

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**Avaliação de toxicidade *in vitro* de extratos aquosos de três espécies do gênero *Trichilia*
P. Browne (Meliaceae) sobre a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi***

LETÍCIA NASCIMENTO PEDRA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
AGOSTO 2023**

**Avaliação de toxicidade *in vitro* de extratos aquosos de três espécies do gênero *Trichilia*
P. Browne (Meliaceae) sobre a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi***

LETÍCIA NASCIMENTO PEDRA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como parte
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia, com ênfase em
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P371 Pedra, Letícia Nascimento.

Avaliação de toxicidade *in vitro* de extratos aquosos de três espécies do gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) sobre a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. / Letícia Nascimento Pedra. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

48 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.
Orientador: Edesio Jose Tenorio de Melo.

1. Compostos bioativos. 2. Doença de Chagas. 3. Protozoário. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

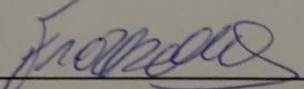
CDD - 570

Avaliação de toxicidade *in vitro* de extratos aquosos de três espécies do gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) sobre a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*

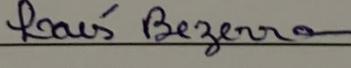
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 30 de agosto de 2023.

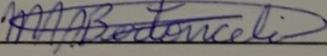
Comissão examinadora:



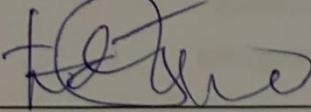
D.Sc. Franz Viana Borges - IFF Campus Campos Centro



D.Sc. Laís de Almeida Bezerra - UENF



D.Sc. Maria Aparecida Aride Bertoni - UENF



D.Sc. Edésio José Tenório de Melo (orientador) - UENF

*“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem
uma grande beleza.”*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde para concluir mais uma etapa.

Aos meus pais Edward e Janete por tanto amor e dedicação durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Lenon e Lucas pelo apoio emocional.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e confiança.

À minha amiga Maryana Lyra pela parceria e por não soltar a minha mão em todos os momentos compartilhados desde a graduação.

Ao professor Edésio por sua paciência e por ter me ensinado a lidar com as dificuldades da vida acadêmica.

Aos colegas da UENF e do LBCT pela convivência diária.

Às técnicas do LBCT pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Ao revisor, aos suplentes e à banca pelas correções e sugestões.

À UENF pela estrutura e corpo docente.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Breve relato sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	11
1.2 Classificação taxonômica	12
1.3 Morfologia e ultraestrutura	13
1.4 Ciclo biológico	16
1.5 Epidemiologia e transmissão	18
1.6 Sintomatologia e tratamento	20
1.7 Tratamento com extratos naturais como opção terapêutica.....	22
1.7.1 <i>Trichilia casaretti</i>	23
1.7.2 <i>Trichilia lepidota</i>	23
1.7.3 <i>Trichilia hirta</i>	24
2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa DM28)	27
4.2 Preparo das soluções	27
4.3 Análise da atividade tripanocida de extratos foliares	27
4.4 Quantificação e observação estrutural por microscopia óptica	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Curva de crescimento do <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
5.2 Análise quantitativa e morfológica de <i>Trichilia casaretti</i> contra epimastigota	29
5.3 Análise quantitativa e morfológica de <i>Trichilia lepidota</i> contra epimastigota	32
5.4 Análise quantitativa e morfológica de <i>Trichilia hirta</i> contra epimastigota	35
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Carlos Chagas no laboratório do Instituto Oswaldo Cruz. (B) Berenice: primeira paciente diagnosticada com doença de Chagas. (C) Jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e de Berenice 12
- Figura 2.** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* 13
- Figura 3.** (A) Forma epimastigota. (B) Forma amastigota. (C) Forma tripomastigota 14
- Figura 4.** Representação esquemática de amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do *Trypanosoma cruzi*..... 15
- Figura 5.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 17
- Figura 6.** Estrutura química do Benznidazol e do Nifurtimox 21
- Figura 7.** Curva de crescimento do *Trypanosoma cruzi* durante 7 dias para a observação da multiplicação celular 29
- Figura 8.** Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* 30
- Figura 9.** Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia casaretti* 31
- Figura 10.** Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* 33
- Figura 11.** Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia casaretti* 34
- Figura 12.** Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* 36
- Figura 13.** Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia casaretti* 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise percentual da <i>Trichilia casaretti</i> sob os epimastigotas.....	31
Tabela 2.	Análise percentual da <i>Trichilia lepidota</i> sob os epimastigotas.....	33
Tabela 3.	Análise percentual da <i>Trichilia hirta</i> sob os epimastigotas.....	36

RESUMO

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae que tem o seu ciclo de vida envolvendo hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos). As formas infectivas em mamíferos precisam invadir as células hospedeiras para estabelecer o ciclo de replicação, propagando a infecção e ocasionando a doença. O tratamento da forma aguda para os portadores da doença consiste em duas classes de fármacos nitrogenados: Nifurtimox e Benznidazol. Todavia, esses compostos são parcialmente eficazes na fase aguda e ineficazes na fase crônica da doença, além de provocarem efeitos colaterais severos e toxicidade sistêmica, quando não cancerígenos. Há uma grande dificuldade no desenvolvimento de um composto químico de alta eficácia e especificidade. Os produtos naturais são uma fonte atrativa de compostos com potencial terapêutico, pois apresentam atividades biológicas e perfis farmacológicos desejáveis. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é elucidar a ação toxicológica de compostos naturais contra o *Trypanosoma cruzi* extracelular *in vitro*. O presente estudo demonstrou os efeitos quantitativos e morfológicos no processo de destruição e eliminação do *Trypanosoma cruzi* na presença dos extratos brutos aquosos de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta*. Para isso, diferentes tratamentos de compostos naturais contra formas extracelulares desse parasito foram testados em três concentrações: 50 mg/mL, 80 mg/mL e 100 mg/mL e os dados obtidos indicaram a inibição do crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Assim, este trabalho utilizou a microscopia óptica de campo claro para observar as alterações morfológicas dos epimastigotas e as mudanças mais evidentes foram a perda de flagelo, corpo arredondado e em dupla. Os resultados sugerem atividade tripanocida nos extratos avaliados, um ponto de partida valioso para futuras investigações que explorem o potencial de extratos como fonte de compostos bioativos, principalmente contra doenças negligenciadas.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Doença de Chagas. Protozoário.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is a flagellated protozoan of the Trypanosomatidae family whose life cycle involves vertebrate (mammals) and invertebrate (triatomines) hosts. Infectious forms in mammals need to invade host cells to establish the replication cycle, propagating the infection and causing the disease. Treatment of the acute form for those with the disease consists of two classes of nitrogen drugs: Nifurtimox and Benznidazole. However, these compounds are partially effective in the acute phase and ineffective in the chronic phase of the disease, in addition to causing severe side effects and systemic toxicity, when not carcinogenic. There is great difficulty in developing a chemical compound with high efficacy and specificity. Natural products are an attractive source of compounds with therapeutic potential, as they have desirable biological activities and pharmacological profiles. In this context, the objective of this work is to elucidate the toxicological action of natural compounds against extracellular *Trypanosoma cruzi in vitro*. The present study demonstrated the quantitative and morphological effects on the process of destruction and elimination of *Trypanosoma cruzi* in the presence of aqueous crude extracts of *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* and *Trichilia hirta*. For this, different treatments of natural compounds against extracellular forms of this parasite were tested at three concentrations: 50 mg/mL, 80 mg/mL and 100 mg/mL and the data obtained indicated the inhibition of the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Thus, this work used bright-field optical microscopy to observe the morphological changes of epimastigotes and the most evident changes were the loss of the flagellum, rounded body and double body. The results suggest trypanocidal activity in the extracts evaluated, a valuable starting point for future investigations that explore the potential of extracts as a source of bioactive compounds, especially against neglected diseases.

Keywords: Bioactive compounds. Chagas disease. Protozoan.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve relato sobre o *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

Os protozoários da família Trypanosomatidae são agentes de doenças parasitárias que têm uma incidência elevada e representam um impacto econômico negativo nos países em desenvolvimento. Em relação à doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, estima-se que 6 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas nas Américas. Além disso, cerca de 10 mil pessoas morrem a cada ano em consequência de complicações clínicas e, aproximadamente, 75 milhões de pessoas na região correm o risco de contraí-la (PAHO, 2023).

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal encontrada, principalmente, em áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina, onde tem sido transmitida para humanos e outros mamíferos pelo contato com fezes ou urina de insetos triatomíneos (transmitidos por vetores), conhecidos como barbeiros, entre muitos outros nomes populares, dependendo da área geográfica (WHO, 2023).

A doença recebeu este nome em homenagem ao Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e pesquisador brasileiro que descobriu a doença em 1909 (**Figura 1 A**). O pesquisador, assistente do Instituto Oswaldo Cruz, mudou-se para a cidade de Lassance, interior de Minas Gerais, com objetivo de combater a malária que acometia os trabalhadores na construção dos ramais da estrada de ferro central do Brasil. Neste período, Chagas utilizou o vagão de um trem como moradia, laboratório e consultório. Devido a sua curiosidade científica, ele examinava animais e pessoas, tendo contato com as doenças e a fauna daquela região. Inclusive, a sua dedicação o levou a descobrir um flagelado, o qual denominou *Trypanosoma minasense* - exclusivo de micos (SILVA, 2022).

Com mais estudos, o pesquisador identificou outro tripanossoma, diferente do anterior, e detectou a presença de um cinetoplasto extremamente denso e movimentação intensa no tubo digestivo de “barbeiros”, um inseto hematófago muito frequente em casas da região e causador de várias doenças (COSTA *et al.*, 2013).

Diante da descoberta deste último flagelado, enviou amostras de barbeiros infectados ao laboratório de Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. Ao infectar micos, comprovaram a suspeita de Chagas de que este tripanossoma deveria ser uma espécie nova que circularia entre barbeiros, mamíferos e, talvez, humanos. Então, Carlos Chagas procurou o protozoário no sangue das pessoas que moravam em casas infestadas por barbeiros para confirmar o diagnóstico. A esta

nova espécie e em homenagem a Oswaldo Cruz, Chagas a denominou de *Trypanosoma cruzi* e desta forma descobriu uma nova doença humana: a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (CIMERMAN; CEMERMAN, 2008; KROPF; AZEVEDO; FERREIRA, 2000).

No dia 14 de abril de 1909, ao examinar o sangue de uma criança febril, de dois anos de idade, Berenice (**Figura 1 B e C**), Chagas identificou o protozoário. A mãe de Berenice relatou a Chagas que sua filha havia sido picada por um barbeiro e quais sintomas haviam manifestado (COSTA *et al.*, 2013). A partir desse fato, Chagas estudou o parasito, o ciclo evolutivo no vertebrado e invertebrado, os insetos vetores, os reservatórios, a clínica inerente à fase aguda da doença, a patologia, a epidemiologia da doença e a sintomatologia, o seu primeiro diagnóstico parasitológico (gota espessa) e as formas de tratamento. Além disso, tornou notável às autoridades a importância médica e social da doença (GILBER, 2007).



Figura 1. (A) Carlos Chagas no laboratório do Instituto Oswaldo Cruz. (B) Berenice: primeira paciente diagnosticada com doença de Chagas. (C) Jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e de Berenice. (Reproduzido a partir da homepage Casa de Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ e Adaptado de LIDANI *et al.*, 2019).

1.2 Classificação taxonômica

A espécie *Trypanosoma cruzi* pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastidiae, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum*. O inseto vetor da doença, pertence ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae, gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (NEVES *et al.*, 2005).

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas, como o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum* (VOTÝPKA, 2015).

Com base no comportamento do parasito nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos: o primeiro grupo, chamado de *Stercoraria*, inclui tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectantes pelas fezes, como o *T. cruzi* e o *T. lewisi*; o segundo grupo, chamado de *Salivaria*, inclui tripanosomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares onde podemos encontrar as formas infectantes que são inoculadas mecanicamente, como o *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli* (KHALAFALLA; HUSSEIN; BORNSTEIN, 2021).

1.3 Morfologia e ultraestrutura

Uma das principais características do *T. cruzi* é a existência de uma única mitocôndria, região rica em ácido desoxirribonucleico e constituída por moléculas dupla-fita circulares, denominada cinetoplasto (FIDALGO e GILLE, 2011). Durante o ciclo biológico, o protozoário pode assumir três principais formas evolutivas (**Figura 2 e Figura 3 A, B e C**), as quais são identificadas morfológicamente através da posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (RODRIGUES *et al.*, 2020).

