

TIAGO DE ANDRADE PEREIRA

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Aiouea trinervis* E *Guarea kunthiana* SOBRE AS
FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

CAMPO GRANDE

2016

TIAGO DE ANDRADE PEREIRA

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Aiouea trinervis* E *Guarea kunthiana* SOBRE AS
FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do grau de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, sob a orientação da Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira.

CAMPO GRANDE

2016

Dedico este trabalho a Deus, a minha esposa que me concedeu a graça de um filho lindo que veio para nos alegrar e trazer vida e movimento para nosso lar e a todas as pessoas que um dia me proporcionaram um voto de confiança em especial minha mãe Nilda, Tia Lena e vó Terezinha.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento é ao Senhor Jesus Cristo que é a fonte da minha força e determinação de onde flui todo discernimento para que façamos uma pesquisa boa e idônea que poderá contribuir para avanços terapêuticos e assim ajudar ao nosso próximo que necessita desse conhecimento.

À minha esposa Bianca que sempre esteve ao meu lado em todas as minhas decisões me incentivando em meus sonhos e que agora carrega em seu ventre um dos maiores presentes que um casal pode ter.

À minha família que sempre esteve comigo me incentivando e contribuindo com valores que não são adquiridos no meio acadêmico, especialmente à minha mãe Nilda, Tia Lena e minha vó Terezinha, vocês têm minha eterna gratidão.

À professora Alda Maria, que desceu vários degraus da sua vida acadêmica para pegar em minhas mãos e me ensinar a subir passo a passo com muita paciência e didática e o mais importante com sorriso no rosto e com alegria contagiantes. Pelos conselhos e conversas durante esses dois anos do qual passamos do patamar de orientando e orientadora para parceiros e amigos. Muito obrigado.

À professora Inês que só a fama me assustava, porém tive a oportunidade de conhecê-la melhor e ver a pessoa prestativa, parceira e disposta a ajudar em qualquer momento e situação e que toda “brabeza” era para que nós alunos acordássemos para vida e pudéssemos crescer. A ti, meu muito obrigado!

Aos professores André e Cacilda, pelos momentos prazerosos de conversa. Apreendi muito com seus conselhos e experiências.

Ao professor Carlos Eurico pela análise estatística e pelo tempo investido para me ajudar.

Aos meus colegas do laboratório: Ana Paula, Camila, Carol, Cynthia, Felipe, Gustavo, Júlio, Karla, Larissa, Leandro, Mariana e minha parceira Fabiola.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundect (Fundação De Apoio Ao Desenvolvimento Do Ensino, Ciência e Tecnologia Do Estado De Mato Grosso Do Sul), pelo apoio financeiro.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King

RESUMO

Após um século da descoberta da doença de Chagas existem aproximadamente seis milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, vivendo principalmente em países do continente Americano. No Brasil, estima-se que sejam três milhões de pessoas infectadas. Os fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas são parcialmente eficazes na fase aguda e ineficazes na fase crônica da doença, além de provocarem efeitos adversos e toxicidade sistêmica. Sabe-se que produtos naturais são uma fonte atrativa de compostos de estruturas variadas que apresentam atividades biológicas potentes e desejáveis perfis farmacológicos e esse fato tem sido evidenciado por diversas pesquisas que avaliam a ação anti *Trypanosoma* de diversos produtos oriundos de plantas. Neste trabalho foi avaliado o efeito de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis* e *Guarea kunthiana* sobre o crescimento, morfologia e integridade de membrana de formas epimastigotas de *T.cruzi* Dm28. Os dados obtidos revelaram que ambos os extratos inibem o crescimento dos parasitas. O tratamento causou alterações morfológicas como aumento do flagelo, diminuição do cinetoplasto, perímetro total e largura do parasita os quais são alvos promissores para busca de novos quimioterápicos. O tratamento dos parasitas com extrato de *G. kunthiana* induziu a permeabilização da membrana citoplasmática, alterando a viabilidade celular das células. Os resultados sugerem a presença de compostos com atividade anti-*Trypanosoma* nos extratos avaliados.

Palavras chave: Doença de Chagas, Extratos vegetais, *Meliaceae*, *Lauraceae*.

ABSTRACT

After a century of Chagas disease discovery there are about six million people infected with *Trypanosoma cruzi*, mainly living in the American continent. In Brazil, is estimated to be three million people infected. The drugs used for the treatment of Chagas disease are partially effective in acute and ineffective in the chronic phase of the disease, and cause side effects and systemic toxicities. It is known that natural products are an attractive source compounds with many structures which display potent biological activities and pharmacological profiles and this fact has been shown by several studies to assess the anti-*Trypanosoma* action of several products from plants. This study evaluated the effect of ethanol extracts of *Aiouea trinervis* and *Guarea kunthiana* on growth, morphology and membrane integrity of epimastigotes forms of *T. cruzi* Dm28. The data revealed that both extracts inhibit the growth of the parasites caused dramatic morphological changes such as increased of flagellum length, reduction of kinetoplast area, reduction of the circumference and width of the cell. The treatment of parasites with *G. kunthiana* extract induced the membrane permeabilization, affecting the cell viability. These results suggest that there are compounds with anti-*Trypanosome* activities in the extracts evaluated.

Keywords: Chagas disease, Plant Extract, *Meliaceae*, *Lauraceae*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Porcentagem de parasitas após tratamento com a IC₅₀ dos extratos ativos, Campo Grande - 2015..... 30

Tabela 2 Média de diferentes medidas morfométricas de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com a IC₅₀ dos extratos etanólicos de *A. trinervis* e *G. kunthiana*.....33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de casos da infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> , com base em estimativas oficiais e a transmissão vetorial em todo o mundo entre 2006-2009.....	13
Figura 2	Aspecto geral da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	16
Figura 3	Principais formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 4	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	18
Figura 5	Partes aéreas, caule e frutos de <i>Guarea kunthiana</i>	23
Figura 6	Partes aéreas e frutos de <i>Aiouea trinervis</i>	24
Figura 7	Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> Dm28c corados com Giemsa.....	34
Figura 8	Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> Dm28c corados com Giemsa.....	35
Figura 9	Exposição de fosfatidilserina por formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c tratadas com IC ₅₀ de extratos etanólicos ativos analisados por citometria de fluxo.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	12
2.2	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS	13
2.3	<i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.3.1	Estrutura de <i>T.cruzi</i>	14
2.3.2	Ciclo de vida do parasita	16
2.4	DOENÇA DE CHAGAS	19
2.4.1	Fases da doença.....	19
2.4.2	Tratamento.....	20
2.5	PRODUTOS NATURAIS	21
2.5.1	Metabólitos secundários	21
2.6	<i>Guarea kunthiana</i>	22
2.7	<i>Aiouea trinervis</i>	23
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	PARASITA – <i>T. cruzi</i>	27
4.2	EXTRATOS VEGETAIS.....	27
4.3	CONTAGEM E AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	27
4.4	AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA	28
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
4.6	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E INTERIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	EFEITOS DOS EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS	30
5.2	MORFOMETRIA	30

5.3	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA NA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO:	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	42
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como a tripanossomíase americana, é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (CHAGAS, 1909). Ocorre principalmente na América Latina, porém nas últimas décadas tem aumentado o número de casos principalmente nos Estados Unidos da América, Canadá e muitos países europeus. Isto se deve principalmente a movimentos populacionais migratórios (WHO, 2016; COURA; VIÑAS, 2010).

O ciclo de vida de *T. cruzi* ocorre entre hospedeiros vertebrados mamíferos, por exemplo, o homem e insetos hemípteros da família Reduviidae, sub-família Triatominae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* (conhecidos popularmente como barbeiros), os quais podem atuar como vetores. O parasita é transmitido aos seres humanos por contato com as fezes e a urina desses insetos (BRIONES *et al.*, 1999; COURA, 2007).

Embora o ciclo da doença de Chagas tenha sido descrito entre 1909 e 1935, não há ainda uma estratégia quimioterápica efetiva para o seu tratamento, que vem sendo realizado de forma muito mais sintomática do que etiológica (SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012).

Embora passados mais de cem anos da descoberta da doença de Chagas, verifica-se que os fármacos frequentemente utilizados para o tratamento são os mesmos há mais de quarenta anos. Os compostos nitroheterocíclicos, Nifurtimox (Lampit[®] Bayer, 4[(5-nitrofurfurilideno)amino]3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) e Benzonidazol (Rochagan[®] Roche, N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) possuem vários efeitos colaterais como: anorexia, náuseas, vômitos, alergia cutânea e neuropatia periférica (SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012; BOAINAIN; RASSI, 1972).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas não é prioridade para a indústria farmacêutica devido ao alto custo e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento, pois a doença afeta principalmente setores menos favorecidos da sociedade, desassistidos pelo poder público e negligenciados. Por razões econômicas, somente os esforços e persuasão de pesquisadores no estabelecimento de parcerias poderia mudar o cenário atual. Do total de 1.393 fármacos introduzidos no mercado farmacêutico entre 1975 e 1999, menos de 1,1% foram dirigidos para as doenças tropicais, por isso, há necessidade de pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos no combate à doença de Chagas (COURA; CASTRO 2002; SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012).

Aliado a isso, um dos grandes problemas também enfrentados na busca de um fármaco eficiente para o tratamento da doença de Chagas é o fato do parasita possuir um complexo ciclo biológico (BOAINAIN; RASSI, 1979; SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012).

Os produtos naturais representam uma fonte atrativa de compostos de estruturas variadas, com atividades biológicas potentes e desejáveis perfis farmacológicos. Esse fato tem sido evidenciado por diversas pesquisas que avaliam a ação anti *Trypanosoma* de diversos produtos oriundos de plantas (CACERES *et al.*, 1998; DUSCHAK; COUTO, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que plantas da família Meliaceae possuem atividade contra *T.cruzi*. Extratos e compostos isolados (flavonoides e limonóides) de *Cipadessa fruticosa* apresentaram atividade sobre formas tripomastigotas de *T.cruzi* (LEITE *et al.*, 2010).

