrato 1, contra promastigotas de *L. amazonensis*, foi de 3.15 µg/mL e, para o extrato 2, foi de 12.39 µg/mL. Ao testar o controle positivo, foi obtido um CI₅₀ = 20.47 µg/mL. Isso mostra que há uma alta atividade dos extratos com relação ao Glucantime®.

Extratos obtidos de raízes contendo frações enriquecidas com terpenoides apresentaram inibição significativa no crescimento de promastigotas de *L. donovani*, apresentando um CI₅₀ = 18.75 µg/mL (BHATTACHARYA; BISWAS; HALDAR, 2013).

Na análise de variância (ANOVA) das médias, houve diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$), tanto nas leituras de 24, 48, 72 e 96 horas para os extratos 1 e 2.

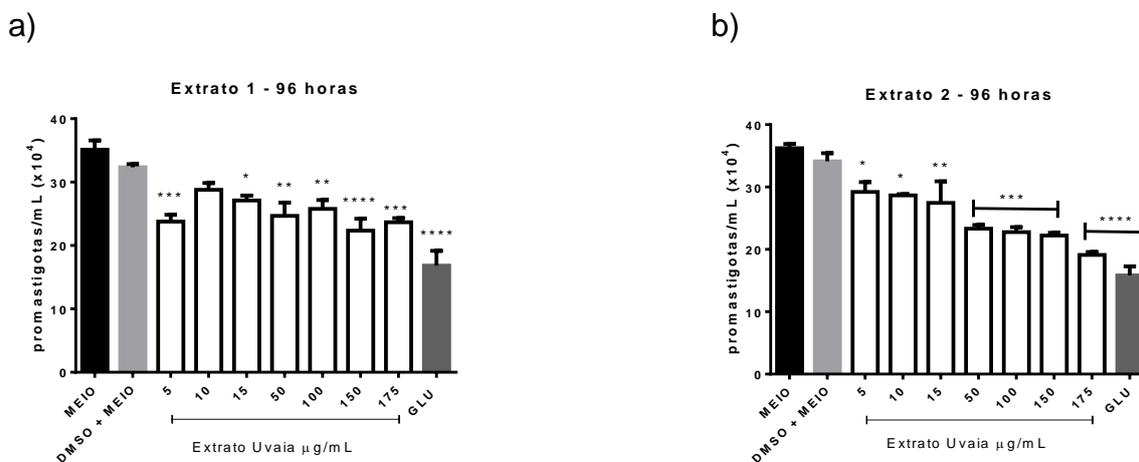


Figura 2 Atividade leishmanicida dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 96 horas. GLU – Glucantime (300 µg/mL). *, **, *** e **** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao meio.

Para alguns metabólitos, diferentes plantas, solventes e métodos são usados, fornecendo resultados diferentes, mesmo quando o processo de extração é o mesmo. Em alguns casos, a atividade dos extratos é notável, embora geralmente não tão bem sucedida como os compostos isolados (SCOTTIA et al., 2016).

O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* apresentou boa atividade antileishmanial contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, mas o óleo essencial da casca de *E. uniflora* foi inativo contra promastigotas de *L. donovani*. Os extratos hexânicos e metanólicos de *E. umbelliflora* foram leishmanicidas para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. (MONZOTE; PIÑÓN; SETZER, 2014).

Em um estudo, foram testados 115 extratos, tais como de *E. monteverdensis*, *E. umbelliflora*, *E. uniflora* e *Eugenia sp.*, dos quais 85 foram inativos ou inespecíficos, o que constitui 74% das amostras testadas, reforçando a necessidade de selecionar grandes séries de produtos naturais para encontrar aqueles promissores (MONZOTE; PIÑÓN; SETZER, 2014).

Avaliação da atividade tripanocida

Com relação à atividade tripanocida sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* do extrato 1, verifica-se, por meio da Figura 3.a, que as quantidades de parasitas

mostram uma queda na contagem ao longo dos dias. Nota-se que o controle negativo (MEIO) e o branco (DMSO) apresentaram diferença significativa quando comparados com todas as concentrações do extrato e o controle positivo (BENZ). A concentração de 15 µg/mL foi a que apresentou a menor média de contagem em 96 horas de exposição ao extrato, com $19,3 \times 10^4$ parasitas.

Com base em análises preliminares por cromatografia em camada fina, que revelou a presença de terpenoides voláteis, e posterior análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, as principais substâncias presentes nos extratos foram a α -amirina e β -amirina (KLEIN et al., 2018), sendo descritas anteriormente como agentes antiprotozoários (GARCIA et al., 2017).

Para o extrato 2, verifica-se, pela Figura 3.b, que as contagens dos parasitas tiveram uma leve queda a partir da concentração de 10 µg/mL até a concentração de 50 µg/mL, porém, estatisticamente, por meio da análise do pós-teste de Tukey, não obtiveram diferença em relação ao meio. As concentrações seguintes, juntamente com a de 5 µg/mL, obtiveram valores próximos aos controles negativo e branco. A concentração que apresentou menor média de contagem foi a de 10 µg/mL com 206×10^4 parasitas.