A forma epimastigota é alongada (20-40 μm comprimento, 2-5 μm largura) e com flagelo livre, extracelular e replicativa, encontrada no hospedeiro invertebrado; a forma tripomastigota é alongada (18 μm comprimento, 2-3 μm largura) e com flagelo livre, não replicativa, encontrada no sangue dos vertebrados e na região distal do intestino do inseto vetor e a forma amastigota é esférica (4 μm) e sem flagelo livre, a multiplicação ocorre no ambiente intracelular dos hospedeiros vertebrados (TONELLI *et al.*, 2010).



Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (Reproduzido de TAVARES *et al.*, 2016).

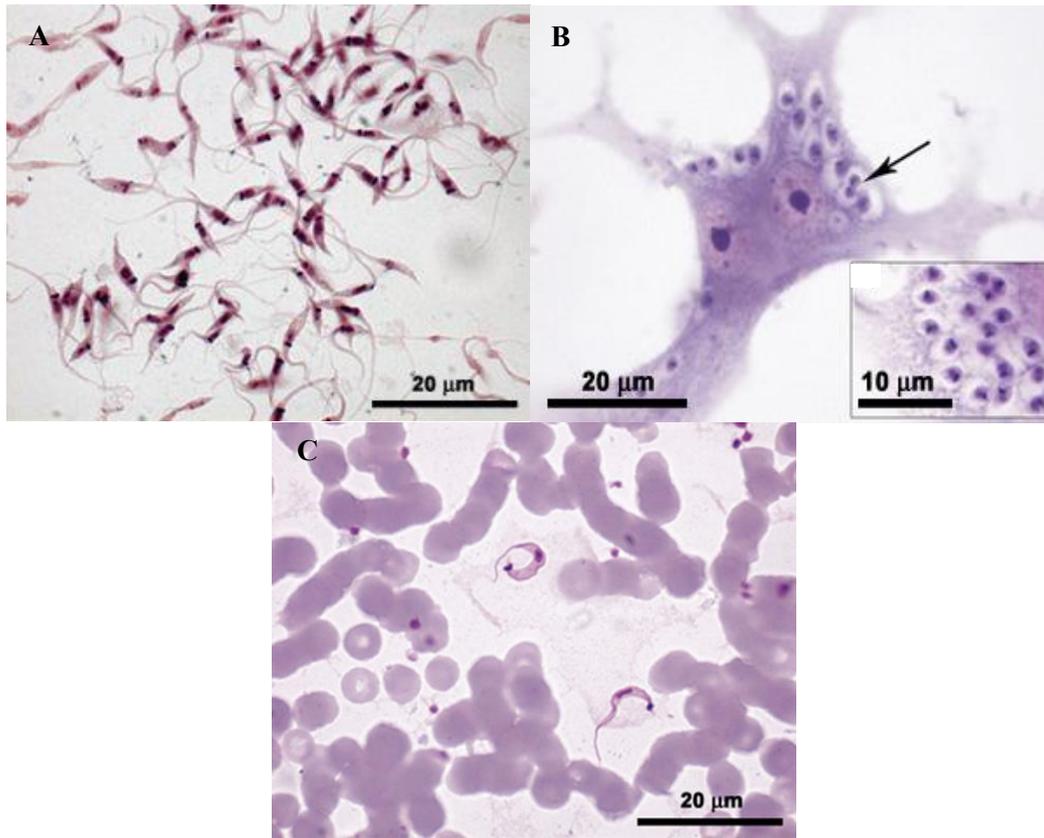


Figura 3. (A) Forma epimastigota. (B) Forma amastigota. (C) Forma tripomastigota. (Adaptado a partir da homepage FIOCRUZ).

O *T. cruzi* apresenta organelas (**Figura 4 A, B e C**) que são típicas de células eucariotas, enquanto outras são peculiares. Essas organelas são importantes para a organização celular do parasito e para a sua funcionalidade (DE CARVALHO, 2017).

A superfície celular é composta por diferentes glicoconjugados que auxiliam na interação parasito-célula hospedeira (SOUZA, 2009); a membrana plasmática desempenha importante papel na separação entre o ambiente extracelular e o intracelular, atuando de uma forma altamente seletiva e específica (SOUZA, 2009); o citóstomo é uma porção especializada da membrana plasmática que se invagina passando pelo núcleo, alcançando a bolsa flagelar e internalizando macromoléculas necessárias para sobrevivência do parasito (SOUZA, 2009); o reservossomo é uma organela pré-lisossomal, que estoca macromoléculas internalizadas pelo citóstomo. Estas moléculas estocadas são utilizadas à medida que os nutrientes se tornam escassos ou nos processos de diferenciação como da forma epimastigota para a tripomastigota (SOUZA *et al.*, 2000); o flagelo tem a função de locomoção e adesão inicial do parasito às células hospedeiras. Esta organela origina-se na bolsa flagelar e é formado por um conjunto de 9 pares de microtúbulos periféricos e 2 pares de microtúbulos centrais, com seu comprimento variando de acordo com o estágio morfológico do parasito (SOUZA, 2009); o citoesqueleto é

composto pelos microtúbulos subpeliculares, estabelecendo uma rigidez à membrana plasmática (SOUZA, 2009); os microtúbulos têm arranjos helicoidais e são capazes de manter uma distância específica entre estes e a porção interna da membrana plasmática (SOUZA, 2009); o acidocalcissoma é uma organela vacuolar responsável pela estocagem de íons e compostos fosfatados como pirofosfatos e polifosfatos, manutenção do pH e osmorregulação (DO CAMPO *et al.*, 2005).

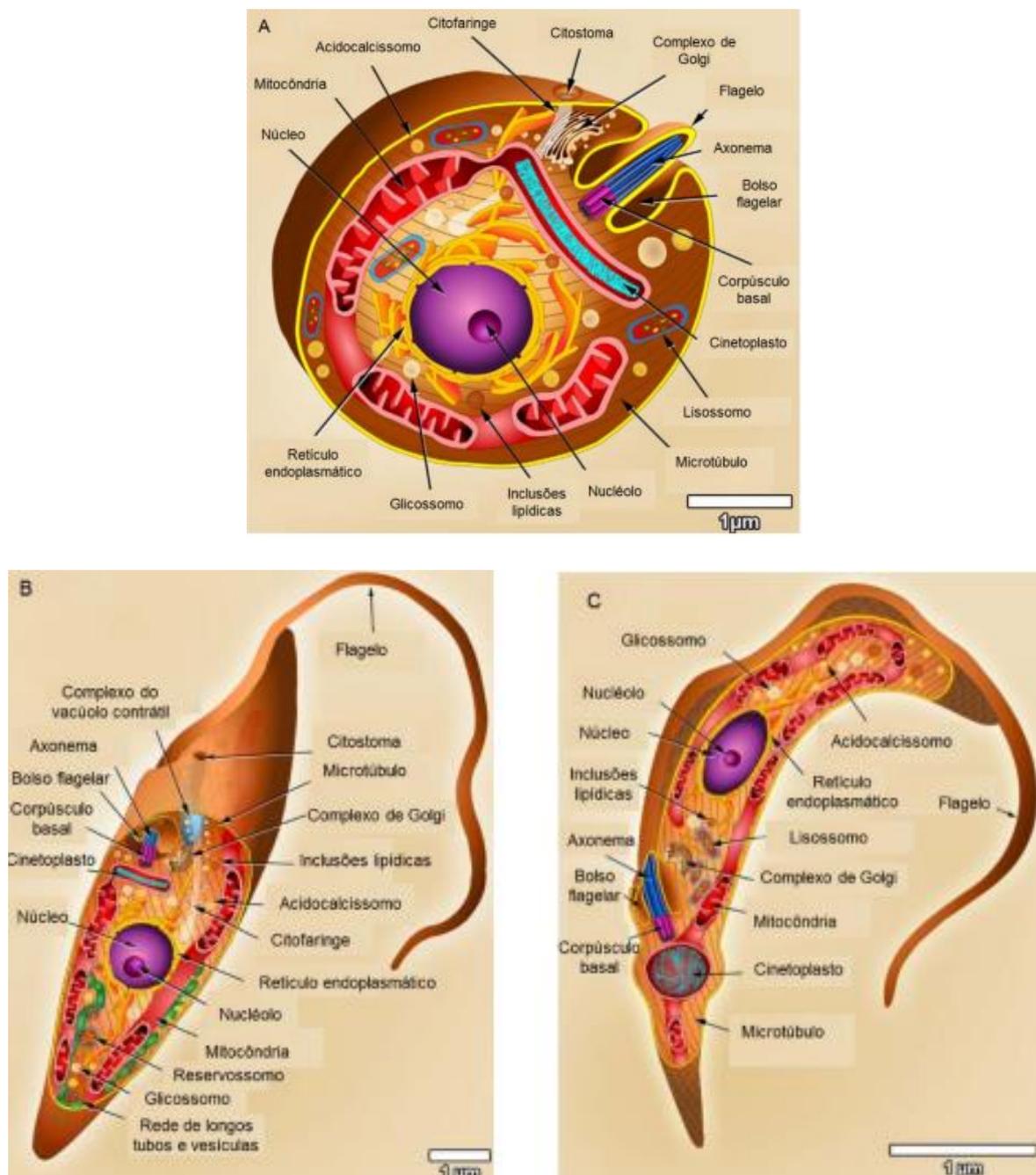


Figura 4. Representação esquemática de amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2012).

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve um hospedeiro definitivo (insetos da subfamília dos Triatomíneos) e como hospedeiro intermediário, diversas espécies de mamíferos (SÁNCHEZ VALDEZ *et al.*, 2013).

O parasito sofre modificações morfológicas e fisiológicas, inclusive, na expressão de proteínas e moléculas de superfície como meio de se adaptar e garantir sua sobrevivência nos diferentes ambientes dentro do seu ciclo de vida (CUERVO; DOMONT; DE JESUS, 2010). Alguns mecanismos ativos e passivos são utilizados para invadir a célula hospedeira, como as etapas de reconhecimento mediadas por moléculas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira que funcionam como receptores-ligantes (YOSHIDA e CORTEZ, 2008). Em seguida, uma série de cascatas de sinalizações é desencadeada alterando a fisiologia e a estruturação da célula para promover a penetração do *T. cruzi* (BARRIAS *et al.*, 2012; CALER *et al.*, 1998; WOOLSEY *et al.*, 2003).

O ciclo de vida (**Figura 5**) compreende duas fases (estágios de insetos e mamíferos) e inclui três formas de desenvolvimento - epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Como formas replicativas, os epimastigotas estão presentes no tubo digestivo do inseto vetor e amastigotas, que podem ser observados no interior das células de mamíferos. Já os tripomastigotas metacíclicos, encontrados nas fezes e urina do inseto vetor, são as formas não replicativas e infectantes, assim como os tripomastigotas circulantes, que são encontrados no sangue de mamíferos (SOUZA e BARRIAS, 2017).

Na fase do hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* se transforma em epimastigotas e, no intestino posterior, diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. O parasita não penetra a pele intacta, ele infecta o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele. Nos mamíferos, os parasitos se desenvolvem no interior das células e são liberados no sangue circulante após o rompimento das células do hospedeiro (SOUZA e BARRIAS, 2017).

Durante a alimentação do inseto, as formas tripomastigotas, encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado infectado, são ingeridas pelos insetos. Alguns dias após a alimentação do inseto, os parasitas se transformam em epimastigotas e esferomastigotas. Quando a infecção é estabelecida no estômago do inseto vetor, as formas epimastigotas do parasito se dividem por divisão binária e aderem às membranas perimicrovilares das células intestinais. Em grande quantidade, os epimastigotas se ligam à cutícula retal e se diferenciam em tripomastigotas

metacíclicos, podendo assim ambas as formas (diferenciadas ou não) serem eliminadas pelas fezes e urina (SOUZA e BARRIAS, 2017).

Na fase do hospedeiro vertebrado, o vetor tem o primeiro contato com o *T. cruzi* na forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada pelo inseto e entra em contato com mucosas ou regiões lesadas da pele desses hospedeiros. Estas formas são muito infectantes, podendo invadir os primeiros tipos celulares que encontram, como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras. Ao invadir estas células ocorre a proliferação intracelular e liberação de formas tripomastigotas, assim como algumas formas intermediárias e amastigotas (estas últimas em menor proporção) no espaço intercelular. Estas formas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção, mas podem atingir a corrente circulatória e atingir todos os tecidos do hospedeiro, onde vão invadir os mais diferentes tipos celulares (AZAMBUJA e GARCIA, 2017).

O *T. cruzi* não apresenta um comportamento homogêneo, pois a cinética da infecção depende da variedade dos tecidos infectados, cepa do parasito, animal infectado, taxa de crescimento, curvas de parasitemia, virulência, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, diferenciação (metaciclogênese) e tropismo tecidual. Essa diversidade pode explicar a ampla patogênese observada nas infecções por *T. cruzi* (AZAMBUJA e GARCIA, 2017).