Nos membros da família Lauraceae são encontradas várias lignanas, compostos que apresentam atividade anti *Trypanosoma* e que também são conhecidas por apresentarem atividades antitumoral, antiviral, antibacteriana e anticarcinogênica (OLIVEIRA, *et al.*, 2005), evidenciando a importância de membros desta família como fontes para novos quimioterápicos.

Nesta perspectiva de novos compostos oriundos de plantas, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de extratos vegetais ativos de *Aiouea trinervis* e *Guarea kunthiana* sobre a estrutura e a integridade de membrana de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Doenças negligenciadas são aquelas enfermidades que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdades, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (BRASIL, 2010).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), existem mais de um bilhão de pessoas portando uma ou mais doenças negligenciadas, representando um sexto da população mundial (BRASIL, 2010).

Com o objetivo de controlar ou erradicar dez doenças tropicais negligenciadas, dentre elas a doença de Chagas, representantes de diversos países, inclusive do Brasil, elaboraram uma proposta coletiva para proposição de metas adicionais, identificação de ferramentas, infraestrutura e recursos necessários para atingir o objetivo global de controle efetivo dessas enfermidades. A Declaração de Londres sobre Doenças Tropicais Negligenciadas, lançada em 2012 ressalta a necessidade atual de novas estratégias para o estudo e controle dessas importantes patologias (TARLETON *et al.*, 2014).

Apesar de existir financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como novos fármacos, métodos de diagnóstico e vacinas (GARCIA *et al.*, 2011; OMS, 2010).

A doença de Chagas, também conhecida como a tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal causada pelo protozoário *T. cruzi*. Encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, sendo principalmente transmitida aos seres humanos por contato com dejetos de triatomíneos (GARCIA, *et al.*, 2011; OMS, 2010; OMS, 2016; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

Estima-se que cerca de seis milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica. Porém nas últimas décadas tem aumentado o número de casos principalmente nos Estados Unidos da América, Canadá e muitos países europeus (Figura 1) (WHO, 2016; COURA; VIÑAS, 2010).

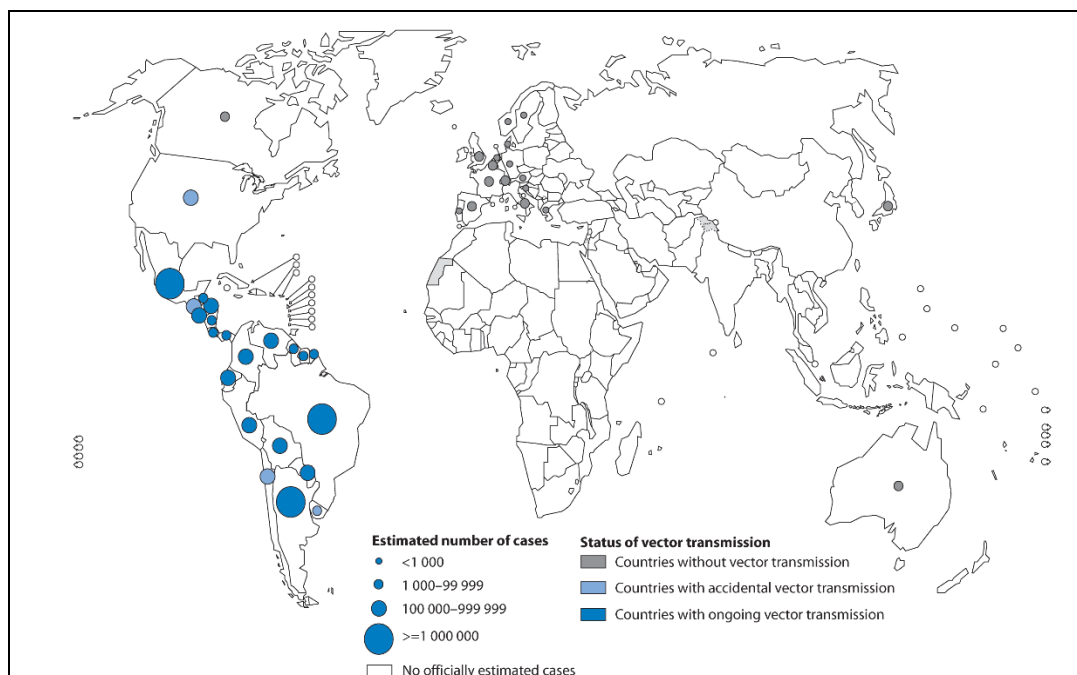


Figura 1-Distribuição de casos da infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base em estimativas oficiais e a transmissão vetorial em todo o mundo entre 2006-2009.

Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png

2.2 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Após a chegada a Lassance-MG em 1907, Carlos Chagas iniciou seu trabalho como médico, identificando enfermos que apresentavam um quadro clínico caracterizado por arritmias e sinais de insuficiência cardíaca. Além disso, chamou sua atenção a frequente e inexplicável ocorrência de morte súbita naquela região. Meses depois, em viagem a Pirapora, soube, pelo engenheiro responsável pelas obras da estrada de ferro, que havia na localidade vários insetos hematófagos (denominados popularmente de “barbeiros”, “chupão” ou “chupança”) (CHAGAS, 1909; REZENDE; RASSI, 2008; SIQUEIRA-BATISTA, *et al.*, 2007).

Os barbeiros normalmente se alojavam nas frestas das paredes dos casebres de “pau-a-pique”. Carlos Chagas recolheu alguns exemplares e, examinando o conteúdo intestinal do inseto, identificou uma nova espécie de protozoário flagelado. Para verificar se aquele micro-organismo era o causador do quadro nosológico encontrado em Lassance, Chagas enviou alguns insetos para que Oswaldo Cruz infectasse primatas da espécie *Callitrix penicillata* (saguís). Posteriormente, durante análises de amostras sanguíneas dos animais, Carlos Chagas constatou a presença do protozoário. Ao retornar a Lassance, constatou também a infecção em

cães, gatos, tatus e gambás, os dois últimos caracterizados como reservatórios do agente (CORREA; SIQUEIRA-BATISTA, R; SIQUEIRA-BATISTA, R, 2007).

2.3 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protozoa, filum Euglenozoa e ordem Kinetoplastea. Esta ordem abrange protozoários flagelados que possuem uma estrutura singular, o cinetoplasto, onde se localiza o DNA mitocondrial (MOREIRA *et al.*, 2004; SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

A família Trypanosomatidae inclui vários gêneros importantes: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças como *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas em humanos nas Américas, *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono em humanos na África Oriental e Ocidental, respectivamente, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum*, agentes de tripanossomíases em bovinos e equinos (DUMAS, 2000).

2.3.1 Estrutura de *T.cruzi*

Além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndria, os tripanosomatídeos apresentam algumas estruturas peculiares, como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcissomos (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

A superfície celular dos tripanosomatídeos é composta pela membrana plasmática, que apresenta um grande número de macromoléculas. Imediatamente abaixo dela está presente uma camada de microtúbulos subpeliculares, os quais conferem estabilidade e resistência à célula. Estes se encontram distribuídos por todo o corpo celular, exceto na região de ligação do flagelo e na região da bolsa flagelar (DE SOUZA, 1984, 2000, 2002).

Todos os membros da família Trypanosomatidae apresentam um flagelo, que emerge de uma área de invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar. Devido à localização específica de vários receptores acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e entrada de nutrientes ocorram nessa região. Outra invaginação menor, localizada próxima à

bolsa flagelar em amastigotas e epimastigotas, o citóstoma, também está envolvido com a absorção de nutrientes (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2007). O flagelo de *T. cruzi* apresenta uma estrutura básica semelhante ao de outras células. Associado ao flagelo encontra-se um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de estrutura paraflagelar (GULL, 1999).

Na parte posterior da célula, existem organelas usualmente esféricas, ácidas denominadas reservossomos. Os reservossomos possuem em seu interior proteinases, principalmente a cruzipaina, além de proteínas ingeridas, oriundas de bolsa flagelar e citóstoma. Acredita-se que os reservossomos sejam compartimentos pré-lisossomais e que durante a metaciclogênese participem como fonte de energia necessária para esse processo (SOARES; SOUTO-PADRÓN; DE SOUZA, 1992; SOARES, 1999).

T. cruzi, assim como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por toda a extensão da célula. O material genético mitocondrial, também denominado de kDNA ou DNA do cinetoplasto, encontra-se concentrado em uma determinada região da mitocôndria localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura denominada de cinetoplasto (DE SOUZA, 2002; SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Distribuídos no citoplasma estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo, delimitados por membrana, onde se acumulam algumas enzimas da via glicolítica e da beta-oxidação de ácidos graxos (HANNAERT *et al.*, 2003; MICHELS *et al.*, 2006; MICHELS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000; MICHELS; OPPERDOES, 1991) e os acidocalcissomos, provavelmente envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (DO CAMPO *et al.*, 2005; DO CAMPO; MORENO, 1999).

Em cada célula está presente um único aparelho de Golgi, localizado entre o núcleo e o cinetoplasto (DE SOUZA, 2002).

O núcleo de *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas. Possui um tamanho relativamente pequeno, medindo aproximadamente 2,5 µm, e sua forma difere entre as diferentes formas do parasita. Em epimastigotas e amastigotas, é ligeiramente esférico, enquanto que em tripomastigotas é alongado e se localiza na região central da célula. A posição do flagelo em relação ao núcleo e ao cinetoplasto também é característica de cada forma evolutiva (DE SOUZA, 2002).

A figura 2 ilustra o aspecto geral da forma epimastigota de *T. cruzi*, indicando diversas estruturas e organelas importantes para biologia desse parasita.

