

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

BERNARDO DO REGO BELMONTE

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, AMEBICIDA E
ESQUISTOSSOMICIDA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E LECTINA DE
ORIGEM VEGETAL**

VIRTUS IMPAVIDA

Recife
2019

BERNARDO DO REGO BELMONTE

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, AMEBICIDA E
ESQUISTOSSOMICIDA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E LECTINA DE
ORIGEM VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Recife
2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Belmonte, Bernardo do Rego

Avaliação de atividades antimicrobiana, amebicida e esquistossomicida de metabólitos secundários e lectina de origem vegetal / Bernardo do Rego Belmonte. - 2019.

140 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Lectinas. 3. Esquistossomose. I. `Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora). II. Napoleão, Thiago Henrique (coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-130

BERNARDO DO REGO BELMONTE

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, AMEBICIDA E
ESQUISTOSSOMICIDA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E LECTINA DE
ORIGEM VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 31/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André de Lima Aires (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Thamara Figueiredo Procópio Vasconcelos (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico aos meus pais, Luciana e Carlos Alberto e aos meus irmãos, Amanda e Hugo Leonardo e à minha linda noiva Geórgia Félix.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por minha família e amigos. Quero agradecer a minha noiva por todo o carinho, amor, sugestões, alegrias, amizade, companheirismo e o grande auxílio para construção da tese. Agradeço a minha mãe Luciana e meu pai Carlos Alberto pelo zelo, carinho, amor, confiança e aos meus irmãos Amanda e Hugo por todo o auxílio, amizade e carinho e todo eles o apoio necessário para finalizar essa jornada. Aos meus sobrinhos pela alegria, energia e carinho. A minha sogra Goreti por toda a ajuda, conversas e amizade. Aos meus tias e tios por todo o auxílio, amizade, carinho, aconselhamento e afeto. Quero agradecer a todos os meus amigos que de forma direta e indireta me auxiliaram ao longo da caminhada do doutorado.

Agradeço por todo o apoio e auxílio prestado pelo Laboratório de Bioquímica de Proteínas, em especial a Pollyanna, Maiara, Carlos, Dayvid, Poliana, Robson, Danilo, Cláudio. Aos técnicos e outros laboratórios do departamento de Bioquímica que por muitas vezes forneceram espaço, equipamentos e auxílios técnicos na jornada de experimentos.

Agradeço ao Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química da UFPE, ao Laboratório Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos do Departamento de Farmacologia da UFPE, ao Laboratório Experimental de Esquistossomose da UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE, ao Departamento de Morfologia da UFS e todas as suas equipes, pois várias atividades de pesquisas realizadas para esta tese também foram desenvolvidas nesses laboratórios.

Agradeço de forma super especial a minha Orientadora Patrícia e Coorientador Thiago pela assistência, oportunidade, paciência e confiança em poder desenvolver essa tese, acompanhando-me desde a iniciação científica até o doutorado.