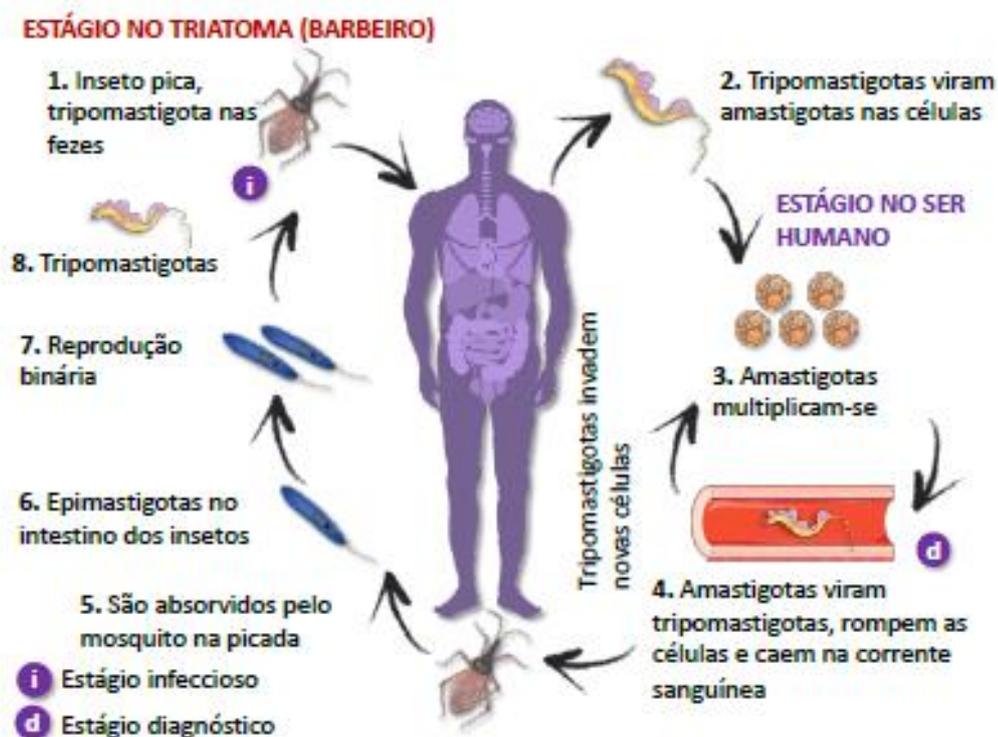


Figura 5. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (Reproduzido a partir da homepage de SANAR).

1.5 Epidemiologia e transmissão

Após a descoberta, a doença de Chagas permaneceu sendo considerada como uma enfermidade exclusivamente rural associada à pobreza em áreas da América Latina por muitas décadas (PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018). Atualmente, a doença está associada a fatores sociais e ambientais, além de apresentar distribuição em todo continente americano (OPAS, 2023).

Mesmo depois de cem anos de descoberta, esta doença ainda é abordada como um problema de saúde pública que atinge milhões de pessoas. Ela é originária da América Latina e presente em outros continentes, também pode ser considerada endêmica em 21 países latinos, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e do Chile, e apresenta as maiores prevalências na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%) (RASSI e MARIN-NETO, 2010).

No início da década de 1990, os países afetados se organizaram para combatê-la e adotaram iniciativas a fim de controlar essa ameaça à saúde pública na América Latina (COURA, 2007). Juntamente com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), os representantes de alguns países idealizaram um plano de cooperação denominado: Iniciativas Sub-regionais para Prevenção e Controle da Doença de Chagas, o qual abordava a tentativa de interrupção da transmissão vetorial em todo ou parte do território dos países afetados (OPAS, 2023). Como consequência das medidas adquiridas, o número aproximado de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no mundo reduziu de 30 milhões em 1990 para 6 a 7 milhões em 2010. Ao longo desses 20 anos, a incidência anual diminuiu de 700.000 para 28.000 novos casos de infecção (OPAS, 2023).

No Brasil, durante a década de 70, a área correspondente a endemia por doença de Chagas incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, dentre os quais se constatou a presença do *Triatoma infestans* em 711 destes municípios (SESA, 2023). Porém, com o desenvolvimento de campanhas de saúde pública, investimentos financeiros e ações de controle da endemia, os resultados obtidos foram satisfatórios no aspecto epidemiológico da transmissão vetorial (ARAS *et al.*, 2003).

Então, o Brasil obteve pela Organização Pan-Americana de Saúde e pela OMS um certificado da interrupção da transmissão vetorial da infecção chagásica em 2006. É importante destacar que essa certificação não significa o controle efetivo da doença no Brasil, mas representa em caráter momentâneo, a exclusão da transmissão típica pelo triatomíneo da espécie *Triatoma infestans* (ANDRADE *et al.*, 2011).

A transmissão da doença de Chagas pela via vetorial é considerada a forma de transmissão com maior relevância epidemiológica, pois corresponde a 80% dos casos da doença (ARAS *et al.*, 2003). Contudo, existem outros meios de transmissão, como a via congênita e as vias de exceção, as quais não representam valor significativo na saúde pública, como a via oral, acidental e transplantar, entre outras (MORAES-SOUZA e FERREIRA-SILVA, 2011).

A transmissão vetorial ocorre quando a interação vetor-hospedeiro é evidenciada, pois o triatomíneo possui hábitos noturnos e apresenta em sua saliva propriedade anestésica e anticoagulante, tornando a sua picada indolor. Durante ou logo após o hematofagismo, o vetor defeca e ocorre uma leve ardência ou coceira no local da picada, assim, quando a pessoa se coça, propicia a penetração do parasito contido nas excreções do barbeiro no hospedeiro, causando a infecção (COSTA *et al.*, 2013).

A transmissão congênita ocorre de forma vertical pela via transplacentária, que pode acontecer tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, podendo aparecer em qualquer período da gestação, sendo mais provável no último trimestre. Porém, a transmissão também pode ocorrer no canal do parto, através do contato de mucosas do feto com o sangue da mãe contaminado por *T. cruzi* (TAKAMIYA *et al.*, 2020).

A transmissão oral ocorre pela ingestão de alimentos contendo tripanossomos provenientes de triatomíneos ou suas dejeções. Isso pode acontecer pela ingestão de caldo de cana, açaí, carne crua ou malcozida, sucos de frutas silvestres e aleitamento materno (FERREIRA; BRANQUINHO; LEITE, 2014).

A transmissão acidental pode ocorrer em diversas circunstâncias e na sua maioria são despercebidos ou não diagnosticados. Um conjunto de elementos como desconhecimento, desatenção, falta de capacitação ou mal uso de equipamentos de proteção individual são considerados fatores de risco para a contaminação pelo *T. cruzi*. Em laboratórios com indivíduos que manuseiam o parasito no sangue de animais, fezes de triatomíneos, pessoas contaminadas ou vetores infectados, a infecção pode ocorrer pelo contato do parasito com alguma lesão na pele, mucosa oral ou autoinoculação (DIAS e AMATO, 2011).

A transmissão transplantar é uma forma registrada na literatura científica e os primeiros relatos de contaminação datam no início de 1980 através de um transplante de rim. Essa transmissão advém quando não há triagem no processo de transplantes e a pessoa pode desenvolver a fase aguda grave, pois o indivíduo transplantado e contaminado apresenta menor resistência à infecção, devido ao tratamento com imunossupressores (DE ALMEIDA, 2021).

A transmissão transfusional é uma forma de risco de transfusão sanguínea e vários fatores influenciam, como a presença do parasito no sangue ou no hemocomponente

transfundido; o tipo e o número de hemoderivados infectados transfundidos; o estado imunológico do receptor; a qualidade da triagem clínico-epidemiológica; o nível de cobertura da triagem sorológica de doadores e da sensibilidade dos testes sorológicos utilizados para rastrear a doação de sangue (WENDEL, 2010).

1.6 Sintomatologia e tratamento

O *T. cruzi* induz uma infecção aguda que dura menos de três meses com alta parasitemia no sangue e os sintomas normalmente são leves ou não específicos, o que torna o diagnóstico mais difícil. Mas, em alguns casos, a fase aguda pode ser fatal ou levar a quadros de miocardite e meningoencefalite (BERN *et al.*, 2008).

No local da entrada do parasito pode ocorrer a formação de uma lesão inflamatória (chagoma de inoculação). Se o local da infecção for a mucosa ocular, o chagoma é chamado de Sinal de Romana, um edema unilateral e bpalpebral. Dentro das células do hospedeiro, o parasito começa a se multiplicar em ciclos assincronicos, promovendo destruição do tecido. A fase aguda apresenta sintomas discretos em muitas pessoas, no entanto, quando há manifestações, estas ocorrem em um período de 7 a 14 dias e incluem febre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômito, diarreia, anorexia, irritação da meninge e conjuntivite. Um pequeno número de pacientes desenvolve miocardite, podendo ter taquicardia, cardiomegalia e falência cardíaca. A fase aguda é seguida por uma fase crônica na qual a parasitemia é reduzida, impedindo a detecção do protozoário por exames de sangue direto (TANOWITZ *et al.*, 1992).

Na fase crônica da doença, os parasitos ficam alojados principalmente no coração e músculo liso do sistema digestório. A estimativa é que cerca de 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e 10% sofrem de problemas no sistema digestivo (tipicamente alargamento do esôfago ou do cólon), ou alterações neurológicas mistas. Nos anos posteriores à infecção, pode ocorrer morte súbita ou insuficiência cardíaca causada por destruição progressiva do músculo cardíaco e do seu sistema nervoso periférico (COURA, 2007).

O tratamento da doença de Chagas acontece por meio de dois fármacos há mais de três décadas: Benznidazol N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida (Bz, LAFEPE e Abarax/ELEA) e Nifurtimox 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1, 4-tiazina-1,1-dióxido (Nif, LAMPIT/Bayer) (DE CASTRO e SOEIRO, 2017). O mecanismo de ação destes compostos ainda não é totalmente elucidado (SALES *et al.*, 2017). Acredita-se que o Benznidazol atue por

1.7 Tratamento com extratos naturais como opção terapêutica

Os extratos naturais são usados pela sociedade há séculos e a busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas pode ter sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do avanço das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. As civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa ganharam destaque (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tanta eficiência que até hoje espécies e extratos vegetais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e princípios ativos. As metodologias desenvolvidas e aplicadas no Egito para conservação de múmias ainda são um desafio para a química moderna. Na Idade Antiga, além de técnicas medicinais, muitos venenos foram descobertos na natureza e utilizados para fins de defesa, caça e mesmo ilícitos, como o uso do veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) na execução de prisioneiros, inclusive Sócrates, durante o Império Grego (DEWICK, 2002).

A natureza sempre despertou no homem uma curiosidade, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Segundo Niero (2010), os fitoterápicos equivalem cerca de 15% do capital da indústria farmacêutica no mundo. Desta maneira, as grandes indústrias farmacêuticas são atraídas para realizar alguns investimentos no desenvolvimento desses produtos. No Brasil, esse mercado é de aproximadamente US\$ 160 milhões por ano e o fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internas, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (RABELO; PAULA; BARA, 2013).

De tantas famílias de plantas existentes, a Meliaceae é muito útil ao homem, principalmente por suas madeiras de alta qualidade e pela facilidade com que algumas espécies podem ser cultivadas em plantações. Suas espécies ocorrem, muitas vezes, de forma visível em uma variedade de habitats, desde florestas tropicais até manguezais e semidesertos (PENNINGTON, 1975).

A família Meliaceae tem se mostrado de grande interesse entre os fitoquímicos, seja por conter plantas que produzem estruturas químicas muito complexas, seja por sua atividade biológica, principalmente contra insetos (PUPO *et al.*, 2002).

O gênero *Trichilia* compreende cerca de 230 espécies distribuídas em toda a América tropical, que são reconhecidas por sua importância econômica. O gênero é rico em terpenoides, incluindo triterpenos, limonoides, esteroides e outros derivados de terpenos (VIEIRA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2018).

1.7.1 *Trichilia casaretti*

Trichilia casaretti, conhecida popularmente como “Murta-vermelha”, é uma espécie arbórea, terrícola e pode atingir até 10 metros de altura. Seus frutos são cápsulas com 1-3 sementes ovaladas, de testa membranácea e recobertas parcialmente por um arilo vermelho-alaranjado (PATRÍCIO; CERVI, 2005; LORENZI, 2009; PENNINGTON, 2016).

A plantação de *T. casaretti* é recomendada para a arborização em áreas urbanas e reflorestamentos mistos, pois seu porte é pequeno e os frutos servem de alimentação para a fauna (LORENZI, 2009). Outra utilidade desta espécie é no controle biológico da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), principal praga do milho. Borgoni e Vendramim (2005) demonstraram a eficácia do extrato das folhas de *T. casaretti* em aumentar a mortalidade de larvas em estágio final da lagarta.