Para o extrato 1, o CI50 foi de 38.67 µg/mL contra epimastigotas de *T. cruzi* e, para o extrato 2, foi igual a 4.24 µg/mL. Ao testar o controle positivo Benznidazol, foi obtido um CI50 = 3.13 µg/mL.

Na análise de variância (ANOVA) das médias, houve diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$), tanto nas leituras de 24, 48, 72 e 96 horas para os extratos 1 e 2.

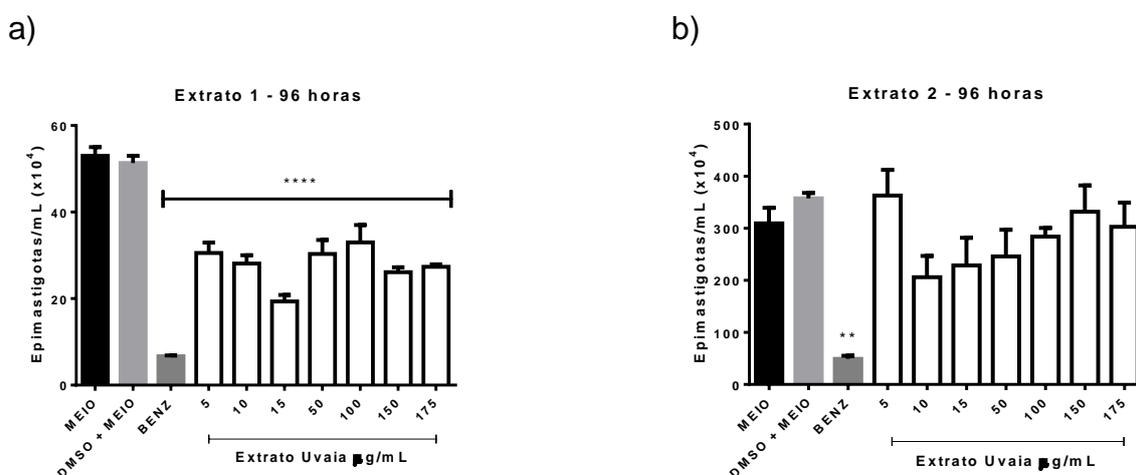


Figura 3 Atividade tripanocida sobre formas epimastigotas dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 96 horas. BENZ – Benznidazol (50 µg/mL). ** e **** significam $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao meio.

Estudos mostram que folhas de algumas plantas contêm metabólitos, tais como alcaloides e triterpenos, além de outros compostos. Esses compostos se apresentam como potenciais candidatos para avaliação toxicológica, apoiados por testes *in vitro*, que podem servir como modelos para síntese de drogas (MWANGI et al., 2010).

Estudos já realizados com extratos de *Eugenia pyriformis* demonstram que estes apresentam diversos metabólitos secundários, sendo um representante deles os triterpenos. Os terpenos são compostos que têm despertado atenção por apresentarem atividades biológicas significativas, como, por exemplo, atividades antiparasitárias, as quais são desenvolvidas por mecanismos de interação com a membrana celular (ISAH et al., 2016).

Também foi testada atividade tripanocida dos extratos de *E. pyriformis* nas formas infectantes do *T. cruzi*, podendo-se verificar a ação sobre formas tripomastigotas do extrato 1 na Figura 4.a. Após a leitura em 48 horas, o MEIO apresentou diferença estatística com o controle positivo e com as concentrações de 50 e 175 µg/mL. O Benznidazol não apresentou significância estatística somente quando comparado com a concentração de 50 µg/mL, mostrando a eficácia deste diante do parasita, após leitura em dois dias.

A média da contagem de tripomastigotas para o controle positivo foi de $2,5 \times 10^4$, já a concentração mais eficaz citada chegou a uma média de $5,7 \times 10^4$ parasitas.

Esse extrato obteve um valor de CL50 igual a 16.62 µg/mL em 24 horas, exibindo uma atividade moderada contra as cepas de tripomastigotas de *T. cruzi*, quando comparado com o controle positivo Benznidazol (CL50 = 7.26 µg/mL).

Alguns compostos, incluindo a α -amirina, exibiram baixa ou nenhuma atividade, com um valor de CI50 > 30 µg/mL, quando comparado ao Benznidazol (CI50 = 0,51 µg/mL) contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MWANGI et al., 2010).