Agradeço também ao Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pela concessão da bolsa acadêmica desde a iniciação científica, mestrado e doutorado, sendo essencial na manutenção das atividades científicas realizadas.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos analisar os efeitos de preparações de sementes *Moringa oleífera* (extrato aquoso, fração proteica e lectina WSMoL) sobre a viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*; investigar os efeitos do extrato e fração proteica sobre a viabilidade de casais de *Schistosoma mansoni*; determinar a ação do extrato etanólico de folhas de *Schinus terebinthifolia* e de frações derivadas sobre bactérias e fungos patogênicos ao homem, além de bactérias fitopatogênicas e da ameba *A. castellanii*. A partir do extrato aquoso de sementes de *M. oleífera*, foi obtida a fração proteica por precipitação salina e a lectina por cromatografia de afinidade. O extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* foi preparado e frações orgânicas foram obtidas por meio de partições. A composição do extrato e frações foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para atividade amebicida, as amostras foram incubadas com trofozoítos por 24 e 48 h e a viabilidade foi determinada pela concentração inibitória (CI_{50}). A ocorrência de danos na membrana celular e alteração no tamanho dos trofozoítos foi evidenciada por citometria de fluxo. Na avaliação da atividade esquistossomicida, casais de *Schistosoma mansoni* foram incubados com as amostras, sendo analisadas motilidade, sobrevivência e viabilidade celular. Atividades antibacteriana e antifúngica foram avaliadas pelo método de diluição em caldo, determinando-se os valores de concentração mínima inibitória, bactericida e fungicida. O extrato aquoso e a fração proteica 0-60% de *M. oleífera* reduziram a viabilidade de *A. castellanii*, com CI_{50} de 2.150 e 423,72 $\mu\text{g/mL}$ (24 h) e 1.520 e 469 $\mu\text{g/mL}$ (48 h). Análise por citometria de fluxo revelou que amebas incubadas com o extrato apresentaram tamanho reduzido e que extrato e fração causaram danos à membrana celular. Com relação à ação esquistossomicida, o extrato e a fração promoveram a inviabilização celular dos vermes, com CI_{50} de 23,48 e 8,93 $\mu\text{g/mL}$ para 24h, respectivamente, sendo detectada uma taxa de desacalamento de 100% nas concentrações a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para a fração. A CCD do extrato etanólico de *S. terebinthifolia* revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides, terpenos, esteroides, cumarinas e açúcares redutores. Por meio de CLAE, foi possível evidenciar a presença de ácido gálico e rutina. O extrato apresentou ação inibitória sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já as frações inibiram *S. aureus*, entretanto com atividade reduzida comparada ao extrato. Foi constatada ainda atividade inibitória do extrato sobre os fungos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e das frações sobre *C. albicans*, porém em menor intensidade que o extrato. Sobre as bactérias

fitopatogênicas foram detectadas atividades inibitória e bactericida do extrato sobre isolados de *Pectobacterium*, contudo as frações promoveram apenas ação bacteriostática. A fração butanólica do extrato de *S. terebinthifolia* apresentou ação amebicida sobre trofozoítos de *A. castellanii* (IC₅₀ de 33,72 (24 h) e 38,55 µg/mL (48 h)). Em conclusão, o estudo contribuiu para ampliar o conhecimento de potenciais candidatos a moléculas com ação antimicrobiana, equistossomicida e amebicida, a partir de compostos extraídos das sementes de *M. oleifera* e das folhas de *S. terebinthifolia*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba castellanii*. Atividade antimicrobiana. *Moringa oleifera*. *Schinus terebinthifolia*. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effects of *Moringa oleifera* seed preparations containing the WSMoL lectin (aqueous extract, protein fraction and isolated WSMoL) on the viability of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites; to investigate the effects of the extract and protein fraction on the viability of *Schistosoma mansoni* couples; to determine the action of the ethanolic extract of *Schinus terebinthifolia* leaves and fractions derived on bacteria and fungi pathogenic to human, in addition to phytopathogenic bacteria and the amoeba *A. castellanii*. From the aqueous extract of *M. oleifera* seeds, the protein fraction was obtained by precipitation with ammonium sulfate. The WSMoL lectin was isolated from the fraction by affinity chromatography. The ethanolic extract of leaves of *S. terebinthifolia* was prepared and organic fractions were obtained by means of partitions. The composition of the extract and fractions was evaluated by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). For amoebicidal activity, samples were incubated with trophozoites for 24 and 48 h and viability was determined by the inhibitory concentration (IC₅₀). The occurrence of damage to the cell membrane and changes in the size of the trophozoites was evidenced by flow cytometry. In the evaluation of schistosomicidal activity, couples of *Schistosoma mansoni* were incubated with the samples, and motility, survival and cell viability were analyzed. Antibacterial and antifungal activities were evaluated using the broth dilution method, determining the minimum inhibitory, bactericidal and fungicidal concentration values. The aqueous extract and the 0-60% protein fraction of *M. oleifera* reduced the viability of *A. castellanii*, with IC₅₀ of 2,150 and 423,72 µg/mL (24 h) and 1,520 and 469 µg/mL (48 h). Flow cytometric analysis revealed that amoebae incubated with the extract were reduced in size and that the extract and fraction caused damage to the cell membrane. With regard to the schistosomicidal action, the extract and the fraction promoted the cellular impracticability of the worms, with IC₅₀ of 23.48 and 8.93 µg / mL for 24h, respectively, being detected a rate of 100% uncoupling in the concentrations from 25 µg/mL for the extract and 6.25 µg/mL for the fraction. The TLC of the ethanolic extract of *S. terebinthifolia* revealed the presence of hydrolyzable tannins, flavonoids, terpenes, steroids, coumarins and reducing sugars. Through HPLC, it was possible to evidence the presence of gallic acid and rutin. The extract showed an inhibitory action on *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The fractions inhibited *S. aureus*, however, with reduced activity compared to the extract. There was also an inhibitory activity of the extract on the fungi *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and the