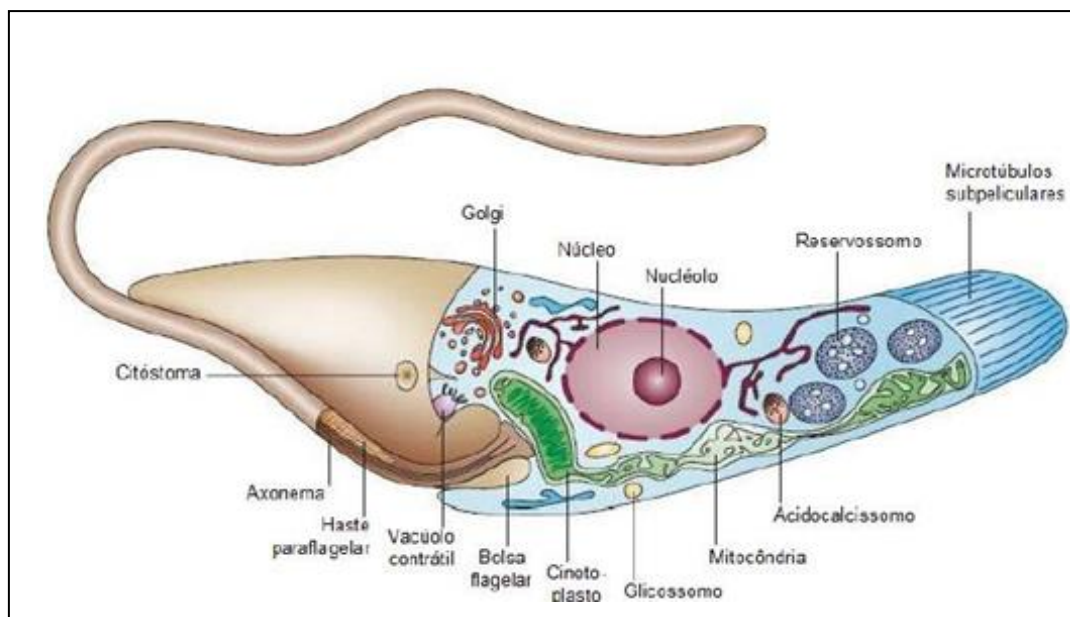


Figura 2 - Aspecto geral da forma epimastigota de *T. cruzi*

Fonte: Adaptado de DO CAMPO *et al.*, 2005.

2.3.2 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida de *T. cruzi* ocorre entre hospedeiros vertebrados mamíferos, por exemplo, o homem e insetos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* (conhecidos popularmente como barbeiros), os quais podem atuar como vetores. O parasita é transmitido aos seres humanos por contato com as fezes e a urina desses insetos (BRIONES *et al.*, 1999; COURA, 2007).

T. cruzi apresenta principalmente três formas diferentes durante o ciclo de vida: forma epimastigota que é a forma replicativa encontrada no tubo digestivo do vetor e também nas glândulas anais de gambás; a forma amastigota que é a forma replicativa intracelular, encontrada nos tecidos do hospedeiro vertebrado, não possui flagelo exteriorizado, nem membrana ondulante e a forma tripomastigota que não possui capacidade replicativa, corresponde à forma infectante do parasita (Figura 3) (BRENER, 1997; CORREA; SIQUEIRA-BATISTA, R; SIQUEIRA-BATISTA, R, 2007; DE SOUZA, 2002).

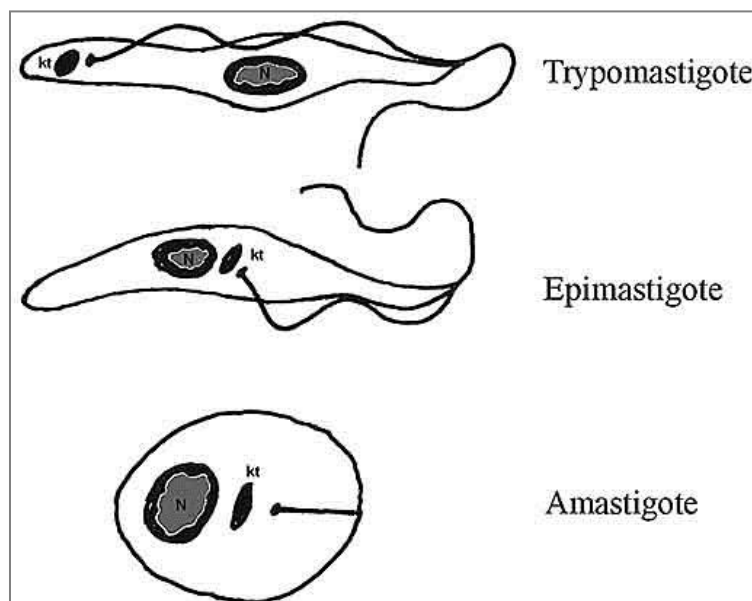


Figura 3 - Principais formas evolutivas de *T. cruzi*.

Fonte: www.frontbiosci.org/2003/v8/e/948/fulltext.php?bframe=figures.htm

Amastigota: Forma intracelular de *T. cruzi* encontrada nos tecidos do hospedeiro vertebrado, não possui flagelo exteriorizado nem membrana ondulante. Seu único movimento é de rotação, medindo cerca de 4,0µm de diâmetro. Multiplica-se por divisão binária longitudinal a cada 12 horas, transformando-se em tripomastigota sanguíneo, aproximadamente 11 a 13 horas antes da ruptura da célula hospedeira.

Epimastigota: É a forma evolutiva que se localiza no tubo digestivo do triatomíneo, sendo também encontrada nas glândulas anais de alguns mamíferos como gambás. Apresenta flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida, medindo entre 20 e 40 µm, incluindo o flagelo livre. O nucléolo é esférico e ocupa, na maioria das vezes, uma posição central no núcleo. É bastante móvel e apresenta intensa atividade replicativa também por divisão binária longitudinal, havendo, em diversas ocasiões, a formação de rosetas. Estas formas são incapazes de penetrar nas células do hospedeiro vertebrado.

Tripomastigota: Não possuem capacidade replicativa, e correspondem à forma infectante, extracelular, localizada em ambos os hospedeiros. No vetor encontra-se a forma tripomastigota metacíclica e no vertebrado tripomastigota sanguícola.

O triatomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (homem) defecando próximo à região da picada, o prurido despertado pela picada do inseto faz com que o indivíduo coce a região, carreando o agente juntamente com os dejetos do inseto para o local da picada, possibilitando através da solução de continuidade formada, o acesso do mesmo aos tecidos do hospedeiro. As formas tripomastigotas metacíclicas, presentes na

circulação, poderão penetrar nas células do sistema mononuclear fagocitário e diferenciar-se em formas amastigotas, que após multiplicação diferenciam-se em formas tripomastigotas sanguíneas. Nesta etapa os parasitas provocam a ruptura da célula infectada e são liberados na corrente sanguínea. Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o vetor ingere as formas circulantes do parasita, que ao alcançarem o trato digestório do inseto sofrem nova diferenciação, agora em formas epimastigotas. Epimastigotas se replicam por divisão binária no intestino médio do vetor e ao atingirem a porção final do seu intestino diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, podendo ser eliminadas na excreta do vetor durante ou após novo repasto sanguíneo (Figura 4) (CHAGAS, 1909; DE SOUZA, 2002; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

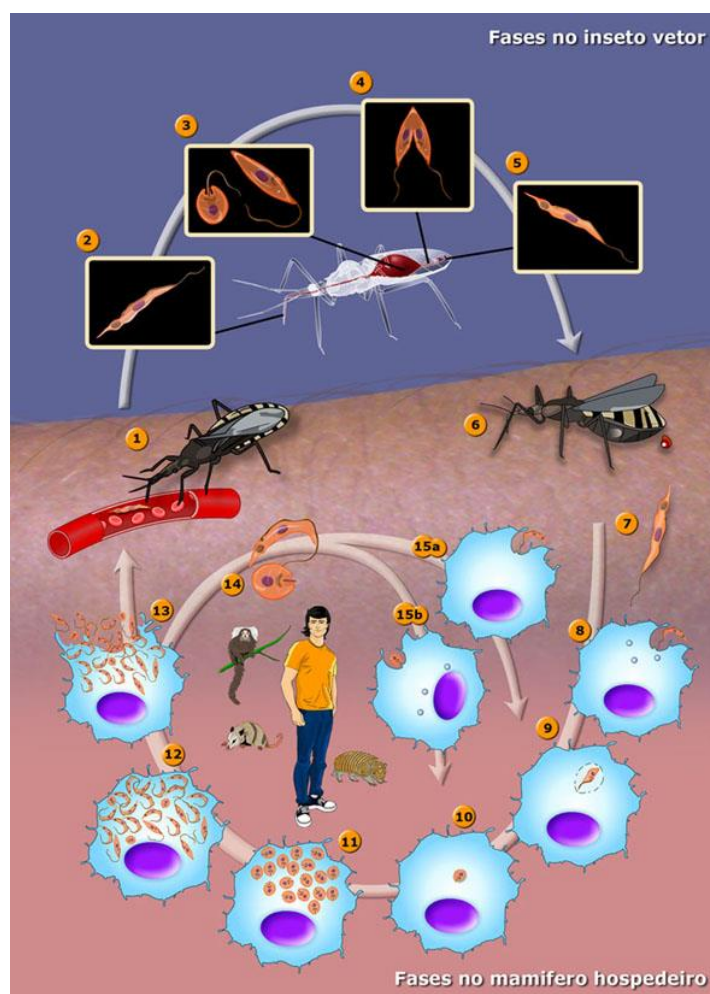


Figura 4 - Ciclo biológico de *T. cruzi*.

Fonte: <http://www.open.edu/openlearnworks/mod/page/view.php?id=40788>

2.4 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ocorre principalmente na América Latina. No entanto, nas últimas décadas, novos casos de infecção têm sido detectados nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Isto se deve principalmente à mobilidade das populações entre tais regiões do mundo (WHO, 2016).

Apesar de menos comum, a transmissão por via oral é responsável por um número significativo de casos agudos da doença, principalmente na região norte do Brasil (COURA *et al.*, 2002) através da contaminação por alimentos contendo o inseto-vetor ou seus detritos. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (SCHMUÑIS, 2000).

2.4.1 Fases da doença

Podem ser reconhecidas, duas principais fases da doença, a aguda e a crônica (COURA; CASTRO, 2002).