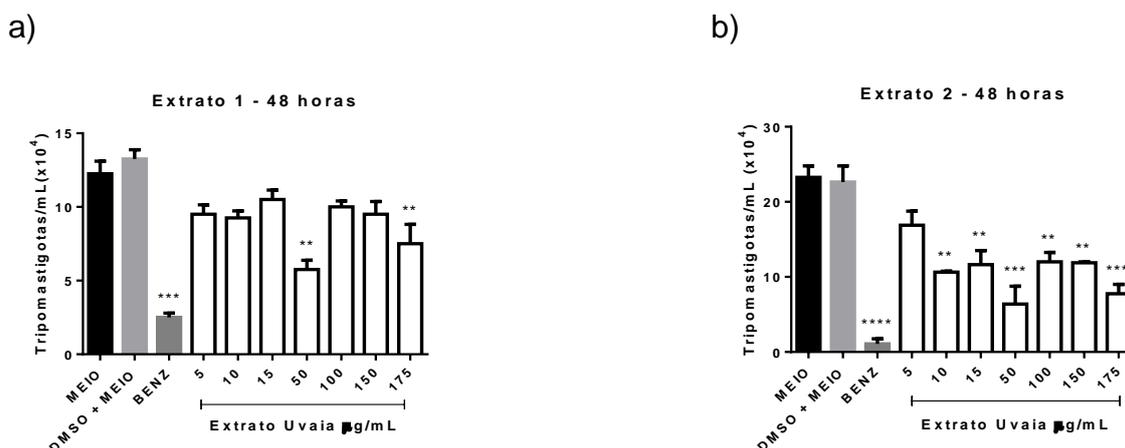


Figura 4 Atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas dos extratos de *E. pyriformis* obtidos por CO₂ supercrítico (a) e obtidos por ultrassom assistido (b), após 48 horas. BENZ – Benznidazol (50 µg/mL). **, *** e **** significam p<0,01, p<0,001 e p<0,0001, respectivamente, em relação ao meio.

Para o extrato 2, foi verificada uma diferença estatística quando comparado o controle negativo com todas as concentrações dos extratos, exceto com a concentração de 5 µg/mL, após leitura em 48 horas. Já o Benznidazol não apresentou significância estatística com as concentrações de 50 e 175 µg/mL, atingindo boa atividade perante o parasita. Neste caso, a média da contagem dos parasitas para o controle positivo foi de $1,07 \times 10^4$ tripomastigotas/mL, já as concentrações dos extratos citadas atingiram média de 6,3 e $7,7 \times 10^4$ parasitas, respectivamente.

Para esse extrato, o valor de CL50 foi de 6,23 µg/mL, apresentando também uma atividade moderada diante de tripomastigotas de *T. cruzi*.

Cunha et al. (2009) avaliaram 20 extratos brutos de 10 diferentes plantas do Cerrado brasileiro, incluindo vegetais da família das Myrtaceae (*Myrcia variabilis*), contra tripomastigotas de *T. cruzi*. O extrato etanólico da planta apresentou um CI50 = 30.5 µg/mL e o controle positivo (violeta de genciana) apresentou CI50 de 31 µg/mL. Extratos que mostraram CI50 < 100 µg/mL foram considerados ativos.

Na análise de variância (ANOVA) das médias, houve diferença estatística entre as médias (p<0,05), tanto nas leituras de 24 como nas de 48 horas para os extratos 1 e 2.

Determinação da viabilidade celular

Com relação à citotoxicidade dos extratos de uvaia, pode ser observado, na Figura 5, que o extrato 1 não demonstra toxicidade até a concentração de 100 µg/mL; porém, a partir da concentração de 150 µg/mL, há um decréscimo acentuado na viabilidade celular dos macrófagos, com uma taxa próxima dos 30%, indicando a não

utilização desse extrato em células mamíferas em concentrações maiores. Não houve diferença entre o meio e o controle DMSO, mostrando não haver influência do diluente nesta avaliação.

Vários autores avaliaram o potencial de novos compostos, utilizando o índice de seletividade (IS), que é calculado como a razão entre a concentração citotóxica de 50% (CC50) para células e a concentração inibitória de 50% (CI50) para amastigotas e/ou promastigotas. Um composto natural é considerado seguro quando o $IS \geq 10$ (ORYAN, 2015).

Além disso, é importante realizar testes de toxicidade em macrófagos, não apenas para determinar o IS, mas também porque os parasitas de *Leishmania* habitam essas células (WALKER et al., 2014).

O valor de CC50 para esse extrato foi de 52.7 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos murinos, com um IS de 16.73 contra promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando segurança nas doses de até 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, o IS foi de 1.40 para a primeira forma e 3.17 para a segunda.

Na análise de variância (ANOVA) das médias, houve diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

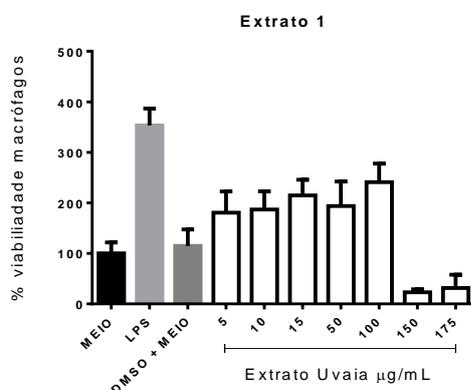


Figura 5 Viabilidade celular de macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido com CO_2 supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$).

Nos ensaios com o extrato 2 (Figura 6), é possível perceber que o controle DMSO apresentou uma média de viabilidade próxima aos mesmos 100% do controle negativo (MEIO), mostrando não interferência no estudo. Todas as concentrações do extrato obtido por ultrassom assistido de *E. pyriformis* mostraram-se não tóxicas para os macrófagos utilizados neste experimento, com taxas de viabilidade próximas a 100% do controle negativo (meio).

O extrato 2 apresentou CC50 > 500 µg/mL com um IS > 40.36 para promastigotas de *Leishmania*, demonstrando segurança em todas as doses testadas.