fractions on *C. albicans*, but in less intensity than the extract. On phytopathogenic bacteria, inhibitory and bactericidal activities of the extract were detected on *Pectobacterium* isolates, however the fractions promoted only bacteriostatic action. The butanolic fraction of *S. terebinthifolia* extract showed amebicidal action on *A. castellanii* trophozoites (IC₅₀ of 33.72 (24 h) and 38.55 µg / mL (48 h)). In conclusion, the study contributed to expand the knowledge of potential candidates for molecules with antimicrobial, equistossomicide and amoebicide action, from compounds extracted from the seeds of *M. oleifera* and the leaves of *S. terebinthifolia*.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*. Antimicrobial activity. *Moringa oleifera*. *Schinus terebinthifolia*. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1 – Espécie <i>Moringa oleifera</i> .	21
Figura 2 – Aspectos <i>Moringa oleifera</i> (A) folhas, (B) sementes, (C) flores e (D) vagens.	22
Figura 3 – Distribuição geográfica da espécie <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi nos estados brasileiros.	24
Figura 4 – Espécie <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.	25
Figura 5 – Aspectos <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi: folhas e frutos.	26
Figura 6 – Representação esquemática da ligação lectina-carboidrato e do mecanismo da aglutinação celular.	28
Figura 7 – Rota biossintética para diversos tipos de metabólitos secundários utilizando a glicose como precursor.	33
Figura 8 – Estrutura química da rutina.	34
Figura 9 – Estrutura química do ácido gálico e alguns dos seus derivados n-alquil-ésteres.	35
Figura 10 – Micrografia Eletrônica de Varredura de diferentes estágios do ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .	40
Figura 11 – Esquema do ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .	41
Figura 12 – Microscopia por Contraste de Fases de Amebas da Espécie <i>Acanthamoeba castellanii</i> .	43
Figura 13 – Diferentes estágios de excistamento de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .	44

Artigo 1 – Avaliação da atividade amebicida de extrato aquoso, fração proteica e lectina (WSMoL) de sementes de *Moringa oleifera* sobre *Acanthamoeba castellanii*

Figura 1 – Efeitos <i>in vitro</i> do extrato aquoso de sementes de <i>M. oleifera</i> na viabilidade celular de trofozoítos de <i>A. castellanii</i> (8×10^4 céls/mL) tratados por um período de 24 h (A) ou 48 h (B). Letras diferentes indicam diferença	66
---	----

significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Análise de dois experimentos independentes em triplicata.

Figura 2 – Efeitos *in vitro* da fração proteica do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* na viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (8×10^4 céls/mL) tratados por um período de 24 h (A) ou 48 h (B). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Análise de dois experimentos independentes em triplicata. 67

Figura 3 – Histograma do efeito sobre a viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (1×10^5 céls/mL) submetidos ao tratamento com extrato aquoso e fração proteica de sementes de *M. oleifera* após um período de 24 h. As amebas foram coradas com iodeto de propídeo (PI). O gráfico *Count* (contagem) versus BL3-A (640 nm) foram usados para discriminar a integridade da membrana de células do controle (A), de células mortas submetidas ao banho-maria ($90^\circ\text{C}/20\text{min}$) (B), tratamento com o extrato na concentração de $2000 \mu\text{g/mL}$ (C) e o tratamento com a fração proteica na concentração de $469 \mu\text{g/mL}$ (D). 68

Figura 4 – Efeito de extrato aquoso e fração proteica de sementes de *M. oleifera* sobre o tamanho de células (FSC – Forward Scatter) e granulosidade ou complexidade celular (SSC–Side Scatter) de trofozoítos de *A. castellanii*. Os gráficos SSC versus FSC foram usados para determinar a influência das amostras. Estão representadas células controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria ($90^\circ\text{C}/20\text{min}$) (B), extrato aquoso na concentração de $2000 \mu\text{g/mL}$ (C), fração proteica na concentração de $469 \mu\text{g/mL}$ (D). 69