A fase aguda tem a duração de cerca de dois meses após a infecção. Durante a fase aguda, um grande número de parasitas circula no sangue, mas na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes ou leves. Um dos primeiros sinais visíveis pode ser uma lesão de pele ou um inchaço arroxado das palpebras (Chagoma ou sinal de Romaña). As pessoas infectadas podem ainda apresentar febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou no peito. Após a fase aguda, há um longo período em que os indivíduos infectados apresentam-se reagentes em testes sorológicos e/ou parasitológicos indiretos, mas não apresentam sintomatologia e por isso são considerados como estando na forma indeterminada (crônica indeterminada) da doença (COURA; CASTRO, 2002; PRATA, 2001; WHO, 2016).

A fase crônica inicia com a diminuição da parasitemia, os parasitas podem ser encontrados principalmente no tecido cardíaco e na musculatura lisa do trato digestório. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de distúrbios digestivos (megaesôfago ou megacólon) ou alterações neurológicas mistas. A evolução desta fase é lenta e pode durar toda a vida do paciente, manifestando-se pela presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e a resultados normais ao exame clínico, eletrocardiográfico e radiológico (ANDRADE *et al.*, 1992; COURA; CASTRO, 2002; DIAS, 2000; WHO, 2016).

2.4.2 Tratamento

Embora todo o ciclo da doença de Chagas tenha sido descrito entre 1909 e 1935, não há ainda uma estratégia quimioterápica efetiva para o seu tratamento principalmente na fase crônica, que vem sendo realizado de forma muito mais sintomática do que etiológica (SOUZA, 2012).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas não é prioridade das indústrias farmacêuticas, devido ao alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento, pois a doença afeta principalmente setores menos favorecidos da sociedade, desassistidos pelo poder público e negligenciados. Dos 1.393 fármacos introduzidos no mercado farmacêutico entre 1975 e 1999, menos de 1% foram dirigidos para as doenças tropicais. Por isso, há a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos no combate à doença de Chagas (CASTRO 2002; COURA; revisto por SOUZA, 2012).

Um dos grandes problemas enfrentados na busca de um fármaco eficiente para o tratamento da doença de Chagas é o fato do parasita possuir um complexo ciclo biológico, outro problema está relacionado com a diversidade genética do parasita, refletida na heterogenidade das diferentes cepas ou isolados, o que pode ser observado nas distintas taxas de multiplicação, tropismo tecidual e suscetibilidade ao tratamento quimioterápico (BOAINAIN; RASSI, 1979; SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012; ZINGALES *et al.*, 2011).

Dois fármacos foram utilizados por mais de 40 anos no tratamento da doença de Chagas, são os compostos nitroheterocíclicos, Nifurtimox (Lampit[®] Bayer, 4[(5-nitrofurfurilideno)amino]3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) e Benznidazol (Rochagan[®] Roche, *N*-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida), no entanto ambos causam vários efeitos colaterais como anorexia, náuseas, vômitos, alergia cutânea e neuropatia periférica (BOAINAIN; RASSI, 1972; SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012), além de apresentarem maior eficácia na fase aguda da doença. Atualmente, o Nifurtimox não é mais comercializado no Brasil, Argentina e Chile (WHO, 2012).

2.5 PRODUTOS NATURAIS

As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação quanto na cura de enfermidades. A utilização delas é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas várias formações culturais que as usam como recursos terapêuticos. Apesar do emprego empírico, as plantas medicinais continuam a ser usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos. A natureza produz uma grande variedade de produtos químicos e o número total de produtos naturais produzidos por plantas está estimado em torno de 500.000 (NIERO, *et al.*, 2003).

Sabe-se que os produtos naturais são uma fonte atrativa de compostos de estruturas variadas que apresentam atividades biológicas potentes e desejáveis perfis farmacológicos, e esse fato tem sido evidenciado por diversas pesquisas que avaliam a ação anti *Trypanosoma* de diferentes produtos oriundos de plantas (CACERES *et al.*, 1998; DUSCHAK; COUTO, 2007), os quais podem no futuro, substituir muitos medicamentos atuais que apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais (SOUZA; NAKAMURA; CORÊA, 2012).

Atualmente, não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vem sendo utilizados como fonte alternativa de medicamentos. Segundo análise feita pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, cerca de 60% dos fármacos lançados no mercado norte-americano entre 1985 e 1995 são de origem natural. Dos 250 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo de fármacos sintéticos são obtidos a partir de fontes naturais. Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos e que apenas cerca de 8% foram estudadas, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de medicamentos, visando no futuro a obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (NIERO, *et al.*, 2003).

2.5.1 Metabólitos secundários

Ao se estudar uma planta com relação as suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, são essenciais ao crescimento e à vida,

como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, ácidos nucléicos. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos e são biossintetizados a partir de metabólitos primários. Apresentam distribuição restrita a certas plantas, às vezes característicos de um dado gênero ou espécie, como por exemplo, os alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, dentre outros. (NIERO, *et al.*, 2003).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Hoje se sabe que muitos deles têm papéis vitais como mediadores em interações ecológicas, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais, dispersores de sementes e em interações alelopáticas. Os metabólitos secundários podem ser classificados de diferentes maneiras, segundo suas características químicas, origem da planta ou origem biossintética (NIERO, *et al.*, 2003).

2.6 *Guarea kunthiana*

Guarea kunthiana A. Juss é uma planta nativa do Brasil pertencente à família Meliaceae, e encontra-se naturalmente distribuída em todo o território nacional e em quase todas as formações florestais. É uma árvore que varia de 4 a 25 metros de altura, conhecida popularmente como figo-do-mato, jatuauba, peloteira, jító e canjambo (Figura 5) (LORENZI, 2002).

No Brasil, a família Meliaceae está representada por oito gêneros e 84 espécies. Muitas espécies têm importância econômica devido ao seu potencial madeireiro e à extração de óleos essenciais, já outras espécies têm sido usadas há muito tempo, principalmente na Índia, como planta medicinal (SAKURAGUI, *et al.*, 2013).

Há relatos de atividade inseticida associada à terpenóides isolados de inúmeras espécies da família Meliaceae (SIMMONDS *et al.* 1992; TAN; LUO, 2011). A azadiractina é o composto mais eficiente extraído da planta *Azadirachta indica* A. Juss, com propriedades inseticidas e que afeta o crescimento de diversas espécies de insetos (MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001). Ao avaliar várias espécies de *Trichilia*, Borgoni; Vendramin (2005) constataram atividade inseticida de seis extratos sobre uma importante praga do milho.



Figura 5 – Partes aéreas, caule e frutos de *G. kunthiana*

Fonte: <http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6729-2/>

Diversos limonóides foram isolados de extratos de frutos e galhos de *Cipadessa fruticosa* e apresentaram atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, em ensaios *in vitro* (LEITE *et al.*, 2010).

Segundo estudos de Miguita e colaboradores (2015) o fracionamento biomonitorado de extrato etanólico de *G. kunthiana* levou ao isolamento de um novo protolimonóide, o 3- β -O-tiglolmelianol, que se revelou extremamente ativo contra fêmeas (ingurgitadas) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Extrato hexânico da madeira das raízes de *G. kunthiana*, bem como componentes isolados dessa planta foram relatados como capazes de inibir formas de *Leishmania* spp (LIMA, 2006; MESQUITA, *et al.*, 2005).

2.7 *Aiouea trinervis*

Aiouea trinervis ocorre na Região Centro-Oeste do Brasil, sendo frequente no cerrado do Mato Grosso do Sul. No município de Corumbá, a espécie é encontrada no Campo Rupestre na Morraria do Urucum, possuindo porte arbustivo, já na floresta estacional semidecidual da Morraria Santa Cruz apresenta porte arbóreo (Figura 6) (ALVES; ISHII, 2007).

Aiouea trinervis Meisn. popularmente conhecida como brinco-de-princesa, louro-de-goíás, uridol, urinosa e vergateza. A espécie apresenta características adaptativas à seca, com folhas relativamente espessas de margens rígidas. Floresce de junho a outubro e sua frutificação inicia-se em junho e conclui-se em outubro. As folhas são usadas em forma de chá, como afrodisíaco (MORAES, 2005).



Figura 6 –Partes aéreas e frutos de *A. trinervis*

Fonte:<http://lauraceae.myspecies.info/category/lauraceae taxonomy/lauraceae/aiouea-trinervis>

A família Lauraceae têm distribuição pantropical, sendo bem representadas nas Américas, Ásia Tropical, Austrália e Madagascar (QUINET *et al.*, 2013). Com cerca de 50 gêneros e provavelmente entre de 2.500 e 3.500 espécies (ROHWER, 1993).

No Brasil, ocorrem 24 gêneros e 439 espécies que habitam os biomas Caatinga, Cerrado e Pantanal, e concentram sua maior diversidade nas Florestas Pluviais da Amazônia e da Mata Atlântica. A família é representada por árvores ou arbustos (exceto *Cassytha* L., que são trepadeiras) geralmente providos de óleo essenciais e aroma característicos.

Nos estados de Goiás e Tocantins, a família está representada pelos gêneros *Aiouea*, *Aniba*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea*, em áreas de matas, cerrados, campo rupestres, e áreas perturbadas (MORAES, 2005).

O gênero *Ocotea* Aubl., apontado como um dos mais representativos tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons nas florestas pluviais, está entre os mais diversos da flora brasileira. Destacam-se ainda os gêneros *Nectandra* Rol. Ex Rottb., *Aniba* Aubl. e *Mezilaurus* Taub. que, conjuntamente com o gênero *Ocotea*, englobam espécies de grande interesse econômico pela qualidade madeireira e pelos óleos essenciais amplamente utilizados na indústria da perfumaria e de cosméticos. Essas espécies são conhecidas popularmente como canelas, loureiros ou imbuías (QUINET *et al.*, 2013).