Lima et al. (2015) demonstraram a atividade leishmanicida de um diterpeno contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com um IS de 625.0, demonstrando que essa molécula não causou efeitos citotóxicos nos macrófagos e foi altamente seletiva para o parasita.

Para as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, o IS foi > 117.92 para a primeira forma e > 80.25 para a segunda.

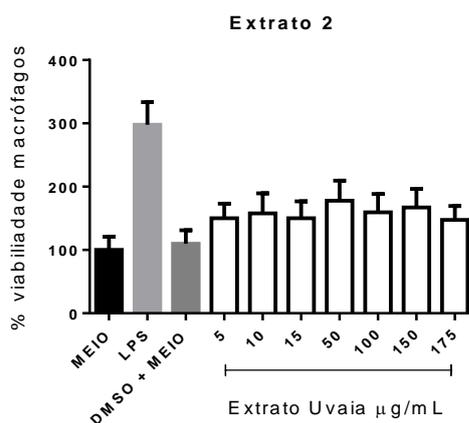


Figura 6 Viabilidade celular de macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

A viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com Hexano, diclorometano/etanol e acetato de etila, utilizando DMSO para as diluições dos extratos de *C. sinensis*, e com uma concentração de dimetilsulfóxido que não excedesse 0,5%, não foi ativa contra os parasitas. Observa-se uma atividade dose-dependente para os extratos com Hexano, diclorometano/etanol e acetato de etila (GARCIA et al., 2017).

A citotoxicidade de extratos de *E. pyriformis* já foi testada anteriormente em ensaios de letalidade com *Artemia salina*, também utilizando extratos das folhas de uvaia, mostrando não apresentar características citotóxicas em altas concentrações (SILVA et al., 2016).

Avaliação do estímulo à produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é excretado em altas concentrações por macrófagos como parte de seu mecanismo de toxicidade para microrganismos. Em humanos, a atividade microbicida do óxido nítrico liberado por macrófagos é induzida por

lipopolissacarídeos (LPS) e por algumas citocinas como interferon (IFN- γ). Ele também é gerado depois da ativação do macrófago por IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF), e é mais eficiente na morte dos amastigotas intracelulares da *Leishmania*, sendo seu principal agente na eliminação (DE SALDANHA et al., 2012).

A Figura 7 mostra os dados da produção de NO por macrófagos murinos estimulados pelo extrato 1, onde as concentrações de 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$, por apresentarem toxicidade no teste de viabilidade, não foram consideradas.

Ao compararmos o controle negativo (MEIO), por meio do pós-teste de Tukey, identificamos que há diferença estatística com todas as concentrações, exceto com o controle branco (DMSO). Diante disso, as concentrações dos extratos são capazes de estimular a produção de quantidades significativas de óxido nítrico pelos macrófagos.

Para o extrato, na análise de variância entre as médias, houve diferença estatística significativa entre elas. A concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi a que apresentou a maior média de produção de NO, sendo de 2,57 μM , valor próximo ao do controle positivo (LPS), que foi de 2,64 μM .

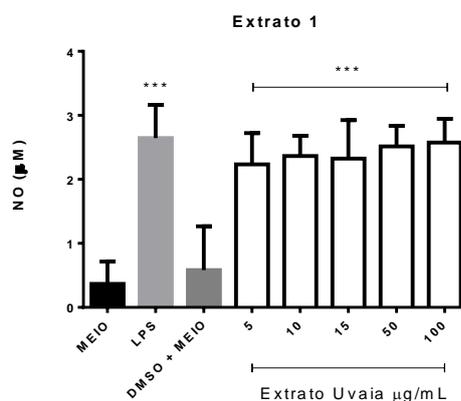


Figura 7 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO₂ supercrítico - extrato 1. *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$).

Na análise do extrato 2 (Figura 8), ao compararmos o controle negativo (MEIO), por meio do pós-teste de Tukey, identificamos que há diferença com o controle positivo (LPS) e as concentrações de 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$. Já o LPS não apresentou significância estatística com as concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando que estas são capazes de estimular a produção de quantidades significativas de óxido nítrico pelos macrófagos, comparáveis aos níveis do controle positivo.

Para o extrato, na análise de variância entre as médias, houve diferença estatística significativa entre elas. A concentração de 175 $\mu\text{g/mL}$ foi a que apresentou

a maior média de produção de NO, sendo de 8,50 μM , próximo à média do LPS, que foi de 8,66 μM .

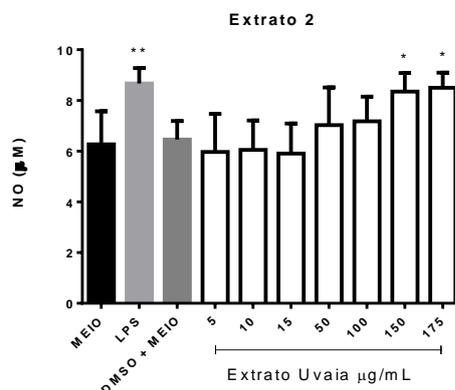


Figura 8 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. * e ** significam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$).