Artigo 2 – Avaliação da atividade esquistossomocídica de preparações de lectina de sementes de *Moringa oleifera* sobre *Schistosoma mansoni*

Figura 1 – Efeitos *in vitro* do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* na 84
viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. Gêmeos de vermes adultos
foram tratados com amostras em diferentes concentrações (12,5 - 100 µg/mL) por
24 h, a viabilidade foi medida usando o ensaio MTT e a leitura do corante
formazan reduzido registrada a 550 nm. Os controles negativos dos vermes foram
incubados no RPMI 1640. O Praziquantel (PQZ, 10 µM ou 3,124 µg / ml) foi
usado como grupos de controle positivo. A viabilidade foi expressa como média
± desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras
diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p <0,05).

Figura 2 – Efeitos *in vitro* da fração proteica do extrato aquoso de *M. oleifera* na 85
viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. Gêmeos de vermes adultos
foram tratados com amostras em diferentes concentrações (6,25 - 50 µg/mL) por
24 h, a viabilidade foi medida usando o ensaio MTT e a leitura reduzida de
corante de formazan registrada a 550 nm. Os controles negativos dos vermes
foram incubados no RPMI 1640. O Praziquantel (PQZ, 10 µM ou 3,124 µg/mL)
foi usado como grupos de controle positivo. A viabilidade foi expressa como
média ± desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras
diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p <0,05).

Artigo 3 – Atividades antimicrobiana e amebicida *in vitro* do extrato etanólico de *Schinus terebinthifolia* folhas e suas frações

Figura 1 – Espectros de varredura do cromatograma de extrato etanólico e 104
frações (F1-F4) de folhas de *S. terebinthifolia*. (A) Cromatograma com leitura
em 270 nm. O pico 1 (Rt = 12, 21 min) é indicativo da presença de ácido gálico
e o pico 2 (Rt = 24, 3 min) de seus derivados. (B) Cromatograma com leitura a
350 nm. Picos entre 3 e 7 (Rt = 26 e 28 min) são indicativos da rutina e seus
derivados.

Figura 2 – Efeitos *in vitro* da fração butanol de *S. terebinthifolia* sobre a 111
viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (8 x 10⁴ células/mL)
submetidos ao período de 24 h (A) e ao período de 48 h (B) analisados no

espectrofotômetro a 562 nm, através do teste de sulforodamina B. A viabilidade foi expressa como média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Análise de duas experiências independentes em triplicata.

Figura 3 – Histograma do efeito sobre a viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (1×10^5 células/mL) submetidos ao tratamento com a fração butanol de *S. terebinthifolia* sai após 24 h, corado com iodeto de propídio (PI). O gráfico Count vs. BL3-A (640 nm) indica a integridade das células da membrana do controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria (90 °C / 20 min) (B), tratamento com F₄ na concentração de 33,72 µg/mL (C). 112

Figura 4 – Efeito da fração butanol de folhas de *S. terebinthifolia* no tamanho celular (FSC - Forward Scatter) e granularidade ou complexidade celular (SSC - Side Scatter) de trofozoítos de *A. castellanii*, caracterizados nos gráficos SSC versus FSC. Células controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria (90 °C / 20 min) (B), tratamento com F₄ na concentração de 33,72 µg/mL (C) foram evidenciadas. 113

LISTA DE TABELAS

Artigo 2 – Avaliação da atividade esquistossomocídica de preparações de lectina de sementes de *Moringa oleifera* sobre *Schistosoma mansoni*

Tabela 1 – Escores de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com praziquantel (PZQ) e extrato aquoso de *Moringa oleifera* em diferentes tempos pós-incubação. 82

Tabela 2 – Escores de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com praziquantel (PZQ) e fração protéica de sementes de *Moringa oleifera* em diferentes tempos pós-incubação. 83

Artigo 3 – Atividades antimicrobiana e amebicida *in vitro* do extrato etanólico de *Schinus terebinthifolia* folhas e suas frações