Mediante ao exposto, ressalta-se a importância de explorar as espécies *A. trinervis* e *G. kunthiana*, com vistas a ampliar o conhecimento a respeito dessas plantas do cerrado Sul-Mato-Grossense em busca de novos compostos com potencial ação sobre o agente etiológico da doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos extratos de *A. trinervis* e *G. kunthiana* sobre a estrutura e a integridade de membrana de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Observar as alterações estruturais provocadas em epimastigotas de *T.cruzi* tratadas com a IC₅₀ dos extratos ativos;

Detectar o efeito dos extratos vegetais ativos sobre a integridade da membrana plasmática de formas epimastigotas de *T.cruzi*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARASITA – *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c cedidas gentilmente pelo Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz-PR), foram cultivadas no Laboratório de Imunologia, Bioensaios e Biologia Molecular (LabImunoBio) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), mantidas a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas em fase exponencial de crescimento.

4.2 EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais utilizados neste estudo foram produzidos no laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos, coordenado pelos pesquisadores Dra. Fernanda Rodrigues Garcez e Dr. Walmir Silva Garcez (Instituto de Química/UFMS).

Extratos etanólicos das sementes de *Guarea kunthiana* (Meliaceae), coletada em Bonito-MS, exsicata CGMS 112217 e dos frutos de *Aiouea trinervis* (Lauracea), coletada em Campo Grande-MS, exsicata CGMS8810, que apresentaram atividade tripanocida no ensaio do MTT (Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2 il)-2,5-difeniltetrazolio), com IC₅₀ de 45,0µg/mL e 10,27µg/mL, respectivamente (MAIER, 2016), foram utilizados para a realização dos ensaios de contagem, morfometria e citometria de fluxo, no LabImunoBio/CCBS/UFMS.

4.3 CONTAGEM E AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Alíquotas de cultura em fase exponencial de crescimento, na concentração de 1×10^6 parasitas/mL foram incubadas a 28 °C durante 72h, na presença da IC₅₀ dos extratos vegetais considerados ativos pelo ensaio do MTT (grupo tratado). Em paralelo, alíquotas da cultura original foram incubadas nas mesmas condições, na presença da IC₅₀ do Benznidazol (controle positivo) ou na presença de 1% de DMSO (controle negativo). Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Após o período de incubação foram realizadas contagens, em câmara de Neubauer (KESSLER, 2013), das formas epimastigotas de *T.cruzi* de todas as culturas e foi calculada a média da quintuplicata de cada tratamento e dos controles. Duas alíquotas da quintuplicata foram escolhidas aleatoriamente e foram utilizadas para a confecção das lâminas.

As culturas correspondentes a cada tratamento e controles foram ajustadas para a concentração de 1×10^7 parasitas/mL e as células foram coletadas por centrifugação a 2.000xg por 5 minutos, lavadas uma vez em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Foram aplicados 10 µL de cada suspensão celular sobre uma lâmina de microscopia, fixados e corados pelo método de Giemsa 10% (GIEMSA, 1904). As lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific) e examinadas sob microscopia óptica de campo claro em magnitude de 1.000x (LEICA - DM5500 B).

O percentual de formas celulares alteradas foi estimado contando-se 50 parasitas (os mesmos utilizados na análise morfométrica).

4.4 AVALIAÇÃO DA MORFOMETRIA

O estudo morfométrico foi realizado de acordo com Hoare (1972). A partir das lâminas utilizadas para análises das formas alteradas morfológicamente descrito no ensaio anterior, as amostras foram mensuradas a partir de 50 espécimes, das culturas tratadas e controles, sob microscopia óptica de campo claro em magnitude de 1000x (LEICA - DM5500 B). As imagens capturadas (sistema Leica Application Suite versão 4.0 (Build:877) e digitalizadas foram utilizadas para análise morfométrica, com auxílio do software Motic Images Plus versão 2.0. Um micrômetro é compatível com 26,87 *pixels* Laboratório de captura de imagens do CCBS

Os parasitas foram identificados numericamente e posteriormente foram realizadas as mensurações correspondentes à largura, comprimento, área e perímetro total das células, área e perímetro do cinetoplasto.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros morfométricos e morfológicos de formas epimastigotas de *T. cruzi* dos extratos ativos, utilizou-se o teste de frequência (teste F) e para detectar a diferença entre os tratamentos utilizou-se o teste de Duncan. Para as análises foi utilizado o software SPSS 17.0.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram incubados a 28 °C durante 72h, na presença da IC₅₀ dos extratos vegetais de *A. trinervis* e *G. kunthiana*. Em paralelo, foram incubados parasitas na presença da IC₅₀ do Benznidazol (controle positivo) e na presença de 1% de DMSO (controle negativo). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação os parasitas foram centrifugados a 1.700 xg durante 10min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi resuspendido em uma concentração de 1x10⁶ parasitas/mL, lavado com PBS e incubado a 28 °C durante 15 minutos com Anexina V marcada com PE (*Phycoerythrin*) e 7-AAD (*7-Amino-Actinomycin*).

Após a incubação as células foram imediatamente quantificadas no equipamento FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA), usando os filtros de 585/42 nm e 670 nm para leitura de PE e 7-AAD, respectivamente, com a aquisição de 10.000 eventos. Para a análise dos dados utilizou-se o software Diva (Versão 6.0 New Jersey, USA), considerando somente células dentro da área determinada utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade das células FSC (*Forward Scatter*) x SSC (*Side Scatter*).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DOS EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS

Ao avaliar o número de parasitas obtidos de culturas tratadas com a IC_{50} dos extratos vegetais considerados ativos pelo ensaio do MTT pôde-se observar que houve uma redução significativa no número de parasitas em relação às culturas não tratadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de parasitas após tratamento com a IC_{50} dos extratos ativos, Campo Grande - 2015

Controle negativo DMSO 1%	<i>G. kunthiana</i>	<i>A. trinervis</i>
100%	46%	94%

Nota: DMSO Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo.

5.2 MORFOMETRIA

Na tabela 2 pode se observar que o tratamento com o extrato etanólico dos frutos de *A. trinervis* causou alterações no tamanho do flagelo ($p < 0,05$) e na área do cinetoplasto ($p = 0,036$), com diferença significativa entre as médias morfométricas dos parasitas tratados e dos parasitas do controle.

O flagelo dos parasitas tratados apresentou-se aumentado em relação aos flagelos dos parasitas não tratados (6,964 μm) e dos tratados com Benznidazol (6,787 μm). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa dessa variável entre os parasitas dos controles positivo e negativo.

Com relação às variáveis área e perímetro total dos parasitas, largura e comprimento das células, o tratamento com o mesmo extrato não causou alterações significativas.

Com relação à área do cinetoplasto, observou-se que houve diferença entre os parasitas do controle positivo e do controle negativo. O tratamento com o extrato causou uma diminuição da área do cinetoplasto, aproximando-se do efeito observado quando os parasitas foram tratados com Benznidazol (Tabela 2).

Tabela 2 – Média ($\pm$ dp) de diferentes medidas morfométricas de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com a IC₅₀ dos extratos etanólicos de *A. trinervis* e *G. kunthiana*.

Medidas	<i>A. trinervis</i>			<i>G. kunthiana</i>		
	10 μ g/mL	C-	BNZ	45 μ g/mL	C-	BNZ
Formas normais %	50,0	84,0	34,0	40,0	98,0	44,0
Flagelo (μ m)	9,32 $\pm$ 0,35 ^a	6,96 $\pm$ 0,35 ^b	6,78 $\pm$ 0,35 ^b	6,83 $\pm$ 0,44 ^d	9,14 $\pm$ 0,44 ^e	9,93 $\pm$ 0,44 ^e
Área K (μ m ²)	0,23 $\pm$ 0,01 ^a	0,28 $\pm$ 0,01 ^b	0,27 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,27 $\pm$ 0,01 ^d	0,24 $\pm$ 0,01 ^d	0,21 $\pm$ 0,01 ^d
Perímetro K (μ m)	3,37 $\pm$ 0,15 ^a	3,79 $\pm$ 0,15 ^a	3,65 $\pm$ 0,15 ^a	3,57 $\pm$ 0,16 ^d	3,41 $\pm$ 0,16 ^d	3,19 $\pm$ 0,16 ^d
Área Total (μ m ²)	1,66 $\pm$ 0,04 ^a	1,69 $\pm$ 0,04 ^a	1,75 $\pm$ 0,04 ^a	1,66 $\pm$ 0,05 ^d	1,71 $\pm$ 0,05 ^d	1,71 $\pm$ 0,05 ^d
Perímetro Total (μ m)	13,77 $\pm$ 0,30 ^a	14,33 $\pm$ 0,30 ^a	14,22 $\pm$ 0,30 ^a	13,97 $\pm$ 0,38 ^d	15,62 $\pm$ 0,38 ^e	14,06 $\pm$ 0,38 ^d
Largura (μ m)	2,30 $\pm$ 0,14 ^a	2,39 $\pm$ 0,14 ^a	2,43 $\pm$ 0,14 ^a	2,42 $\pm$ 0,07 ^d	2,04 $\pm$ 0,07 ^e	2,39 $\pm$ 0,07 ^d
Comprimento (μ m)	5,71 $\pm$ 0,19 ^a	5,92 $\pm$ 0,19 ^a	5,50 $\pm$ 0,19 ^a	6,22 $\pm$ 0,65 ^d	7,59 $\pm$ 0,65 ^d	5,70 $\pm$ 0,65 ^d

Nota: dp: desvio padrão, C-: controle negativo, BNZ: Benznidazol (controle positivo), Área K: área do cinetoplasto, Perímetro K: perímetro do cinetoplasto, letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística (^{abc}, *A. trinervis*, ^{def}, *G. kunthiana*).

A análise da morfologia dos parasitas revelou que houve redução da área do cinetoplasto e aumento do tamanho do flagelo dos parasitas submetidos ao tratamento com extrato etanólico de *A. trinervis*. Dados estes confirmados pela análise estatística. Quando comparados com o controle negativo observou-se que as células tratadas apresentaram-se mais arredondadas, porém considerando a média do comprimento celular, não houve diferença estatística (Figura 7).