Frankenberger et al. (2018) mostraram que algumas frações com diferentes metabólitos, incluindo triterpenos pentacíclicos relacionados a α e β -amirina, apesar de apresentarem diferente efeito citotóxico, igualmente mostraram forte inibição de NO e TNF- α , independentemente da sua composição diferente.

Sendo assim, os constituintes do extrato testado neste estudo apresentam um melhor estímulo ao macrófago para produção de NO, com exceção das concentrações consideradas tóxicas.

Avaliação do estímulo à produção do ânion superóxido

Durante o primeiro estágio da infecção, são produzidos ânions superóxidos como parte da explosão respiratória em macrófagos de camundongos em resposta à fagocitose. Promastigotas de *Leishmania* são susceptíveis à exposição ao superóxido e a radicais hidroxila gerados pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PAPA, 2007).

De acordo com a Figura 9, os macrófagos tratados com o extrato 1 mostraram capacidade na produção de superóxido. As concentrações de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram um crescente na média das porcentagens de produção do ânion, chegando a 118% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, adotando-se o meio como 100%. Esta foi a única das concentrações que obteve significância estatística, quando comparado com o controle negativo, feito pelo pós-teste de Tukey.

O controle positivo (LPS) não apresentou diferença estatística para essas mesmas concentrações, demonstrando a capacidade de estimular a produção do ânion superóxido pelos macrófagos. Observa-se uma diminuição na produção do ânion superóxido nas concentrações de 150 e 175 µg/mL, o que pode ser explicado pela toxicidade dessas concentrações, demonstrada na Figura 5.

Através de uma avaliação por meio de análise por variância (ANOVA), há diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

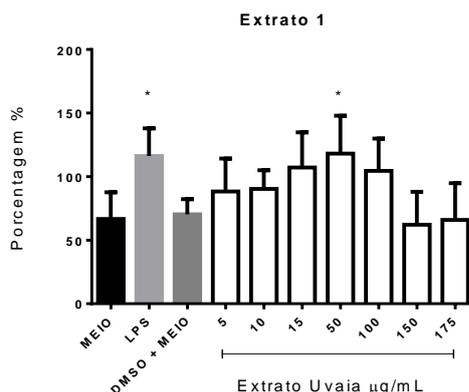


Figura 9 Produção do ânion superóxido por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO₂ supercrítico - extrato 1. * significa $p < 0,05$ em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

Por meio da avaliação da produção de superóxido por macrófagos tratados com o extrato 2, pela Figura 10, verificou-se que eles apresentaram maiores níveis de superóxido, quando comparados com os controles.

Já o pós-teste de Tukey apresentou significância com as concentrações de 5 e 10 µg/mL, quando comparadas com o controle negativo (MEIO) e com o branco (DMSO). As concentrações citadas apresentaram uma porcentagem média de 124% e 125,3%, respectivamente. Quando elas são comparadas com a média de produção do controle positivo (99,31%), apresentam significância estatística, demonstrando uma boa capacidade de estímulo da produção do ânion superóxido pelos macrófagos.

A análise estatística por meio da variância (ANOVA) das médias demonstrou que há diferença estatística entre elas ($p < 0,05$).

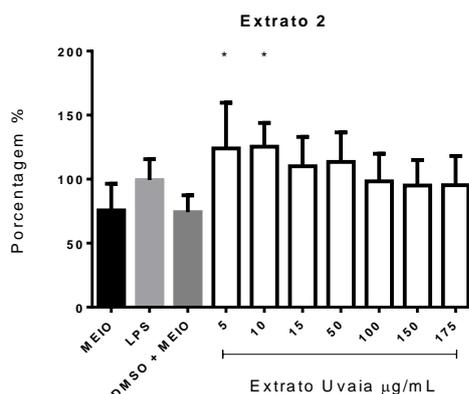


Figura 10 Produção do ânion superóxido por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. * significa $p < 0,05$ em relação ao meio. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

Avaliação do estímulo à produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos foi avaliada pelo método espectrofotométrico, baseado na oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase, comparando-se a produção dos macrófagos tratados com os extratos com aqueles tratados com o lipopolissacarídeo (LPS).

De acordo com a Figura 11, os macrófagos tratados com o extrato 1 obtiveram uma menor produção quando comparados com os controles. As concentrações de 15 e 150 µg/mL foram as que obtiveram os menores valores, apresentando diferença estatística com o controle negativo (meio), por meio do pós-teste de Tukey.

Através de uma avaliação por meio de análise por variância (ANOVA), há diferença estatística entre as médias.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido (O_2^-) ou é produzido por enzimas oxidases e pela oxidação de ácidos graxos (ALVES et al., 2010).

Alguns métodos mostram que há a necessidade de checar se a substância teste não funciona como substrato para a peroxidase, o que pode decrescer a fluorescência. O radical superóxido pode inibir a peroxidase e comprometer a medida de H_2O_2 em sistemas geradores de O_2^- (HALLIWELL, 1995).

Sendo assim, o extrato testado pode inibir a peroxidase, prejudicando a avaliação da produção de H_2O_2 .