Tabela 1 – Fase móvel, agentes cromogênicos e padrões utilizados na análise fitoquímica da cromatografia em camada delgada (CCD). 103

Tabela 2 – Atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia*. 105

Tabela 3 – Atividade antibacteriana de frações (F₁-F₄) de folhas de *S. terebinthifolia* em *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e UFPEDA 670. 106

Tabela 4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico de *S. terebinthifolia* sobre fungos do gênero *Candida*. 107

Tabela 5 – Atividade antifúngica das frações (F₁-F₄) de folhas de *S. terebinthifolia* em *Candida albicans* URM 5901. 108

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S. terebinthifolia* em bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*. 109

Tabela 7 – Atividade antimicrobiana das frações (F₁-F₄) de *S. terebinthifolia* em bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*. 110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.1.1	<i>Moringa oleifera</i> Lam.....	20
2.1.2	<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi (Aroeira-da-praia)	23
2.2	METABÓLITOS DE PLANTAS.....	27
2.2.1	Metabólitos primários.....	27
2.2.1.1	Lectinas.....	28
2.2.1.1.1	Lectina WSMoL.....	29
2.2.2	Metabólitos Secundários.....	32
2.2.2.1	Rutina.....	34
2.2.2.2	Ácido gálico.....	35
2.3	PARASITOSEs HUMANAS.....	36
2.3.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	36
2.3.2	<i>Acanthamoeba Castellanii</i>	42
2.4	MICROORGANISMOS.....	46
2.4.1	Bactérias patogênicas.....	49
2.4.2	Bactérias fitopatogênicas.....	50
2.4.3	Fungos patogênicos.....	51
3	RESULTADOS.....	53
3.1	ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DE EXTRATO AQUOSO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA (WSMOL) DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i> SOBRE <i>Acanthamoeba castellanii</i>	53
3.2	ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICÍDICA DE PREPARAÇÕES DE LECTINA DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i> sobre <i>Schistosoma mansoni</i>	70
3.3	ARTIGO 3 - ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E AMEBICIDA <i>in vitro</i> DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Schinus terebinthifolia</i> FOLHAS E SUAS FRAÇÕES	86
4	CONCLUSÃO.....	114

REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE	140
ÉTICA.....	

1 INTRODUÇÃO

Os agentes patogênicos possuem a capacidade de promover doenças infecto-parasitárias em hospedeiros suscetíveis. Por refletirem diretamente as baixas condições socioeconômicas, habitacionais, alimentares e de higiene da população, essas doenças além de ocasionarem danos aos indivíduos constituem um importante problema de saúde pública. A magnitude ou gravidade com que acometem humanos, plantas e outros animais pode ser devido ao surgimento de novas cepas patogênicas e a ampliação da resistência aos antimicrobianos (PIOLI *et al.*, 2016).

A resistência aos medicamentos são responsáveis por 700 mil mortes por ano em todo o mundo (OMS, 2019) e está sendo acelerada pelo uso inadequado de antimicrobianos no tratamento das enfermidades humanas e na pecuária, piscicultura e agricultura (KHACHATOURIANS, 1998, KUMMERER, 2004). Nesse contexto, estão as bactérias *Klebsiella pneumoniae* (OLIVEIRA *et al.*, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (NEVES *et al.*, 2011), *Salmonella enteritidis* (PAUDYAL *et al.*, 2018), *Micrococcus luteus* (LIEBL; KLOOS; LUDWIG, 2002), *Staphylococcus aureus* (FOSTER, 2017), bem como as bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium* (ARNAUD; DESCLOS-THEVENIAU; ZIMMERLI, 2012). Entre as leveduras, estão as do gênero *Candida* (JIN *et al.*, 2016; BERKOW; LOCKHART, 2017). E parasitos do gênero *Schistosoma* (PINTO-ALMEIDA *et al.*, 2016; 2018) e as do gênero *Acanthamoeba* (CHEN *et al.*, 2019).

Desse modo, pesquisas envolvendo plantas medicinais com potencial antimicrobiano tem ganhado destaque na busca por substâncias bioativas, presentes nos extratos, frações, óleos e compostos purificados, que apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro e com ação contra organismos resistentes (LORENZI; MATOS, 2002).