1.7.2 *Trichilia lepidota*

Trichilia lepidota, conhecida popularmente como “Cedrinho”, é uma árvore de 3 a 6 metros de altura. A madeira desta espécie é utilizada para a fabricação de móveis (PATRÍCIO; CERVI, 2005). Investigações anteriores sobre os constituintes químicos do extrato de diclorometano das folhas desta espécie revelaram a presença de misturas de hidrocarbonetos ($C_{29}H_{60}$, $C_{31}H_{64}$ e $C_{33}H_{68}$), sesquiterpenos, esteroides, aminoácidos e outros compostos derivados da via metabólica dos terpenos (PUPO *et al.*, 2002).

Espécies do gênero *Trichilia* são conhecidas por possuírem estruturas limonoides (tetranortriterpenóides) e outros metabólitos terpênicos que são responsáveis por algumas propriedades biológicas. Esses metabólitos possuem um amplo espectro de efeitos biológicos, como potencial atividade antiviral, analgésica, inseticida e inibição do crescimento de insetos (SIMMONDS *et al.*, 2001; PUPO *et al.*, 1997). Investigações anteriores envolvendo limonoides

isolados de outra espécie de Meliaceae, nomeadamente *Melia azedarach*, demonstraram atividade antiproliferativa contra uma linhagem celular epitelial de adenocarcinoma A549 (NTALLI *et al.*, 2010). Além disso, foi comprovado que os limonoides de frutas cítricas demonstraram *in vitro* a capacidade de induzir apoptose e inibir a proliferação de células de neuroblastoma (POULOSE; HARRIS; PATIL, 2005).

1.7.3 *Trichilia hirta*

Trichilia hirta, conhecida popularmente como “Catiguá”, é uma árvore de 5-10 m de altura. Em condições úmidas pode atingir 25 m. É uma planta com flores unissexuais produzidas ao menos duas vezes ao ano. É uma espécie tipicamente de florestas secas decíduas e pode ser encontrada eventualmente em florestas úmidas perenifólias, quando seus folíolos ficam maiores e provavelmente deixam de ser decíduifólias (PENNINGTON, 1981).

As sementes são ricas em óleo, este é comumente utilizado como creme de cabelo no Sul do México e Guatemala e pode matar piolhos. A madeira serve para móveis (CNCFLORA, 2012). *T. hirta* é conhecida por sua propriedade medicinal antitumoral e anti-inflamatória, além de ser usada para tratar diferentes patologias associadas ao sistema respiratório e úlceras externas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A doença de Chagas é endêmica em 21 países das Américas e afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas. Nas Américas, a doença de Chagas apresenta uma incidência anual de 30.000 novos casos em média, 12.000 mortes por ano e aproximadamente 9.000 recém-nascidos são infectados durante a gestação. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair esta doença. No entanto, a maioria das pessoas (7 em cada dez) desconhece sua condição devido à ausência de sintomas clínicos (PAHO, 2023).

Há uma dificuldade no desenvolvimento de um composto químico eficaz contra o parasitismo intracelular no caso da Doença de Chagas. Os fármacos como Benznidazol (cujo nome comercial é Abarax) e Nifurtimox (cujo nome comercial é Lampit), que são eventualmente utilizados, apesar de serem eficazes na cura da doença quando são administrados logo após a infecção no início da fase aguda, promovem alguns efeitos colaterais severos como náuseas, vômitos e cólicas intestinais e carregam uma alta toxicidade.

Diante disso, o modelo de estudo da biologia da interação entre o parasito e a célula hospedeira é de extrema importância para o conhecimento de alvos de interesse quimioterápicos mais eficazes contra esses patógenos. O presente estudo colabora com as pesquisas relacionadas ao *Trypanosoma cruzi*, estudando os possíveis meios de eliminação do patógeno extracelular e os mecanismos envolvidos no processo. O estudo de compostos é importante para dificultar o surgimento de resistência do parasito contra um composto específico, além de se obter um composto eficaz contra mais de um tipo de patógeno.

O cultivo axênico do *Trypanosoma cruzi* na forma epimastigota, assim como os meios que induzem a diferenciação para as formas tripomastigotas e amastigotas, possibilita diversos estudos que adicionam informações relevantes sobre a biologia celular deste protozoário e o avanço de pesquisas relacionadas a essa temática é essencial para tentar reduzir a virulência de forma que o hospedeiro não sofra tantos impactos fisiológicos em decorrência das complicações de tratamento. Além disso, este processo metodológico também é importante para o estudo de outras protozooses.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação anti-*Trypanosoma cruzi* dos extratos foliares de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta*.

3.2 Objetivos específicos

Analisar a ação dos três extratos foliares em diferentes concentrações e tempos de incubação contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Analisar as alterações morfológicas de *Trypanosoma cruzi* tratados com os extratos foliares.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo do *Trypanosoma cruzi* (cepa DM28)

A forma epimastigota do *T. cruzi* foi mantida em tubos de vidro estéreis contendo 5 mL de meio de cultura LIT (*Liver Infusion and Triptose* – FLUKA E SIGMA) suplementado com 4% de Hemina (SIGMA) e 10% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO) em estufa a 28° C. A cada 5 dias, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e transferida para um novo tubo estéril, e o volume foi completado para 5 mL com o meio de cultivo (DE CARVALHO e DE MELO, 2017).

4.2 Preparo das soluções

Os produtos naturais utilizados foram os extratos de folhas de três plantas: *Trichilia casaretti* (Murta-vermelha), *Trichilia lepidota* (Cedrinho) e *Trichilia hirta* (Catiguá). Essas espécies foram coletadas na Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, localizada em São Francisco do Itabapoana/RJ.

As folhas de cada planta foram colocadas em infusão com água desmineralizada em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 24 horas, sob proteção da luz. Após 24 horas, o sobrenadante de cada planta foi filtrado em papel filtro convencional e armazenado em vidraria para ser liofilizado no laboratório de bioquímica para obtenção do pó. O concentrado foi diluído em PBS (GIBCO) e DMSO (MERCK) para a realização da solução estoque e filtrada em seringas para obtenção da solução esterilizada.

Então, as amostras foram adicionadas ao meio suplementado com 5% de SFB (GIBCO) para obter as concentrações finais de uso: 50 mg/mL, 80 mg/mL e 100 mg/mL. Em seguida foram homogeneizadas e adicionadas às culturas para os testes nos seguintes tempos de incubação: 0, 24, 48, 72 e 96 h (MELO; VILELA; CARVALHO, 2011).

4.3 Análise da atividade tripanocida de extratos foliares

As culturas de parasitos (epimastigotas) foram tratadas com as soluções dos extratos brutos foliares das espécies de *Trichilia* quando atingiram, aproximadamente, 10⁵ parasitas por mL (3° dia da curva de crescimento) e incubadas com os tratamentos em tubos cônicos estéreis a 28°C em diferentes tempos - 0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e concentrações - 50 mg/mL, 80 mg/mL

e 100 mg/mL (porque essas concentrações). O controle foi realizado de forma que os parasitos ficassem somente com o meio LIT nos tubos cônicos estéreis. A contagem foi realizada por meio da câmara de Neubauer (DE CARVALHO e DE MELO, 2017).

4.4 Quantificação e observação estrutural por microscopia óptica

No início e após cada tratamento com os extratos foliares, cada amostra foi distribuída em quatro campos nos tubos cônicos estéreis, representando o controle e as respectivas concentrações para obter a contagem dos parasitas.

Para examinar e monitorar todas as preparações, as alíquotas de parasitas foram fixadas em solução de formaldeído 4% (v/v) e contadas através da câmara de Neubauer durante 5 dias (0, 24, 48, 72 e 96 h).

Cada amostra foi pesada e centrifugada por 3 minutos e os esfregaços foram realizados em lâminas de vidro. Para a secagem, as amostras foram deixadas por 20 minutos dentro da estufa 56° C e, após este tempo, foram coradas com solução de Giemsa (1:10) diluída em PBS em *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com água destilada.

As amostras foram observadas no microscópio Zeiss Axioplan, equipado com objetivas de 20x e 40x utilizando Olympus DP74 câmera com o software Analysis System para obtenção das imagens (DE CARVALHO; HELD; DE MELO, 2020).

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento do *Trypanosoma cruzi*

Para elucidar a ação dos extratos foliares contra o *Trypanosoma cruzi* extracelular *in vitro*, a cultura foi contada e, assim foi possível observar, durante um período de 8 dias, o perfil de crescimento das formas extracelulares (epimastigotas) para selecionar o momento ideal para a incubação de diferentes tratamentos a partir da fase logarítmica (24 h). O final da fase logarítmica foi no tempo 120 h, já a fase estacionária iniciou no tempo 120 h e o declínio iniciou no tempo 144 h (**Figura 7**).

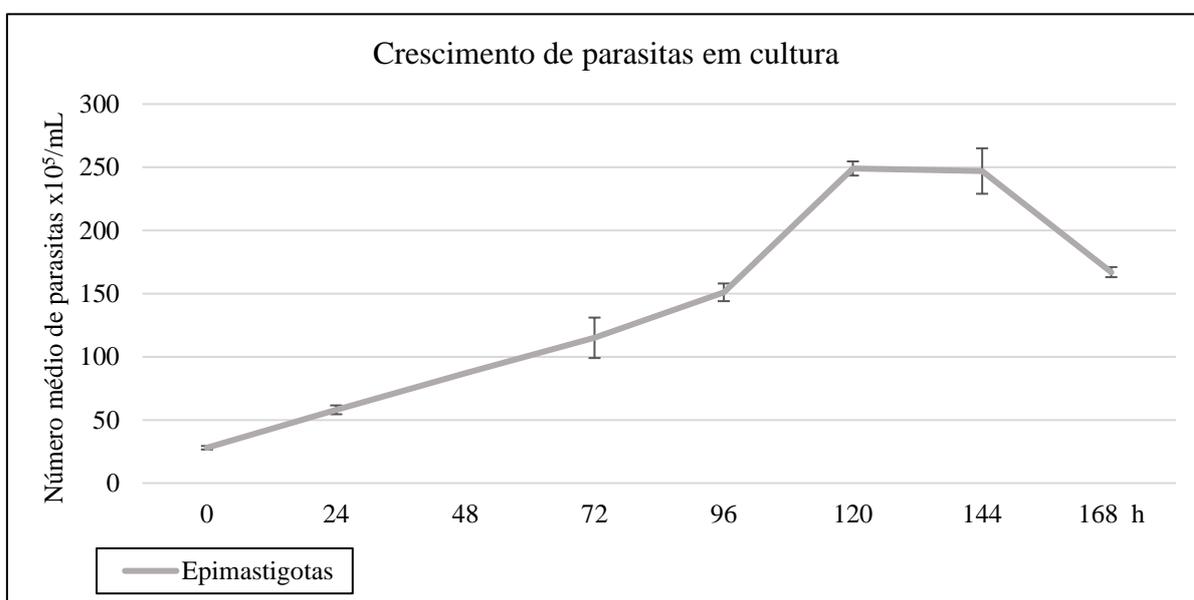


Figura 7. Curva de crescimento do *Trypanosoma cruzi* durante 7 dias para a observação da multiplicação celular.

5.2 Análise quantitativa e morfológica de *Trichilia casaretti* contra epimastigota

Os efeitos do extrato bruto de *Trichilia casaretti* (**Figura 8**) foram avaliados em três diferentes concentrações: 50 mg/mL, 80 mg/mL e 100 mg/mL, contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Para a concentração de 50 mg/mL, observamos que a contagem inicial de parasitas era de 73 epimastigotas, a qual diminuiu para 33 epimastigotas no tempo 0 h. Após 24 h, ocorre uma redução de 148 para 71 epimastigotas; ao fim de 48 h, a contagem caiu de 255 para 28 epimastigotas. Nos intervalos subsequentes, verificou-se uma diminuição contínua no número de parasitas: de 327 para 51 epimastigotas após 72 h e de 299 para 62 epimastigotas após 96 h.

Na concentração de 80 mg/mL, os resultados demonstraram uma diminuição similar no número de parasitas. No tempo 0 h, a contagem era de 73 epimastigotas, diminuindo para 42 epimastigotas. Após 24 h, ocorreu uma redução de 148 para 41 epimastigotas; após 48 h, a contagem caiu de 255 para 17 epimastigotas. As observações posteriores indicaram uma progressiva diminuição no número de parasitas: de 327 para 4 epimastigotas após 72 h e de 299 para 14 epimastigotas após 96 h.

Avaliando a concentração de 100 mg/mL, as observações mostraram uma tendência semelhante de redução no número de parasitas. Inicialmente, foram contados 73 epimastigotas, que diminuíram para 37 após 0 horas. Após 24 horas, observou-se uma redução de 148 para 69 epimastigotas; após 48 horas, a contagem diminuiu de 255 para 15 epimastigotas. Em intervalos posteriores, constatou-se uma diminuição gradual no número de parasitas: de 327 para 52 epimastigotas após 72 horas e de 299 para 54 epimastigotas após 96 horas.