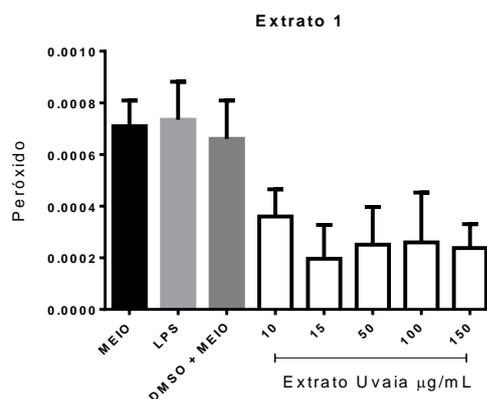


Figura 11 Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO₂ supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

Um aumento na produção de peróxido de hidrogênio nas células estimuladas por PMA foi verificado, o qual mostrou uma elevação de 80% na sua produção. Na avaliação feita com monócitos estimulados por LPS e PMA, também se observou um aumento na produção do peróxido de hidrogênio das células de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (PAPA, 2007).

Avaliação do estímulo à capacidade fagocítica

Esse teste avaliou a capacidade de macrófagos tratados com os extratos 1 e 2 de internalizar as partículas da solução de trabalho.

Deve ser considerado inicialmente o tipo de fagocitose que ocorre pelo fagócito em relação à *Leishmania*. Tem sido demonstrado que o parasita pode penetrar no fagócito por dois processos: um deles por fagocitose por enrolamento (*coiling* fagocitose) e o outro por fagocitose ativa. A primeira pode resultar em localização citoplasmática do parasita e, na segunda, o parasita ingerido se localiza dentro do vacúolo fagocítico (DE SALDANHA et al., 2012).

De acordo com a Figura 12, verificou-se que o extrato 1 obteve um comportamento semelhante nas concentrações testadas com relação aos seus controles. Observa-se que o controle negativo (MEIO) obteve a produção esperada próxima a 100%, valor próximo ao da concentração de 150 µg/mL. O LPS obteve uma produção de 107%.

Na análise das médias por ANOVA, houve diferença significativa.

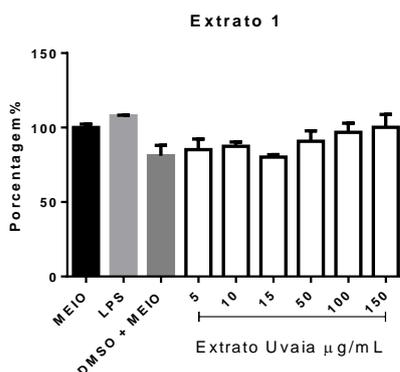


Figura 12 Atividade fagocítica de macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por CO₂ supercrítico - extrato 1. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

Com relação à avaliação da fagocitose, por método espectrofotométrico, de macrófagos tratados com o extrato 2, verifica-se, por meio da Figura 13, que nem o controle positivo (LPS), tampouco as concentrações do extrato apresentaram diferença estatística com os controles negativo e branco (DMSO) por meio do pós-teste de Tukey. O MEIO apresentou a produção esperada de 100%.

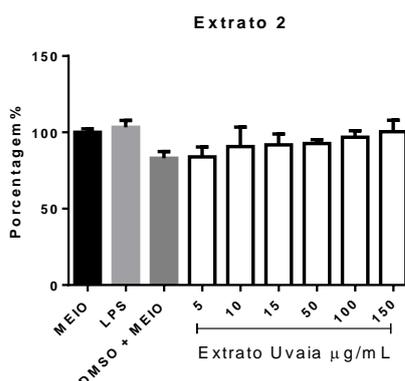


Figura 13 Atividade fagocítica de macrófagos tratados com extrato de *Eugenia pyriformis* obtido por extração assistida por ultrassom - extrato 2. LPS – Lipopolissacarídeo (1 µg/mL).

Teles et al. (2011) e Torres-Santos et al. (2004) estudaram a ação dos triterpenos isolados sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos e mostraram que eles foram capazes de promover ação antileishmania, porém com inibição da atividade fagocítica dos macrófagos, o que lhes permitiu afirmar que a ação do extrato sobre as formas amastigotas era uma ação direta, e não com o reforço sobre o mecanismo da fagocitose.

Outro estudo demonstra que os triterpenos estimulam a granulocitose e a fagocitose, auxiliando no combate à infecção (AKIHISA et al., 1996). Porém, mesmo com essas informações, até mesmo o mecanismo de ação pelo qual os triterpenos

inibem o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania spp* ainda não foi totalmente elucidado (LIMA et al., 2011).

Quantificação e avaliação da α e β -amirina

Klein et al. (2018) revelaram resultados de teores bastante elevados de amirinas nos extratos de uvaia utilizados neste trabalho. As concentrações foram determinadas, usando Cromatografia Líquida (HPLC), com metanol como fase móvel. Para o extrato obtido por fluido supercrítico (extrato 1), foram detectados $17,09 \pm 0,27\%$ de α -amirina e $54,58 \pm 0,09\%$ de β -amirina, sendo o desvio padrão de três replicatas. Para o extrato obtido por ultrassom (extrato 2), foram detectados $14,31 \pm 0,36\%$ de α -amirina e $62,72 \pm 0,50\%$ de β -amirina. Nas Figuras 14.a e 14.b, constam os cromatogramas de HPLC para os extratos 1 e 2, respectivamente.