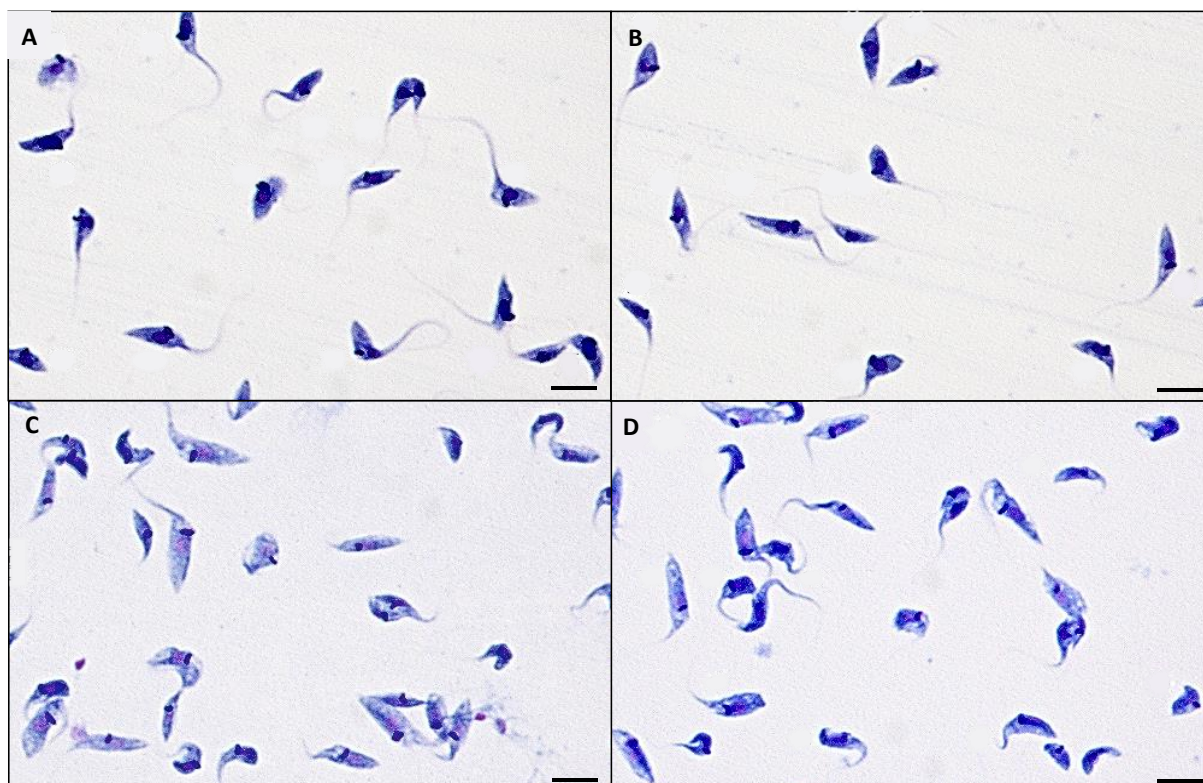


Figura 7 – Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c corados com Giemsa. A e B: Parasitas não tratados (Controle Negativo). C e D: Parasitas tratados com extrato etanólico de *A. trinervis*. Microscópio Óptico, 1000x.

Com relação aos dados obtidos nas análises morfométricas dos parasitas tratados com a IC_{50} do extrato de sementes de *G. kunthiana*, pôde-se observar que este extrato causou relevantes alterações morfológicas nos parasitas, refletidas na diferença entre as médias de três variáveis, quando comparados com os parasitas não tratados (Tabela 2).

Pode-se observar que o tratamento com 45 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de *G. kunthiana* causou um aumento na largura da célula ($p < 0,05$) em comparação com os parasitas do controle negativo, com médias de 2,48 μm e 2,04 μm , respectivamente.

O efeito do tratamento dos parasitas com extrato etanólico de *G. kunthiana* causou redução do tamanho do flagelo ($p < 0,05$), o mesmo não foi constatado entre parasitas do

controle negativo e do controle positivo. A média do tamanho do flagelo dos parasitas tratados diminuiu drasticamente quando comparado com a média dos controles, com diferença de 2,31 μm (Tabela 2).

Como se pode observar na tabela 2 houve também diferença estatística do perímetro ($p < 0,05$) dos parasitas tratados com o extrato de *G. kunthiana* em relação aos parasitas do controle negativo. Verificou-se que o efeito do tratamento com o extrato e com o Benznidazol foi similar, causando a redução do perímetro da célula.

Na figura 8 pode-se observar que os parasitas tratados com o extrato etanólico de *G. kunthiana* apresentaram-se mais arredondados, consequentemente mais largos e com alterações no contorno, quando comparados com os parasitas não tratados. Portanto, o tratamento com o extrato de *G. kunthiana* causou maiores efeitos na morfologia e morfometria das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

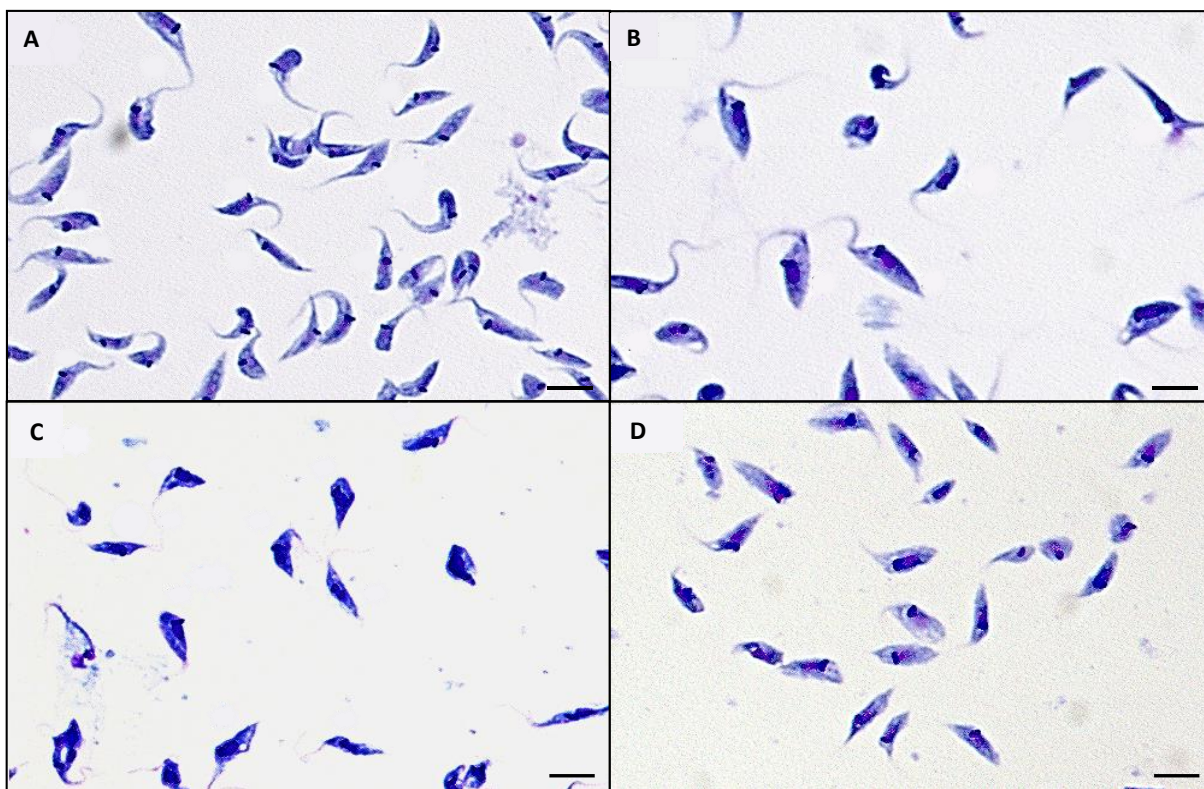


Figura 8 – Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c corados com Giemsa. A e B: Parasitas não tratados (Controle Negativo), C e D: Parasitas tratados com extrato etanólico de *G. kunthiana*. Microscópio Óptico, 1000x.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA NA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO:

Como pode ser observado na figura 9, o extrato etanólico de *A. trinervis* (Figura 9B) não induziu a exposição de fosfatidilserina, enquanto que nas células tratadas com o extrato etanólico de *G. kunthiana* ocorreu a exposição deste fosfolípido em 7,1% das células (Figura 9C), em comparação com os parasitas não tratados (Figura 9A), onde somente 1,2% das células foram marcadas. A exposição de fosfatidilserina associada à integridade de membrana plasmática sugere a ativação de mecanismos apoptóticos. No entanto, neste caso, a viabilidade celular também foi alterada, como pode ser observado no quadrante 2 da figura 9C, onde 7,1% das células apresentaram dupla marcação.

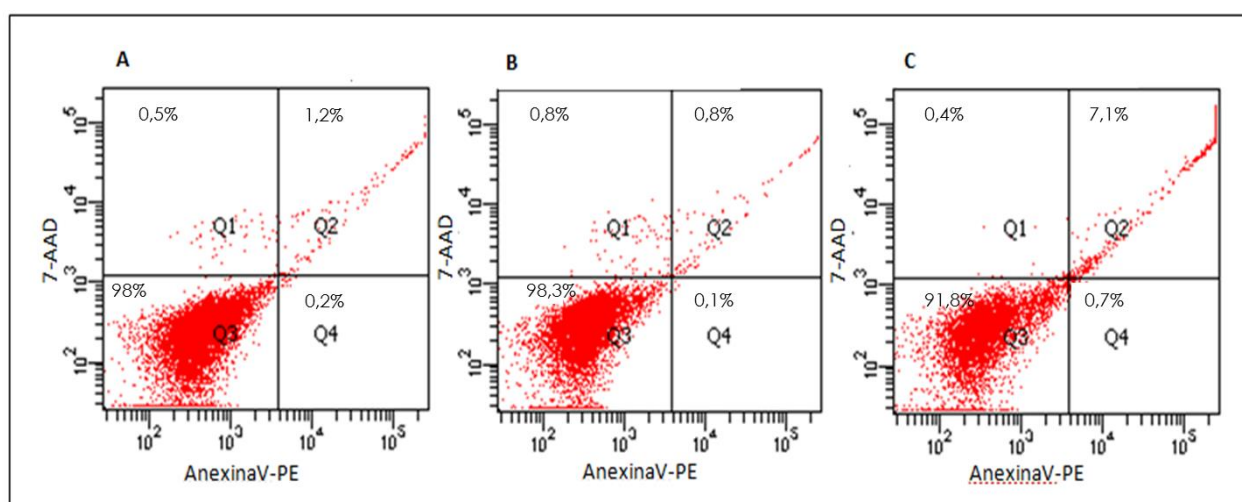


Figura 9 - Exposição de fosfatidilserina por formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c tratadas com IC₅₀ de extratos etanólicos ativos analisados por citometria de fluxo. (A) Parasitas não tratados; (B) Parasitas tratados com extrato etanólico de *A. trinervis*; (C) Parasitas tratados com extrato etanólico de *G. kunthiana*.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho pesquisamos os efeitos dos extratos de *A. trinervis* (Lauraceae) e *G. kunthiana* (Meliaceae) sobre o crescimento e a morfometria de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

O estudo de compostos naturais tem recebido uma atenção considerável em pesquisas que buscam alternativas para a terapia de doenças parasitárias e tem viabilizado a identificação de muitos compostos com ação tripanocida (DUSCHAK *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato etanólico de *A. trinervis* é promissor para a busca de compostos com potencial atividade contra *T. cruzi*, pois causou alterações na morfologia e na viabilidade do parasita.