A análise percentual (**Tabela 1**) indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato bruto de *Trichilia casaretti* nas respectivas concentrações a partir de 24 h até 96 h.

As alterações morfológicas mais significativas no *Trypanosoma cruzi* (**Figura 9**) foram identificadas através da microscopia óptica. Essas alterações incluem a observação de um corpo arredondado, a ausência de flagelo e a presença de parasitas em configuração dupla.

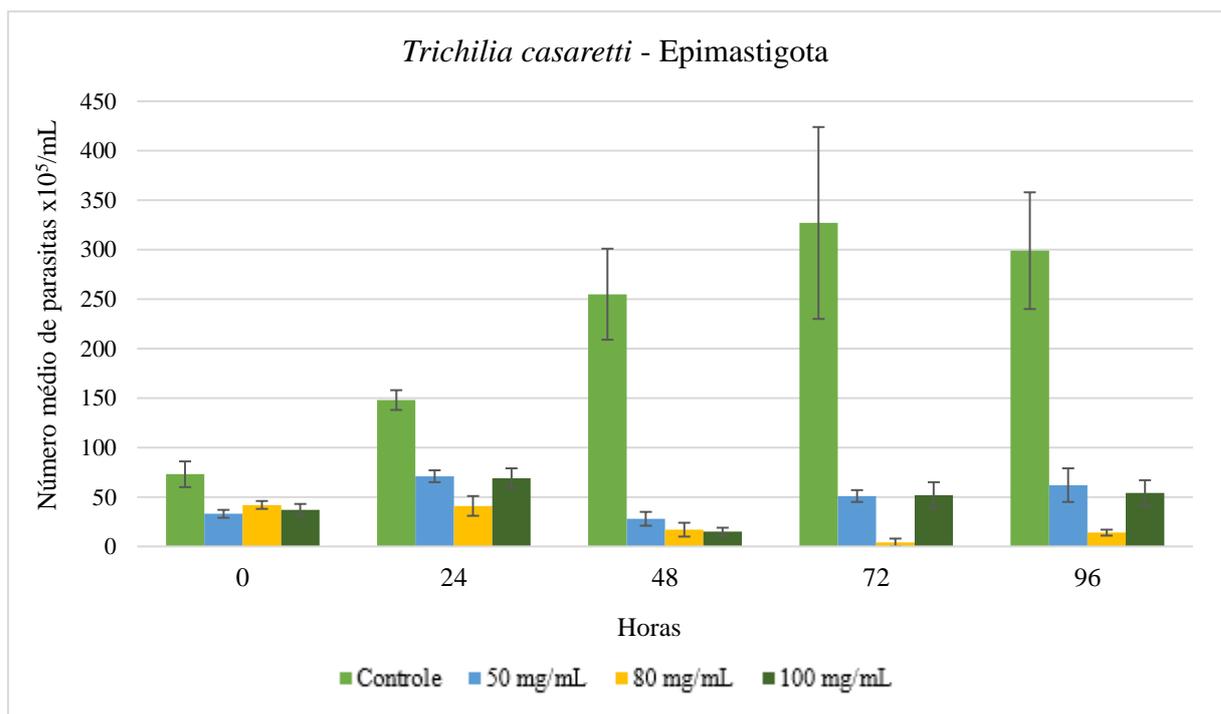


Figura 8. Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após a incubação com diferentes concentrações (50, 80 e 100 mg/mL) do extrato foliar de *Trichilia casaretti* em diferentes tempos.

TRATAMENTOS	TEMPO 24 H	TEMPO 48 H	TEMPO 72 H	TEMPO 96 H
CONTROLE	148 (0%)	255 (0%)	327 (0%)	299 (0%)
50 mg/mL	52,0%	89,0%	84,4%	79,3%
80 mg/mL	72,3%	93,3%	98,8%	95,3%
100 mg/mL	53,4%	94,1%	84,1%	81,9%

Tabela 1. Análise percentual da *Trichilia casaretti* sob os epimastigotas. A tabela indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato nas respectivas concentrações a partir de 24 h.

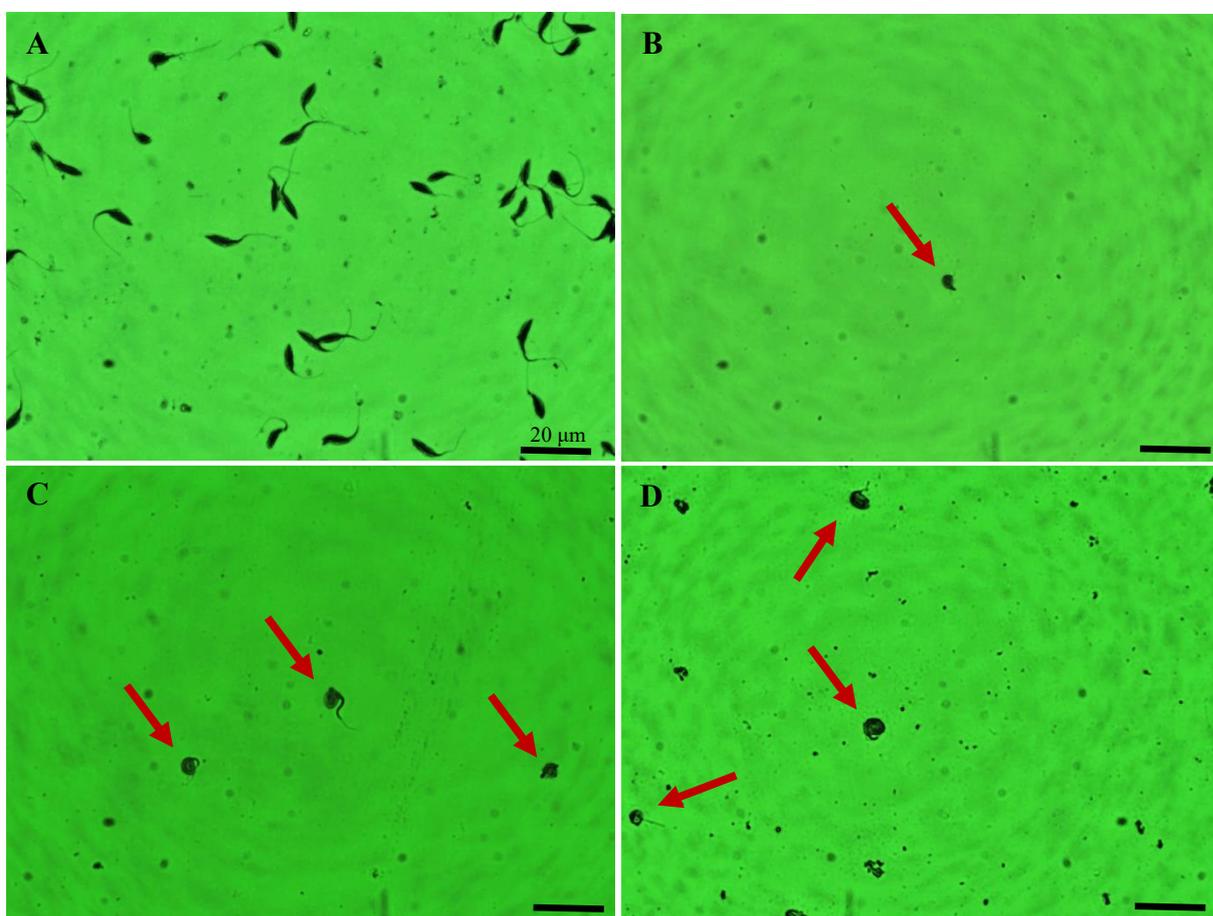


Figura 9. Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia casaretti*. (A) Controle – 72 h. (B) Tratado – 100 mg/mL; 48 h. (C) Tratado – 100 mg/mL; 72 h. (D) Tratado – 100 mg/mL; 96 h. As setas vermelhas indicam as alterações morfológicas.

5.3 Análise quantitativa e morfológica de *Trichilia lepidota* contra epimastigota

Os efeitos do extrato bruto de *Trichilia lepidota* (**Figura 10**) foram avaliados em três diferentes concentrações: 50 mg/mL, 80 mg/mL e 100 mg/mL, contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Para a concentração de 50 mg/mL, observamos que a contagem inicial de parasitas era de 36 epimastigotas, a qual diminuiu para 30 epimastigotas no tempo 0 h. Após 24 h, ocorre uma redução de 95 para 75 epimastigotas; ao fim de 48 h, a contagem caiu de 193 para 109 epimastigotas. Nos intervalos subsequentes, verificou-se uma diminuição contínua no número de parasitas: de 380 para 204 epimastigotas após 72 h e de 484 para 164 epimastigotas após 96 h.

Na concentração de 80 mg/mL, os resultados demonstraram uma diminuição similar no número de parasitas. No tempo 0 h, a contagem era de 36 epimastigotas, diminuindo para 22 epimastigotas. Após 24 h, ocorreu uma redução de 95 para 53 epimastigotas; após 48 h, a contagem caiu de 193 para 65 epimastigotas. As observações posteriores indicaram uma progressiva diminuição no número de parasitas: de 380 para 59 epimastigotas após 72 h e de 484 para 52 epimastigotas após 96 h.

Avaliando a concentração de 100 mg/mL, as observações mostraram uma tendência semelhante de redução no número de parasitas. Inicialmente, foram contados 36 epimastigotas, que diminuíram para 24 após 0 horas. Após 24 horas, observou-se uma redução de 95 para 25 epimastigotas; após 48 horas, a contagem diminuiu de 193 para 21 epimastigotas. Em intervalos posteriores, constatou-se uma diminuição gradual no número de parasitas: de 380 para 21 epimastigotas após 72 horas e de 484 para 21 epimastigotas após 96 horas.

A análise percentual (**Tabela 2**) indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato bruto de *Trichilia lepidota* nas respectivas concentrações a partir de 24 h até 96 h.

As alterações morfológicas mais significativas no *Trypanosoma cruzi* (**Figura 11**) foram identificadas através da microscopia óptica. Essas alterações incluem a observação de um corpo arredondado, a ausência de flagelo e a presença de parasitas em configuração dupla.

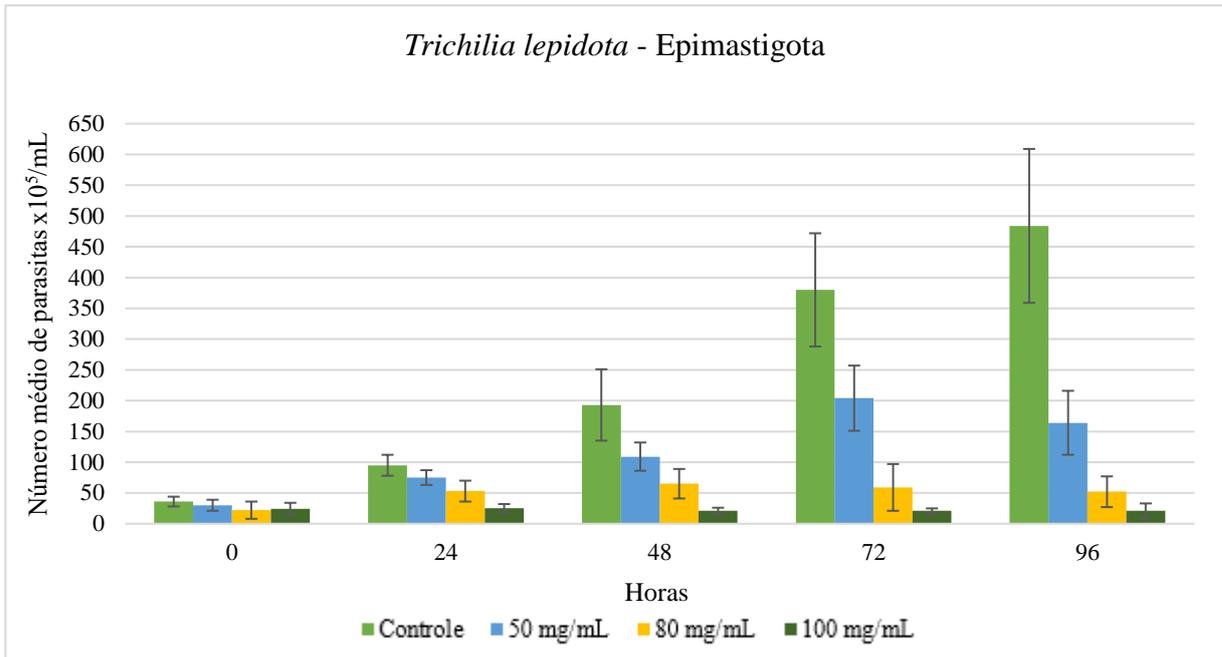


Figura 10. Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após a incubação com diferentes concentrações (50, 80 e 100 mg/mL) do extrato foliar de *Trichilia lepidota* em diferentes tempos.