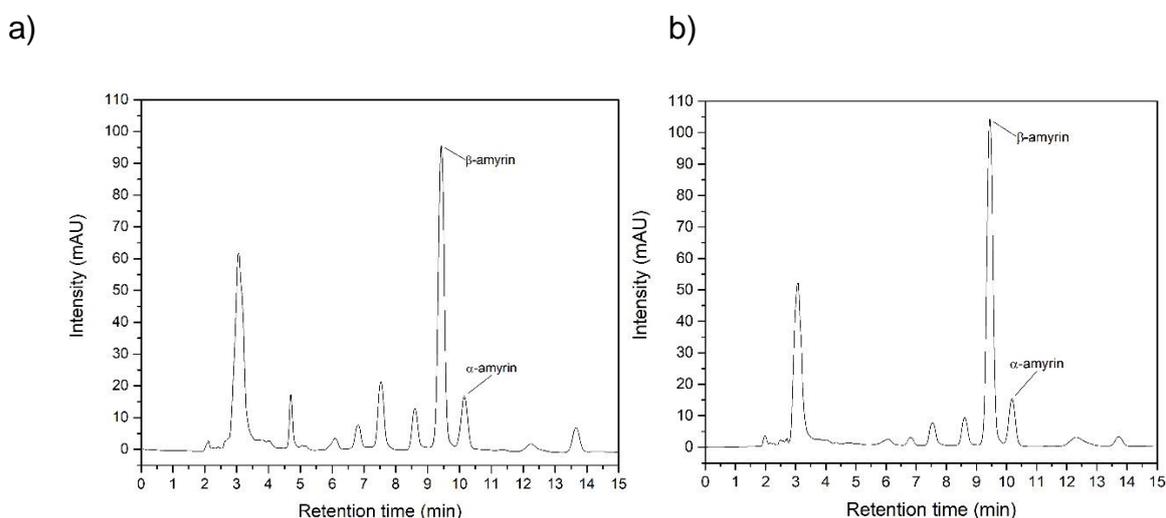


Figura 14 Cromatograma dos padrões de α e β -amirina dos extratos 1 (a) e 2 (b).

Em relação à atividade tripanocida, estudos prévios mostraram que compostos puros, incluindo a α e β -amirina, são inativos (DA SILVA FILHO et al., 2004; FOURNET et al., 1992); entretanto, de acordo com dados da literatura (CREVELIN et al., 2006; GAERTNER et al., 1999; OTUKI et al., 2005), algumas misturas de triterpenos podem apresentar melhores atividades biológicas do que seus compostos isolados.

Algumas frações, com diversos metabólitos, testadas por Frankenberger et al. (2018), revelaram efeito antiparasitário interessante sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e tripomastigotas de *T. cruzi*. As atividades antiparasitárias das frações foram melhores que as dos triterpenos semissintéticos (preparados a partir de

três diferentes reações de oxidação da α -amirina) e α -amirina. Este resultado posterior sugeriu uma contribuição sinérgica dos constituintes da fração.

Resultados apresentados por Otuki et al. (2005) mostram que a mistura dos triterpenos α e β -amirina, administrados sistematicamente, nas vias espinhal e supraespinhal em camundongos, produz antinocicepção pronunciada e dose relacionada. Além disso, este efeito parece estar relacionado com sua capacidade de interferir nas vias da Proteína quinase C e A.

Resultados com relação à capacidade antioxidante são relevantes para ampliar o conhecimento sobre a flora brasileira e prospectar moléculas de interesse químico para as possíveis aplicações diferenciadas nos setores farmacêutico, estético, alimentar e agrícola (CARDOSO et al., 2018).

CONCLUSÕES

Ao avaliar a ação da atividade tripanocida e leishmanicida de extratos de *Eugenia pyriformis*, foi possível verificar seu potencial *in vitro* na ação contra os parasitas.

Para a *Leishmania amazonensis*, na forma promastigota, tanto o extrato obtido por fluido supercrítico quanto o assistido por ultrassom apresentaram atividade *in vitro* moderada, com relação ao medicamento padrão para tratamento. Também apresentaram segurança nas doses testadas para o extrato 2, e até a concentração de 100 µg/mL para o extrato 1.

Para o *Trypanosoma cruzi*, na sua forma infectante de tripomastigota, tivemos sua ação mais acentuada, apresentando também uma atividade *in vitro* moderada, quando comparada com o seu controle positivo (Benznidazol). O extrato 2 apresentou uma atividade mais acentuada, com segurança nas concentrações testadas.

As quantificações de α -amirina e β -amirina foram significativas em ambos os extratos, justificando sua capacidade antioxidante pela presença de traços de vitamina E em sua composição e como característica do metabólito secundário. A capacidade de produção de componentes que auxiliam no combate ao parasita foi detectada nos testes que mostraram eficácia dos extratos no auxílio da produção de óxido nítrico e superóxido.