Na literatura não há relatos de atividade biológica de *A. trinervis* com *T. cruzi*. Entretanto alguns estudos demonstraram a ação de extratos e de metabólitos secundários isolados de membros da família Lauraceae sobre diferentes formas de *T. cruzi*. Segundo Alves *et al.* (2007), o extrato etanólico dos frutos de *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) apresentou atividade tripanocida contra formas epimastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi*, com IC₅₀ 26,93 µg/mL.

Alguns estudos relatam que neolignanais de *Occotea cymdarum* Kunth e *Nectrandra glabrescens* Benth causaram inibição do crescimento de formas epimastigotas e lise de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28 (CABRAL, *et al.*, 2010; IZUMI, *et al.*, 2011).

Os dados da análise de morfometria indicaram que o cinetoplasto dos parasitas tratados com extrato etanólico de *A. trinervis* diminuiu de tamanho. Sabendo-se que o cinetoplasto contém uma elevada concentração de DNA extranuclear, conhecido com k-DNA, e que durante a multiplicação dos parasitas essa estrutura precisa ser duplicada (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007), possivelmente o extrato tenha influenciado nos mecanismos de replicação do material genético de *T. cruzi*.

Fernandes e colaboradores (2013) concluíram em sua pesquisa que a permeabilidade da membrana e a morte celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* estão associados à alteração na homeostase do Ca²⁺. Tais alterações, segundo os autores, se devem à susceptibilidade da mitocôndria do parasita.

Segundo Souza (2012), a ação tripanocida de lignanas pode estar associada com a disfunção mitocondrial e danos oxidativos, desencadeando efeitos destrutivos sobre as moléculas biológicas de *T. cruzi*, acarretando sua morte.

Assim como observado em nossos resultados, outros estudos observaram alterações nas estruturas celulares. Cabral e colaboradores (2010), utilizando microscopia eletrônica de transmissão para avaliar o efeito de neolignananas sobre *T. cruzi*, observaram que o k-DNA sofreu condensação com consequente desorganização do cinetoplasto, além da desorganização das cristas mitocondriais e do complexo de Golgi.

O extrato de *A. trinervis* causou o aumento considerável do tamanho do flagelo de parasitas tratados, quando comparado com os parasitas do controle negativo. Não há relatos na literatura sobre possíveis causas para o aumento do flagelo. No entanto, em *Trypanosoma brucei* a estrutura paraflagelar está envolvida em muitos processos celulares, como manutenção da polaridade, divisão celular, evasão do sistema imune do hospedeiro e tráfego de proteínas (SANTANA, 2014).

Os mecanismos de regulação de íons Ca^{2+} em protozoários parasitas diferem, em vários aspectos, dos processos que ocorrem em outros organismos eucariotos, representando um provável alvo para novas terapias (MORENO; DOCAMPO, 2003). De Souza (2002) sugere em seu trabalho que íons Ca^{2+} são necessários para adesão e desenvolvimento do flagelo, ressaltando a importância de mais estudos relacionados a esse evento. Diante disso acredita-se que o extrato de *A. trinervis* possa ter causado alguma alteração relacionada com íons Ca^{2+} e dessa forma, influenciado no desenvolvimento do flagelo. Porém mais estudos são necessários para que se comprove essa hipótese.

Huang e colaboradores (2013) identificaram uma proteína de membrana com função de transportador de íons Ca^{2+} na mitocôndria de *T. brucei*. Sendo este o único canal utilizado pelo protozoário na captação desse íon pela mitocôndria, é essencial para o crescimento *in vitro* e *in vivo*, e tem papéis importantes na regulação da bioenergética celular nas principais fases de vida investigadas.

Guterres e colaboradores (2014) verificaram uma baixa atividade citotóxica em extrato etanólico de *A. trinervis* (Lauraceae), bem como ausência de atividade genotóxica em seus óleos essenciais, ao passo que os butonolídeos isolados do referido extrato mostraram-se genotóxicos. Entidades químicas que foram isolados a partir de plantas e apresentam atividades biológicas, tais como citotóxica, indutor de apoptose, antiproliferativa e antitumoral, são promissores. Os autores também sugerem que alcaloides isoquinolínicos (ocoteína e dicentrina) possuem elevadas atividades citotóxica e genotóxica, relacionadas com as suas estruturas químicas, que inibem a atividade das enzimas topoisomerase I e II. Sabe-se que a topoisomerase II é essencial para tripanosomatídeos, devido ao seu envolvimento na replicação do DNA mitocondrial (kDNA) (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). A inibição da

replicação do kDNA, pela supressão da atividade da topoisomerase II mitocondrial leva a morte do parasita. Por se tratar de uma estrutura única em tripanosomatídeos, esta enzima representa um importante alvo para a quimioterapia de doenças causadas por estes protozoários (SHAPIRO, 1993; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

Reforçando a importância de se explorar a espécie *A. trinervis* em busca de novos compostos com potencial ação sobre o agente etiológico da doença de Chagas e considerando o fato do parasita possuir organelas únicas, que foram alteradas pelo tratamento com esse extrato, sugerem-se novos estudos para melhor compreender a biologia do parasita e eleger possíveis alvos.

Diversos trabalhos publicados relatam a atividade biológica de membros da família Meliaceae como importantes produtores de compostos com ação sobre organismos vivos. A atividade inseticida talvez seja a mais difundida no meio científico, como observado por alguns autores ao avaliarem os efeitos de extratos e de limonóides sobre distintas fases do ciclo de vida de importantes pragas. No entanto, há diversos relatos sobre atividades antigúngica e antiviral, além da baixa toxicidade atribuída a extratos obtidos de gêneros pertencentes a essa família (BORGONI, 2005; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; PERDOMO, 2011; TAN; LUO, 2011).

O óleo de andiroba e uma fração rica em limonóides, ambos derivados de *Carapa guianensis* (Meliaceae), mostraram atividade significativa contra dois clones de *Plasmodium falciparum* (MIRANDA JUNIOR *et al.*, 2012).

Segundo estudos de Miguita e colaboradores (2015), o fracionamento biomonitorado de extrato etanólico de *G. kunthiana* levou ao isolamento de um novo protolimonoide, o 3 β -O-tiglolmelianol que revelou-se extremamente ativo contra fêmeas (ingurgitadas) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, representando um forte candidato para o desenvolvimento de um agente de controle biológico.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que o extrato etanólico de *G. kunthiana* foi eficiente em inibir a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Observou-se que em relação aos controles, a redução do número de parasitas causada pelo tratamento com o extrato de *A. trinervis* foi maior quando comparada com a redução causada pelo tratamento com o extrato de *G. kunthiana*.

Segundo Leite (2010), extratos de galhos e folhas de *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) apresentaram atividade tripanocida contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Em outro estudo, Lima (2006) verificou que o extrato hexânico de *G. kunthiana* foi capaz de inibir *Leishmania amazonensis*.

Em nosso estudo, o extrato de *G. kunthiana* causou alterações em três variáveis morfológicas: tamanho do flagelo, largura e perímetro total do parasita. Os parasitas tratados apresentaram-se mais largos (arredondados) em comparação aos parasitas do controle negativo.

Alem de inibir o crescimento das formas epimastigotas em cultivo, o extrato de *G. kunthiana* também causou alterações na membrana plasmática do parasita, pois as células apresentaram-se com contorno irregular, quando comparadas com o controle. Em análise de citometria de fluxo verificou-se que a permeabilidade da membrana foi alterada pela ação do extrato, corroborando com dados observados por outros autores ao avaliarem compostos de origem vegetal (MENNA-BARRETO, 2007).

Provavelmente as alterações da membrana possam ter acarretado a redução do perímetro total dos parasitas tratados. Vale ressaltar que a membrana plasmática pode representar um alvo promissor para novas drogas (SIQUEIRA-BATISTA, *et al.*, 2007).

A indução da morte celular programada em *T. cruzi* é um mecanismo interessante para a ação de um fármaco antichagásico, uma vez que não desencadearia uma potente resposta inflamatória em seu hospedeiro, sugerindo possíveis alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para controlar a doença de Chagas (JIMENES, 2014).

A morte celular programada em organismos unicelulares têm sido bastante estudada e acredita-se que possa representar um dos mecanismos adaptativos para o estabelecimento da infecção em mamíferos. Foi demonstrada a existência de mecanismos semelhantes à morte celular programada durante a fase estacionária de crescimento em cultura axênica de *T. cruzi*, provavelmente devido a privação de nutrientes (JIMENEZ *et al.*, 2008).

A discussão sobre a denominação adequada desta nova forma de morte celular programada permanece, mas a identificação de mecanismos distintos entre parasitas e hospedeiros mamíferos representa uma grande oportunidade para explorar novos alvos terapêuticos contra tripanosomatídeos (JIMENEZ *et al.*, 2008).