TRATAMENTOS	TEMPO 24 H	TEMPO 48 H	TEMPO 72 H	TEMPO 96 H
CONTROLE	95 (0%)	193 (0%)	380 (0%)	484 (0%)
50 mg/mL	21,05%	43,52%	46,32%	66,12%
80 mg/mL	44,21%	66,32%	84,47%	89,26%
100 mg/mL	73,68%	89,12%	94,47%	95,66%

Tabela 2. Análise percentual da *Trichilia lepidota* sob os epimastigotas. A tabela indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato nas respectivas concentrações a partir de 24 h.

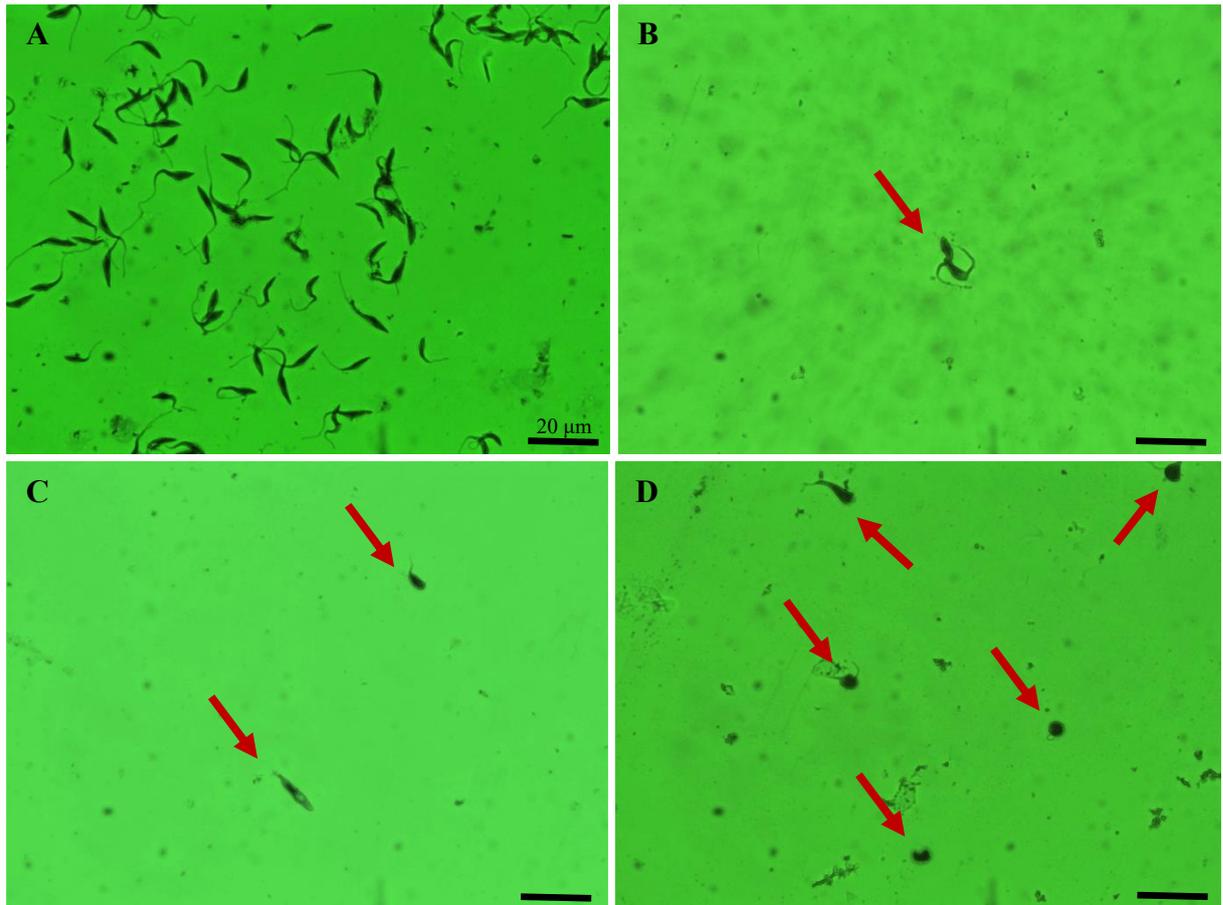


Figura 11. Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia lepidota*. **(A)** Controle – 96 h. **(B)** Tratado – 80 mg/mL; 48 h. **(C)** Tratado – 80 mg/mL; 72 h. **(D)** Tratado – 80 mg/mL; 96 h. As setas vermelhas indicam as alterações morfológicas.

5.4 Análise quantitativa e morfológica de *Trichilia hirta* contra epimastigota

Os efeitos do extrato bruto de *Trichilia hirta* (**Figura 12**) foram avaliados em três diferentes concentrações: 50 mg/mL, 80 mg/mL e 100 mg/mL, contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Para a concentração de 50 mg/mL, observamos que não houve redução de parasitas no tempo 0 h. Após 24 h, ocorre uma redução de 212 para 126 epimastigotas; ao fim de 48 h, a contagem caiu de 293 para 213 epimastigotas. Nos intervalos subsequentes, verificou-se uma diminuição contínua no número de parasitas: de 408 para 215 epimastigotas após 72 h e de 491 para 223 epimastigotas após 96 h.

Na concentração de 80 mg/mL, os resultados não demonstraram uma diminuição no número de parasitas no tempo 0. Após 24 h, ocorreu uma redução de 212 para 153 epimastigotas; após 48 h, a contagem caiu de 293 para 204 epimastigotas. As observações posteriores indicaram uma progressiva diminuição no número de parasitas: de 408 para 189 epimastigotas após 72 h e de 491 para 148 epimastigotas após 96 h.

Avaliando a concentração de 100 mg/mL, as observações não mostraram uma redução no número de parasitas no tempo 0. Após 24 horas, observou-se uma redução de 212 para 139 epimastigotas; após 48 horas, a contagem diminuiu de 293 para 177 epimastigotas. Em intervalos posteriores, constatou-se uma diminuição gradual no número de parasitas: de 408 para 105 epimastigotas após 72 horas e de 491 para 52 epimastigotas após 96 horas.

A análise percentual (**Tabela 3**) indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato bruto de *Trichilia hirta* nas respectivas concentrações a partir de 24 h até 96 h.

As alterações morfológicas mais significativas no *Trypanosoma cruzi* (**Figura 13**) foram identificadas através da microscopia óptica. Essas alterações incluem a observação de um corpo arredondado, a ausência de flagelo e a presença de parasitas em configuração dupla.

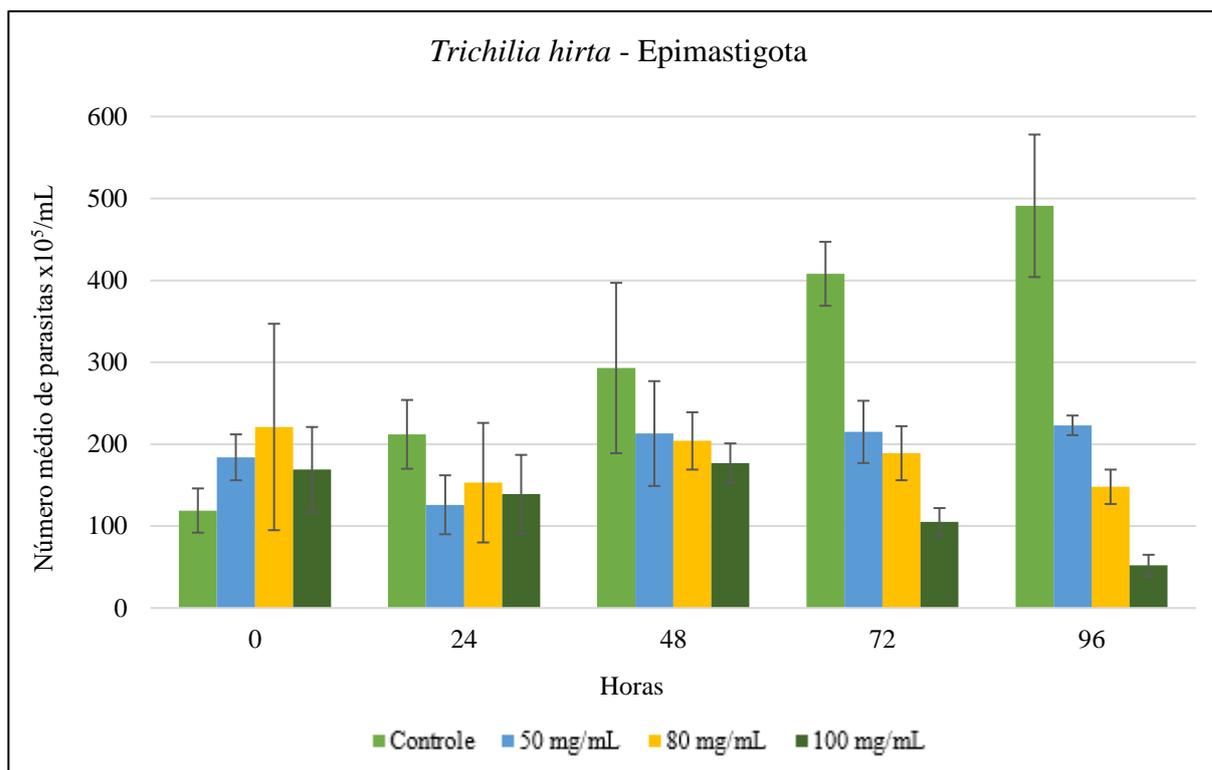


Figura 12. Representação gráfica do número médio de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após a incubação com diferentes concentrações (50, 80 e 100 mg/mL) do extrato foliar de *Trichilia hirta* em diferentes tempos.

TRATAMENTOS	TEMPO 24 H	TEMPO 48 H	TEMPO 72 H	TEMPO 96 H
CONTROLE	212 (0%)	293 (0%)	408 (0%)	491 (0%)
50 mg/mL	40,57%	27,30%	47,30%	54,58%
80 mg/mL	27,83%	30,38%	53,68%	69,86%
100 mg/mL	34,43%	39,59%	74,26%	89,41%

Tabela 3. Análise percentual da *Trichilia hirta* sob os epimastigotas. A tabela indica a redução de parasitas em porcentagem após o tratamento com o extrato nas respectivas concentrações a partir de 24 h.

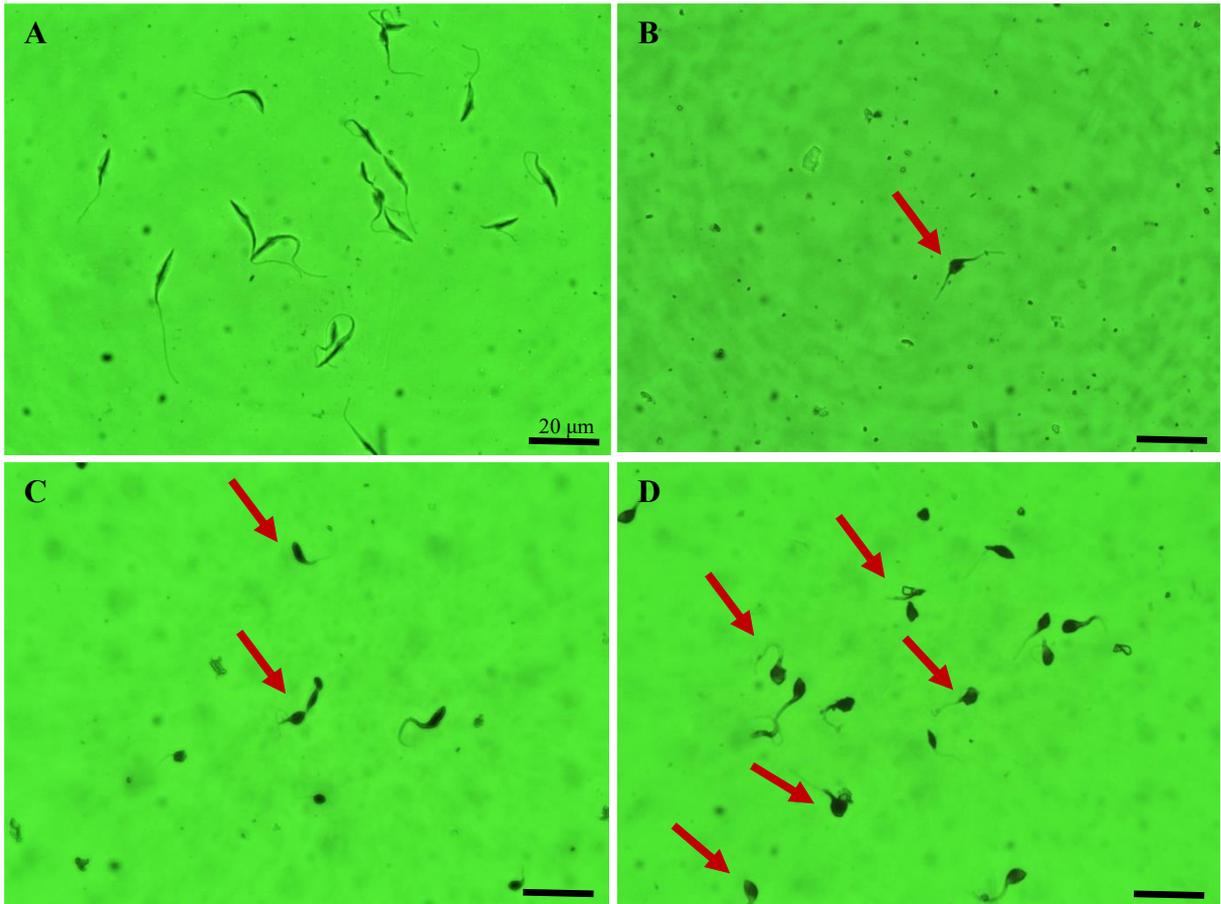


Figura 13. Principais alterações morfológicas após o tratamento com *Trichilia hirta*. (A) Controle – 24 h. (B) Tratado – 50 mg/mL; 24 h. (C) Tratado – 100 mg/mL; 72 h. (D) Tratado – 80 mg/mL; 96 h. As setas vermelhas indicam as alterações morfológicas.