Estudos revelam a capacidade da ação das amirinas, principalmente na sua ação conjunta, justificando a sua eficácia para estudos mais aprofundados para futuros testes *in vivo*, como uma alternativa terapêutica potencial para as patologias tratadas neste estudo, assim como alguma ação sobre macrófagos murinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIHISA, T. et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1255–1260, 1996.
- ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ARASU, M. V. et al. In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 1333–1346, 5 set. 2014.
- ASHOK, D.; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 10, p. 499–507, out. 2014.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BACON, K. M. et al. Vaccine in seven endemic countries in the Americas. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 480–486, 2014.
- BHATTACHARYA, S.; BISWAS, M.; HALDAR, P. The triterpenoid fraction from *Trichosanthes dioica* root exhibits in vitro antileishmanial effect against *Leishmania donovani* promastigotes. **Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 2, p. 109, 2013.
- BONATTO, S. J. R. et al. Fish oil supplementation improves neutrophil function during cancer chemotherapy. **Lipids**, v. 47, n. 4, p. 383–9, abr. 2012.
- CAL, M. et al. Assessing anti- *T. cruzi* candidates in vitro for sterile cidalty. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 165–170, 2016.
- CARDOSO, B. K. et al. **Antioxidant activity of α and β -amyrin isolated from *Myrcianthes pungens* leaves** *Natural Product Research*, 2018.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.
- CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Plant Extracts From Southern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, 2014.
- CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 8, p. 827–830, 2006.
- CUNHA, W. R. et al. Screening of plant extracts from the Brazilian Cerrado for their in vitro trypanocidal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 8, p. 744–749, 2009.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*.

Experimental and Molecular Pathology, v. 72, n. 2, p. 132–141, abr. 2002.

DA SILVA, B. J. M. et al. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of integrative medicine**, v. 16, n. 4, p. 211–222, 2018.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Tetrahydrofuran Lignans from *Nectandra megapotamica* with Trypanocidal Activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 42–45, 2004.

DANLAMI, J. M. et al. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605–626, 2014.

DE SALDANHA, R. R. et al. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 596–603, out. 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.

FOURNET, A. et al. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 159–164, 1992.

FRANKENBERGER, L. et al. UPLC-ESI-QTOF-MS 2 characterisation of *Cola nitida* resin fractions with inhibitory effects on NO and TNF- α released by LPS-activated J774 macrophage and on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 577–589, nov. 2018.

GAERTNER, M. et al. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 41–44, mar. 1999.

GARCIA, A. R. et al. Cytotoxicity and anti- *Leishmania amazonensis* activity of *Citrus sinensis* leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1780–1786, 2017.

GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [^{15}N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341–1348, maio 1995.

INOUE, T. et al. Distribution of Eight Vitamin E Homologs Found in 81 Plants Using LC-MS3. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 7, n. 6, 2017.

ISAH, M. B. et al. A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. **Parasitology**, v. 143, n. 10, p. 1219–1231, 2016.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 56, n. 3, p. 197–213, 2008.

KLEIN, E. J. et al. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to

obtain A/B-amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 1–8, 2018.

LIMA, G. S. et al. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1133–1137, 2015.

LIMA, É. R. DE et al. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. v. 3, n. 1, p. 53–69, 2011.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.

MOLINA, I. et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 9, n. 1, p. 36–42, 2012.

MONZOTE, L.; PIÑÓN, A.; SETZER, W. Antileishmanial Potential of Tropical Rainforest Plant Extracts. **Medicines**, v. 1, n. 1, p. 32–55, 2014.

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

MUTISO, J. M. et al. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **Journal of Biomedical Research**, v. 27, n. 2, p. 85–102, 2013.

MWANGI, E. S. K. et al. Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 9, p. 726–731, 2010.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

OTUKI, M. F. et al. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310–8, abr. 2005.

PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 695–716, 2014.

PAPA, M. C. M. Avaliação da capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral por monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. p. 74, 2007.

PARVEZ, M. K. et al. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -

sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 5, p. 685–693, 2018.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

PERES, M. T. L. P. et al. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 836–846, 2013.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, 1980.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

REILLY, T. P. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803–10, mar. 1998.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235–254, 2005.

SCOTTI, M. T. et al. Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 19, n. 7, p. 537–53, 2016.

SCOTTIA, M. T. et al. Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, p. 537–553, 2016.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SILVA, A. A. S. et al. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum* chagasi. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1419–1423, 2014.

SILVA, Y. L. DA et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO ALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS. (MYRTACEAE). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 3, p. 205–211, mar. 2016.

TELES, C. B. G. et al. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 936–942, 2011.

THORNHILL, A. H. et al. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. **MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION**, v.

93, p. 29–43, 2015.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2–3, p. 114–120, 2004.

VALADARES, D. G. et al. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1807–1816, 15 out. 2012.

VÁZQUEZ, L. H. et al. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, v. 426, p. 478–502, 2011.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VIGANÓ, J. et al. Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 1–10, 2016.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 13 abr. 2014.

WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 975, p. v–xii, 1-100, 2012.

WHO, 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis) **Fact sheet**, n. 340. Retrieved from < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#> >.