Com base nos resultados não é possível afirmar que o extrato etanólico de *G. kunthiana* induza mecanismos apoptóticos nos parasitas, mas certamente houve alterações significativas na morfologia e viabilidade celulares. Ainda cabe ressaltar que durante os estágios tardios do processo apoptótico ocorre a permeabilização da membrana plasmática associada à exposição de fosfatidilserina. Ensaios suplementares são necessários para avaliar os mecanismos e os componentes do extrato vegetal envolvidos nesse processo.

Os dados gerados neste estudo podem estimular a investigação de alterações estruturais nas demais formas de vida do parasita, como também com outros membros da família Meliaceae e Lauraceae na busca de atividade anti-*Trypanosoma*.

7 CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos de *A. trinervis* e *G. kunthiana* inibiram o crescimento *in vitro* de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

O extrato etanólico de *A. trinervis* causou a redução da área do cinetoplasto e aumento do tamanho do flagelo de formas de epimastigotas de *T. cruzi*.

O extrato etanólico de *G. kunthiana* causou a redução no tamanho do flagelo e aumento na largura das células e perímetro total do parasita.

O extrato etanólicos de *G. kunthiana* alterou a permeabilidade da membrana citoplasmática de formas epimastigota de *T. cruzi*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. M.; ISHII, I. H. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 179-192. 2007.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86 p. 624-626, 1992.

BAITELLO, J. B. Lauraceae. In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Melhem, T.S.; Giulietti, A.M.; Kirizawa, M. (Orgs.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, Rima, São Carlos, v. 3, p. 149-223. 2003.

BOAINAIN, E.; RASSI, A. Terapêutica etiológica da doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 32, n. 6, p. 395, 1979.

BOGORNÍ, 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. **Neotrop. Entomol.**, v. 34, p. 311-317, 2005.

BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Informe Técnico. Ministério da Saúde/Dep. Ciência e Tecnologia. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200, 2010.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo, In: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, Cap. 2, p. 26-31, 1997.

BRIONES M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of american mammalian faunas in the cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 104, p. 219-232, 1999.

CABRAL, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L.; CHAVES, M. C.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma Cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 319, 2010.

CÁCERES, A.; LÓPEZ. B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **J Ethnopharmacol.** v. 62, p. 195-202, 1998.

CAVALCANTI, D. P.; FRAGOSO, S. P. ; GOLDENBERG, S. ; DE SOUZA, W. ; MOTTA, M. C. M. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 94, p. 439-448, 2004.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 1, p. 159-218, 1909

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Aspectos Históricos. In: **Maléstia de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. Cap. 1, p.1-17.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**. 2010.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical**, Rio de Janeiro: Design, v. 8, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Ver. Citol.**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N.L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 67-124, 2009.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. ZIGMAN BRENER; ZILTON ANDRADE; MANOEL BARRAL-NETO 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2000.

DO CAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 251-261, 2005.

DO CAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol. Today**. v. 15, p. 443-448, 1999.

DUMAS, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 184, p. 1867-1885, 2000.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov.**, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

FERNANDES, M. P.; LEITE, A. C. R.; ARAUJO, F. F. B.; SAAD, S. T. O.; BARATTI, M. O.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. B. B. B.; GADELHA, F. R.; VERCESI, A. E. The Cratylia mollis Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver

Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, p. 381-388, 2014.

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P. A.; SANTOS, C. F.; ALMEIDA, R. F. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamento. **Instituto de pesquisa econômica aplicada, Brasília**, 2011.

GIEMSA G. Eine Vereinfachung und Vervollkommenung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. **Centralblatt für Bakteriologie**, v. 32, p. 307-313, 1904.

GULL, K. The cytoskeleton of tripanosomatid parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.53, p. 629-655, 1999.

GUTERRES, Z. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SILVA, L. M. G. E.; SILCA, A. F. G.; DUARTE, C. U. N. B. D.; BATISTA-SILVA, V. F. Evaluation of the genotoxic activity of ethanol extract and secondary metabolites isolated from *Aiouea trinervis* Meisn. (Lauraceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 972-979, 2014.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid. Biol. Dis.**, v. 2, p. 11, 2003.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. **Oxford: Blackwell**, p.749, 1972.

HUANG, G.; VERCESI, A. E.; Docampo, R. Essential regulation of cell bioenergetics in *Trypanosoma brucei* by the mitochondrial calcium uniporter. **Nature communications**, 2013.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T. DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 809, 2011.

JIMENEZ, V.; KEMMERLING, U.; PAREDES, R.; MAYA, J. D.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: a new therapeutic target? **Phytomedicine**, v. 21, p. 1411-1418, 2014.

JIMENEZ, V.; PAREDES, R.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, p. 688-698, 2008.

KESSLER, R. L.; SOARES, M. J.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A. *Trypanosoma cruzi* Response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. **Plos One**. v. 8, 2013.

LEITE, A. C.; NETO, A. P.; AMBROZIN, A. R. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Revista Brazilian Journal of Farmacognosy**. v. 20, n. 1, p. 1-6, 2010.

LIMA, R. C. **Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida.** 2006 (Dissertação em Ciência da Saúde) – UnB/ Brasília 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2. ed. v. 2, p. 248, 2002.

MARTINEZ, S. S; VAN EMDEN, H. F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin **Neotrop. Entomol.**, v. 30, n. 1, 2001

MENA-BARRETO, R. F. S.; CORRÊA, J. R.; PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; CASTRO, S. L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. **Revista de parasitologia**, v. 101, p. 895-905, 2007.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORRIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPÍNDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MICHELS, P. A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.

MICHELS, P. A.; OPPERDOES, F. R. The evolutionary origin of glycosomes. **Parasitol. Today**, v.7, p. 150-109, 1991.

MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. **Parasitology Today**, v.16, p. 11, 2000.

MIGUITA, C. H.; BARBOSA, C. S.; HAMERSKI, L.; SARMENTO, U. C.; NASCIMENTO, J. N.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. 3 β -O-Tigloylmelianol from *Guarea kunthiana*: A New Potential Agent to Control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a Cattle Tick of Veterinary Significance. **Molecules**, v. 20, p. 11-126, 2015.

MIRANDA-JÚNIOR, R. N, C.; DOLABELA, M. F.; SILVA, M. N.; PÓVOA, M. M. MAIA J. G. S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa Gianensis* Aubl., Meliaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 679-683, 2012.

MORAES, P. L. R. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, 2005.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 1861-1875, 2004.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Corrent opinion in microbiology**, v. 6, p. 359-364, 2003

MOSSININ, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Multiplos usos. **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139, 2005.

NIERO, R. ;MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CHECHINEL-FILHOS, V. aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Ciências farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. cap. 7, p.11-56.

OLIVEIRA, R. M.; GARCEZ, F.; MIOTTO, S. P. S.; SPOLADOR, L. A.; PANTALEÃO, S. M.; GUTIRRES, Z. R. Avaliação do potencial antimutagênico de extratos etanólicos da *Aiouea trinervis*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais. Águas de Lindóia: Congresso Brasileiro de Genética**, 2005. P. 1192.

OMS, Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: **OPAS**. 2010.

PERDOMO, R. T. **Avaliação da atividade antiproliferativa e da inibição das topoisomerases por extratos, substancias puras e semi-sintéticas obtidas de produtos naturais**. 2011 (Tese doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-MS/ UFMS, Campo Grande/MS, 2011.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 9, p. 858-869, 2007.

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

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta. Botânico Brasileiro**, v. 19, n. 3, p. 563-572, 2005.

QUINET, A.; KUTSCHENKO, D. C.; BARROS, F. S. M.; MORAES, M. M. V.; FERNANDEZ, E. P.; MESSINA, T. Lauraceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

REZENDE, J. M.; RASSI, A. Por que os Triatomíneos são chamados de “barbeiros”? **Revista de Patologia Tropical**, Uberaba-MG, v. 37, n. 1, p. 75-83, 2008.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KYBITZKI, K (Org.) **The families and Genera of vascular plants**, v. 2, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany, 1993.

SAKURAGUI, C. M.; CALAZANS, L. S. B.; STÉFANO, M. V.; VALENTE, A. S. M.; MAURENZA, D.; KUTSCHENKO, D. C.; PRIETO, P. V.; PENEDO, T. S. A. Meliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

SANTANA, S. S. **Nocaute de proteínas positivamente reguladas na fases inicial da metaciclo genese de *Trypanosoma cruzi* provocada a diminuição da capacidade proliferativa e de diferenciação do parasita.** 2014 (Monografia apresentada requisito parcial a conclusão do curso de Ciências Biológicas – Bacharel) Setor de Ciências Biológicas/ UFP, Curitiba, 2014.

SCHMUNIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: Zigman Brener, Zilton, Andrade; Manoel Barral-Neto. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

SHAPIRO, T. A. Inhibition of topoisomerases in African trypanosomes. *Acta Trop.* v. 54, p. 251-260, 1993.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 117-143, 1995.

SIMMONDS, M. S. J.; EVANS, H. C.; BLANEY, W. M. Pesticides for the year 2000: mycochemicals and botanicals, In A.A.S.A. Kadir, Pest management and the environment in 2000, **Wallingford**, p.127-164, 1992.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P., CORRÊA, A. D., GELLER, M. Aspectos históricos. In. **Moléstia de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. Cap. 7, P. 1-17.

SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell Sci.**, v. 102, p. 157–167, 1992.

SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 94, n. 1, p. 139-141, 1999.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORÊA, A. G. Atividade Antichagásica de Lignananas e Neolignananas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

TAN, Q. G ;LUO, X. D. Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. **Chemical reviews**, v. 111, p. 7437, 2011.

TARLETON, R. L.; GÜRTLER, R. E.; URBINA, J. A.; RAMSEY, J.; VIOTTL,R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. **Plos Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 10, 2014.

WHO World Health Organization, Midia Center. Chagas disease(American trypanosomiasis. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 20 jan. 2016.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasite, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, p. 44-48, 2011.