6 DISCUSSÃO

Diante da considerável importância médica e socioeconômica inerente à doença de Chagas e da urgente necessidade de novas abordagens terapêuticas, emerge a demanda por avaliar extratos naturais com potencial para fortalecer a resposta imunológica ou operar através de diferentes mecanismos terapêuticos. Dentro desse cenário, suscita interesse à investigação do extrato derivado do gênero *Trichilia*, devido às suas propriedades abordadas na literatura, que englobam atividades antimicrobianas, antivirais, antitumorais e anti-inflamatórias (PASSOS *et al.*, 2021).

A pesquisa de compostos naturais tem recebido crescente atenção no âmbito das alternativas terapêuticas para doenças parasitárias, proporcionando a identificação de substâncias potencialmente tripanocidas (DUSCHAK, 2016). Com base nas propriedades medicinais descritas para as diferentes espécies de *Trichilia*, este trabalho analisou três extratos foliares oriundos das espécies *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta*, frente aos epimastigotas do *Trypanosoma cruzi in vitro*.

Diversos trabalhos publicados relatam a atividade biológica de membros da família Meliaceae como importantes produtores de compostos com ação antimicrobiana, como *Bacillus coagulans*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*. Os experimentos executados com os extratos metanólicos de folhas, cascas de raízes e caules de *Horsfieldia helwigii* e *Melia azedarach* demonstraram um amplo espectro de atividade antibacteriana. A atividade foi aumentada no fracionamento (gasolina, diclorometano, acetato de etila), particularmente na fração petrolífera das folhas de *Horsfieldia helwigii* e na fração diclorometano da casca do caule de *Melia azedarach* (KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2001).

A atividade inseticida é a mais abordada no meio científico, como destacado por alguns autores ao analisarem os efeitos dos extratos e de limonoides sobre diferentes fases do ciclo de vida de algumas pragas (TAN e LUO, 2011). No entanto, há relatos sobre outras propriedades medicinais, além da baixa toxicidade atribuída aos extratos de plantas obtidos dessa família. Dentre as espécies utilizadas como inseticida, o nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), é a espécie popularmente mais conhecida e, cujo espectro de ação é bastante amplo tendo seu efeito comprovado sobre aproximadamente 400 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002).

Borgoni e Vendramim, (2005) avaliam o efeito de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. claussenii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*), sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. As

folhas de milho foram imersas nos extratos a 1% (peso/volume) - 1 g de pó em 100 mL de água destilada e fornecidas a lagartas de primeiro ínstar. Os efeitos na sobrevivência, na duração, no peso de lagartas e pupas foram avaliados. Os extratos de ramos de *T. pallida* e de folhas de *T. pallens* foram os mais eficientes dentre as seis espécies de *Trichilia* testadas, pois afetaram todos os parâmetros avaliados. Embora os extratos de folhas de *T. pallida*, *T. catigua*, *T. casaretti* e *T. elegans* e os extratos de ramos de *T. claussemi* e *T. pallens* também tenham afetado o desenvolvimento do inseto.

Em outro estudo, a atividade biológica de extratos orgânicos de folhas, galhos e frutos de *Cedrela fissilis* e de *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae), além do caule e das raízes de *Cedrela fissilis*, foi avaliada sobre *Spodoptera frugiperda* - desenvolvidas em condições laboratoriais. Os extratos orgânicos foram incorporados à dieta artificial na proporção de 100 mg de extrato para 100 g de dieta e oferecidos a *Spodoptera frugiperda* durante o seu período larval. Os parâmetros avaliados foram duração, peso das pupas e mortalidade das fases larval e pupal. O extrato diclorometano de folhas de *Cedrela fissilis* apresentou maior atividade inseticida, no qual ocorreu um alongamento da fase larval, seguido por uma diminuição do peso pupal, além de uma taxa de mortalidade larval de 63,3 % (MATOS *et al.*, 2010).

O extrato etanólico dos frutos maduros de *Melia azedarach* também se mostrou fungistático (CIM 50 - 300 mg/mL) e fungicida (MFC 60 - 500 mg/mL) contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Microsporum canis* e *Candida albicans* (CARPINELLA *et al.*, 1999).

Outra pesquisa descreve a atividade anti-muda observada no extrato metanólico bruto e em diversas frações cromatográficas obtidas de sementes de *Melia azedarach*. Para isso, as ninfas de quarto ínstar de *Rhodnius prolixus*, um triatomíneo hematófago conhecido por ser o segundo mais importante transmissor da doença de Chagas, foram utilizadas e o material teste foi dissolvido em EtOH-salina (1:4) e alíquotas foram adicionadas ao sangue para obter as concentrações finais desejadas, entre 10 e 100 mg/mL. Em concentrações mais elevadas, o extrato bruto apresentou fagoinibição, o que impossibilitou o estudo da atividade anti-muda. Em contrapartida, os resultados com as frações cromatográficas inibiram 100% da muda de *Rhodnius prolixus* a 25 µg/mL de sangue e outras frações que continham, entre os constituintes majoritários, fitoesteróis clássicos (colesterol, campesterol e estigmasterol), quatro lignanas e um triterpeno, todos eram desprovidos de atividade anti-muda (CABRAL *et al.*, 1996).

Segundo Nathan *et al.*, (2006), o extrato de *Melia azedarach* apresenta eficácia contra o vetor da malária - *Anopheles stephensi*. Os extratos metanólicos de folhas e sementes do cinamomo foram testados contra o mosquito vetor maduro e imaturo *Anopheles stephensi* em

condições de laboratório e apresentaram forte atividade larvicida, pupicida, adulticida, antiviosposicional, repelência e dissuasão de mordidas. Os extratos de sementes apresentaram alta bioatividade em todas as doses, enquanto os extratos de folhas foram ativos apenas na dose mais elevada. Os resultados obtidos mostraram que os extratos de sementes suprimiram a atividade pupal e adulta de *Anopheles stephensi*, mesmo em doses baixas. Em geral, as larvas de primeiro e segundo ínstares foram mais suscetíveis tanto às folhas quanto aos extratos de sementes. Todo o desenvolvimento de *Anopheles stephensi* foi inibido pelo tratamento com *Melia azedarach*.

Uma pesquisa demonstrou a atividade pediculicida e ovicida *in vitro* de extrato e óleo de frutos de *Melia azedarach*, ambos os produtos vegetais e testados individualmente ou em combinação. Os tratamentos em piolhos adultos com soluções de extrato, óleo e combinações dos dois apresentaram valores de mortalidade significativamente maiores, variando de 62,9% a 96,5%, do que o respectivo controle, que apresentou 21,9% de mortalidade. Já o óleo foi ligeiramente mais eficaz do que o extrato de fruta nas mesmas concentrações de teste, embora não tenham sido observadas diferenças significativas em concentrações mais baixas. A formulação elaborada com extrato e óleo a 10%, mais adição de emulsificante e conservante, apresentou atividade pediculicida de 92,3%. Os produtos também tiveram sucesso em retardar ou inibir a emergência de ninfas (CARPINELLA *et al.*, 2007).

Um estudo realizado com os extratos brutos hidroalcolócos das folhas, casca, semente e caule de *Passiflora cincinnata* tiveram suas atividades antiparasitárias testadas frente ao *Trypanosoma cruzi* e não apresentaram atividade relevante (DELMONDES *et al.*, 2014). Já o extrato vegetal de *Mentha arvensis* apresentou atividade anti-trypanosoma e anti-leishmania em testes *in vitro* e demonstrou promissora atividade contra as cepas, apresentando 65 e 47% de inibição em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* em 500 µg/mL, respectivamente. Além disso, apresentou 25% de inibição para *Trypanosoma cruzi* em uma concentração de 100 µg/mL, mas nesta concentração não foi observada atividade contra *Leishmania braziliensis*. Neste mesmo estudo, os autores testaram *Turnera ulmifolia* e os resultados foram de 29% e 9% de inibição em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* em 500 µg/mL, respectivamente. No entanto, não houve atividade quando a concentração testada foi 100µg/mL (SANTOS *et al.*, 2012).

A partir do extrato da planta de *Dracocephalum kotschy* foram obtidos metabólitos potencialmente ativos contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Os glicosídeos monoterpênicos, juntamente com os terpenóides e fitoesterol foram isolados e as suas estruturas foram determinadas: limonen-10-al (1), geranial (2), neral (3), β-sitosterol (4), ácido oleanólico

(5), ácido ursólico (6), p-menta-8-en-1,2-diol (7), ácido colosólico (8), limonen-10-ol 10-O- β -D-glucopiranosídeo (9) e limonen-10-ol 10-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo (10). Os compostos 1 (3,1 μ M), 2 (3,1 μ M), 3 (3,1 μ M), 5 (6,2 μ M), 6 (6,2 μ M) e 8 (6,2 μ M) foram eficazes contra os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SAEIDNIA *et al.*, 2004)

Em nosso laboratório, apresentamos os resultados de uma investigação sobre a atividade antiprotozoária e antifúngica de três espécies de plantas do gênero *Palicourea* (Rubiaceae): *Palicourea marcgravii*, *Palicourea rudgeoides* e *Palicourea tetraphylla*. Os testes foram realizados *in vitro* em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL) em 24 h contra: epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e filamentos do fungo *Fusarium solani*. As folhas das plantas foram secas, pulverizadas e submetidas à extração exaustiva com metanol e este extrato foi fracionado em acetato de etila, água, butanol, diclorometano e hexano. As frações produzidas por butanol, metanol e acetato de etila de *Palicourea rudgeoides* foram os melhores na redução de epimastigotas, pois o crescimento dos epimastigotas foi inibido e a morfologia foi alterada, ocasionando retração no corpo do parasito devido à perda de conteúdo citoplasmático, além de causar enrugamento da membrana plasmática. Nenhum dos extratos exibiu atividade inibitória no desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos testados (ALEXANDRINO *et al.*, 2016).

Outros trabalhos com extratos naturais também foram realizados contra *Toxoplasma gondii* utilizando extratos aquosos de folhas de *Azadirachta indica* (nim) e *Melia azedarach* (Santa Bárbara ou canela) nas seguintes concentrações: 0.15, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 e 5 mg mL⁻¹. Após o tratamento com nim e canela por 24 h, a porcentagem de infecção e o número de taquizoítos intracelulares decaiu drasticamente. Este efeito foi concentração-dependente. Durante a incubação dos extratos, uma progressiva desorganização morfológica e ultraestrutural levaram a formação de intensa vesiculação e completa destruição do parasita, que passou a uma estrutura amorfa, antes da completa eliminação do meio intracelular. No entanto, durante o tratamento com os extratos, efeitos morfológicos não foram observados nas estruturas da célula hospedeira. Resumidamente, o nim reduziu progressivamente a infecção em 2 mg mL⁻¹ (60%), 3 mg mL⁻¹ (75%) e 5 mg mL⁻¹ (85%), respectivamente. Essa diminuição da infecção está associada à eliminação de taquizoítos intracelulares. Em concentrações mais baixas (0,1 e 1 mg mL⁻¹), não foi observado efeito significativo na infecção ou redução de parasitas intracelulares (MELO; VILELA; CARVALHO, 2011).

Um estudo investigou a ação de um extrato proteico e de uma fração enriquecida com inibidor de protease da torta de sementes de *Jathropa curcas* no desenvolvimento de taquizoítos

de células Vero infectadas com *Toxoplasma gondii*. O extrato proteico (Jc CE) foi obtido após solubilização da torta de sementes de *Jathropa curcas* com tampão borato de sódio 100 mM, pH 10, centrifugação e diálise do sobrenadante resultante com o tampão extrator. O extrato proteico (Jc CE) foi utilizado para os ensaios *in vitro* de atividade anti-toxoplasma nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5, 1,5, 3,0 e 5,0 mg/mL por 24 h. Os resultados mostraram que Jc CE reduziu a porcentagem de infecção e o número de parasitas intracelulares, mas não teve efeito na morfologia das células Vero até 3,0 mg/mL. A fração enriquecida com inibidor de cisteína protease reduziu o número de células infectadas por *Toxoplasma gondii* e o de parasitas intracelulares. Estes resultados sugerem que o Jc CE e a fração enriquecida com o inibidor de cisteína protease interferem no crescimento intracelular de *Toxoplasma gondii* (SOARES *et al.*, 2015).

Outro estudo analisou a atividade de defensinas recombinantes e naturais de sementes de *Vigna unguiculata* contra promastigota de *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostram que a *Leshmania* tratada com a defensina recombinante (*Vu* -Defr) levou à eliminação de 54,3% e 46,9% dos parasitas em 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Em contrapartida, a semente natural (*Vu* -Def) eliminou 50% e 54,8% dos parasitas em 24 e 48 horas, respectivamente. Ambos foram utilizados na concentração de 100 µg/mL. Estes resultados sugeriram o potencial das defensinas vegetais para serem utilizadas como novas substâncias antiparasitárias (SOUZA *et al.*, 2013).

Embora o mecanismo de ação dessas espécies de *Trichilias* não seja conhecido e ainda seja necessário mais estudos sobre a composição bioquímica dos compostos e análises ultraestruturais dos parasitos tratados com os extratos foliares, os resultados obtidos neste trabalho revelaram que os extratos de *Trichilia* possibilitaram a inibição do crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, pois as culturas submetidas aos tratamentos apresentaram alterações morfológicas e redução no número de parasitas.

7 CONCLUSÃO

Os extratos brutos de *Trichilia* inibiram o crescimento *in vitro* de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A testagem com os extratos brutos de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta* contra o epimastigota demonstrou alterações morfológicas, como um corpo arredondado, a ausência de flagelo e a presença de parasitas em configuração dupla.

As três plantas utilizadas apresentaram um bom resultado na inibição do crescimento de parasitas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, C. R. *et al.* Bioactivity of leaf extracts from species of *Palicourea* (Rubiaceae). **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 489–496, 2016.
- ANDRADE, J. P. D. *et al.* **I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica**. 2011.
- ARAS, R. *et al.* **Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil**. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n°3, p. 359-363. 2003.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. Ciclo evolutivo. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em 15 março 2023.
- BARRIAS, E. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 14, p. 1340–1351, 2012.
- BERN, C. *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.
- BERN, C. *et al.* Chagas disease and the US blood supply. **Current Opinion in Infectious Disease**, [S.l.], v. 21, p. 476-482, 2008.
- BORGONI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito Subletal de Extratos Aquosos de *Trichilia spp.* Sobre o Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 311 - 317, mar./abr. 2005.
- CABRAL, M. M. O. *et al.* Anti-moulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 117-118, 1996.
- CALER, E. V *et al.* Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975–86, 1998.
- CARPINELLA, M. C. *et al.* Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. **Fitoterapia**, v. 70, n. 3, p. 296-298, 1999.
- CARPINELLA, M. C. *et al.* *In vitro* pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 2, p. 250-256, 2007.
- CIMERMAN, B.; CEMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, 2008. p. 81-112.
- COC. **De casa nova: o acervo Carlos Chagas chega ao CDHS**. 2021. Disponível em: <https://www.coc.fiocruz.br/index.php/pt/todas-as-noticias/2059-de-casa-nova-o-acervo-carlos-chagas-chega-ao-cdhs.html#!carlos_chagas_laboratorio>. Acesso em 10 julho 2023.
- COSTA, M. *et al.* Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is need - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, suppl. 1, p. 113-122, 2007.
- CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 845-867, 2010.
- CNCFLORA. **Trichilia hirta in Lista Vermelha da flora brasileira** versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Trichilia_hirta>. Acesso em 20 julho 2023.

- DE ALMEIDA, A. M. V. *et al.* Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e de transmissão Chagas disease: Epidemiological, physiopathological and transmission aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 18931-18944, 2021.
- DE CARVALHO, L. P.; DE MELO, E. J. T. Life and death of *Trypanosoma cruzi* in presence of metals. **Biomaterials**, v. 30, p. 955-974, 2017.
- DE CARVALHO, L. P.; HELD, J.; DE MELO, E. J. T. Essential and nonessential metal effects on extracellular *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Experimental parasitology**, v. 209, p. 107826, 2020.
- DE CARVALHO, T. U. FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. Organização estrutural. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>>. Acesso em 22 julho 2023.
- DE CASTRO, S. L.; SOEIRO M. N. C. FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. Tratamento. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em 20 julho 2023.
- DELMONDES, G.A. *et al.* Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* Mast L. **Caderno de Cultura e Ciência**, v.13, n.1, p.31-38, 2014.
- DEWICK, P. M. **Produtos medicinais naturais: uma abordagem biossintética**. John Wiley & Filhos, 2002.
- DIAS, J.C.P.; AMATO NETO, V. **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil**. Revista História sobre a Doença de Chagas no Brasil, v. 44, nº2. 2011.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990.
- DOCAMPO, R.; SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man**. Nature Reviews Microbiology, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.
- DUSCHAK, G. V. Targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease in the last 15 years-period. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 11, n. 2, p. 74-173, 2016.
- FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. **Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária**. Vigilância Sanitária em Debate, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical research**, v. 28, p. 2758-2770, 2011.
- GILBER, S. R. **Reação em cadeia da polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (enzima imuno ensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas**. Curitiba-PR. Dissertação em processos biotecnológicos, setor de tecnologia. Universidade Federal do Paraná. 2007.
- HERNÁNDEZ SOSA, E. *et al.* Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 32, n. 1, p. 93-101, 2013.
- KHALAFALLA, A. I.; HUSSEIN, M. F.; BORNSTEIN, S. Tripanossomose. **Doenças infecciosas de camelos dromedários: um guia conciso**, p. 273-296, 2021.
- KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwiigi* and *Melia azedarach*. **Fitoterapia**, v.72, p.423-427, 2001.
- KROPF, S. P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA L. O. **Doença de Chagas: construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil**. Revista Ciência & Saúde Coletiva. v. 5, nº 2, p. 347-365. 2000.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 03, 1 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2009.
- LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a world wide health problem. **Frontiers in public**

health, v. 7, p. 166, 2019.

MARTINEZ, S. S. O nim: *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. In: **O NIM: *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. 2011. p. 205-205.

MATOS, A. P. *et al.* Atividade de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (*Meliaceae*) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*). **BioAssay**, v. 5, 2010.

MELO, E. J. T.; VILELA, K. J.; CARVALHO, C. S. Effects of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss.(neem) and *Melia azedarach* L. (Santa Barbara or cinnamon) on the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 215-222, 2011.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M.M. **O controle da transmissão transfusional**. Rev.História sobre a Doença de Chagas no Brasil, v. 44, supl. II, p. 64-67, 2011.

NATHAN, S.S. *et al.* Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource technology**, v. 97, n. 11, p. 1316-1323, 2006.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: editora Atheneu. 2005. p. 85-108.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar** 1.ed. São Paulo: Santos, 2010, p.1-15.

NTALLI, N. G. *et al.* Cytotoxic tirucallane triterpenoids from *Melia azedarach* fruits. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 5866-5877, 2010.

NWAKA, S.; HUDSON, A. **Innovative lead discovery strategies for tropical diseases**. Nature Reviews Drug Discovery, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Doença de Chagas**. 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 25 julho 2023.

PAHO. Pan American Health Organization. **Doença de Chagas**. 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em 15 julho 2023.

PASSOS, M. S. *et al.* Limonoids from the genus *Trichilia* and biological activities. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-32, 2021.

PATRÍCIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (*Meliaceae*) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**. Curitiba, v. 34, p. 27 – 71, 2005.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PENNINGTON, T. D.; ESTILOS, B. T. Uma monografia genérica das *Meliaceae*. **Blumea: Biodiversidade, Evolução e Biogeografia das Plantas**, v. 22, n. 3, pág. 419-540, 1975.

PENNINGTON, T. D. **Flora Neotropica: Meliaceae**. Monograph 28. New York, NY: New York Botanical Garden, 1981. 470 p.

PENNINGTON, T. D. Systematic Treatment of American *Trichilia* (*Meliaceae*). In: PENNINGTON, T. D.; CLARKSON, J. J. (Ed.) **A revision of American Trichilia (Meliaceae)**. Phytotaxa, Auckland, v. 259, n. 1, 2016, p. 18 – 162.

POULOSE, S. M.; HARRIS, E. D.; PATIL, B. S. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 4, p. 870-877, 2005.

PUPO, M. T. *et al.* Androstane e pregnane 2 β , esteróides 19-hemicetal de *Trichilia clausenii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, pág. 1495-1500, 1997.

- PUPO, M. T. *et al.* Terpenoids and steroids from *Trichilia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 382-388, 2002.
- RABELO, D. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss (*Meliaceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 230-236, 2013.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Doença de Chagas. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, pág. 1388-1402, 2010.
- RODRIGUES, G. M. *et al.* Agravos causados pela Doença de Chagas no ser humano: Revisão sobre as características do *Trypanosoma cruzi*. **Revista Liberum Accessum**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 2020.
- SAEIDNIA, S. *et al.* Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.52, p.1249-1250, 2004.
- SALES, P. A. *et al.* **Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.
- SANAR. **Resumo sobre doenças infecciosas: tuberculose, chagas, arboviroses, HIV e esquistossomose**. 2021. Disponível em: <<https://www.sanarmed.com/resumo-sobre-doencas-infecciosas-tuberculose-chagas-arboviroses-hiv-e-esquistossomose>>. Acesso em 12 julho 2023.
- SÁNCHEZ VALDÉZ, F. J. *et al.* *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 3, p. 198–205, 2013.
- SANTOS, K. K. A. *et al.* Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.11, n.2, p.147-153, 2012.
- SESA. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/doenca-de-chagas>>. Acesso em 22 julho 2023.
- SILVA, E. L. F. M. D. A doença de Chagas: repercussões de uma descoberta científica brasileira em Portugal, 1909-1924. **Ler História**, n. 80, p. 159-178, 2022.
- SIMMONDS, M. S. J. *et al.* Insect Antifeedant Activity of Three New Tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1117-1120, 2001.
- SOARES, A. M. S. *et al.* A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 111–117, 2015.
- SOUZA, W. *et al.* **Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi***. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 72, n. 3, p. 422-432, 2000.
- SOUZA, W. **Structural organization of *Trypanosoma cruzi***. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 89–100, 2009
- SOUZA, W. D.; BARRIAS, E. S. FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. Ciclo Evolutivo. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em 15 março 2023.
- SOUZA, G. S. *et al.* Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 135, p. 116–25, 2013.
- TAKAMIYA, N. T. *et al.* Investigação da doença de Chagas em um mesmo núcleo familiar: estudo de caso. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 693-704, 2020.
- TAN, Q. G.; LUO, X. D. *Meliaceous* limonoids: chemistry and biological activities. **Chemical reviews**, v. 111, n. 11, p. 7437-7522, 2011.
- TANOWITZ, H.B. *et al.* Chagas' Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 5, p. 400-419, 1992.

TAVARES, P. C. B. *et al.* **Expressão gênica de proteínas associadas ao reparo de membrana e dinâmica do citoesqueleto de actina em mioblastos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.** 2016.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease.** 2012.

TONELLI, R. R. *et al.* Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature *in vivo*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e864, 2010.

TURRENS, J. F. *et al.* Reductase By Benznidazole and Anthelmintic Imidazole Derivatives. **Elsevier Science B.V.**, v. 82, p. 125–129, 1996.

VIEIRA, I. J. C. *et al.* A new sesquiterpene from *Trichilia casarettii* (*Meliaceae*). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 70, 2010.

VIEIRA, I. J. C. *et al.* Two novel cycloartane-type triterpenes from *Trichilia casaretti* C. DC. (*Meliaceae*). **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 949, 2018.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOTÝPKA, J. *et al.* New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460-469, 2015.

WENDEL, S. **Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control?** *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 28–34, 2010.

WOOLSEY, A. M. *et al.* Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 17, p. 3611–22, 2003.

WHO. World Health Organization. **Doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana)**. 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em 6 julho 2023.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. C. **Parasite and host cell signaling during the invasion process.** Capítulo 6 em *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*, edited by Barbara A. Burleigh and Dominique Soldati-Favre. ©2008 Landes Bioscience and Springer ScienceBusiness Media.