A planta medicinal *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-da-praia) pertence à família Anacardiaceae, e é encontrada no Brasil desde a Mata Atlântica do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008; LORENZI; MATOS, 2008). O decocto da casca é utilizado pela população nos tratamentos de micoses e infecção por *Candida* (LLOYD *et al.*, 1977; LORENZI; MATOS, 2008). Foi relatado que os extratos etanólico e diclorometanólico de folhas apresentaram componentes como flavonoides, xantonas, leucoantocianidina e esteroides livres com atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (LIMA *et al.*, 2006; EL-MASSRY *et al.*, 2009).

Moringa oleifera Lam., da família Moringaceae, é cultivada no Brasil como planta ornamental e medicinal (LORENZI; MATOS, 2008). Estudos demonstraram que o extrato aquoso e etanólico de sementes promoveram ação inibitória sobre bactérias da espécie *Vibrio cholerae* (VIEIRA *et al.*, 2010). Suas sementes são amplamente estudadas, sendo evidenciadas suas atividades hipotensiva, antioxidante, antibacteriana, coagulante/floculante no tratamento de água e cercaricida sobre *Schistosoma mansoni* (FAIZI *et al.*, 1995; GUPTA *et al.*, 2005; LORENZI; MATOS, 2008; FERREIRA *et al.*, 2011). Estas propriedades de *M. oleifera* estão associadas a moléculas bioativas do metabolismo primário e secundário. Dentre os metabólitos primários, destacam-se as lectinas.

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos e apresentam diversas atividades biológicas. As lectinas cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) foram isoladas a partir das sementes de *M. oleifera* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). WSMoL apresentou atividades antibacteriana e antibiofilme (COELHO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012, 2014; FREITAS *et al.*, 2016a, 2016b; MOURA *et al.*, 2015, 2016, 2017).

Este trabalho teve como objetivo avaliar preparações de sementes de *M. oleifera* contendo a lectina WSMoL quanto à ação antiparasitária contra *A. castellanii* e *S. mansoni* e extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* e suas frações quanto às atividades antimicrobiana contra bactérias e fungos e atividade amebicida.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização das plantas medicinais para fins terapêuticos está presente desde as primeiras civilizações. Essas plantas são reconhecidas pela produção de compostos bioativos, oriundos do metabolismo primário e secundário, que podem ser extraídos de folhas, flores, caule, casca, frutos e sementes. Muito desses compostos ainda precisam ser identificados e/ou meteticulosamente estudados, a fim de explorar seus potenciais terapêuticos auxiliando na prevenção e tratamento de várias enfermidades humanas. Estima-se que entre milhares de espécies de vegetais no planeta, cerca de 10%, tenha sido explorada para caracterizar seu potencial farmacológico e cerca de 80% da população mundial de países em desenvolvimento utilizam fitoterápicos para sua sobrevivência. Nesse contexto, a busca por produtos naturais que possam ser alternativas medicamentosas vem crescendo em todo mundo, buscando-se sempre compostos eficazes, perfis de alta qualidade, segurança e custo-benefício em relação aos compostos sintéticos (LORENZI; MATOS, 2008; CARVALHO; SILVEIRA, 2010; SHARMA *et al.*, 2020). Dentre as plantas medicinais da flora exótica e nativa que tem apresentado promissoras atividades biológicas estão a *Moringa oleifera* e a *Schinus terebinthifolia*.

2.1.1 *Moringa oleifera* Lam

Moringa oleifera Lamarck (1785) é uma espécie de vegetal que pertence à ordem Brassicales e à família Moringaceae. O gênero *Moringa* contempla 13 espécies (CORDEIRO *et al.*, 2008). A moringa apresenta variados nomes populares como “lírio branco”, “quiabo de quina” ou “moringa”. É um vegetal nativo do noroeste indiano, mas tem se espalhado por regiões subtropicais e tropicais, sendo também encontrada nas regiões asiática, africana e americana (BHATIA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

M. oleifera apresenta porte arbóreo, alcançando cerca de 7 a 12 metros de altura, possuindo uma copa com aspecto ralo (Figura 1). Suas folhas são do tipo composta bipinada imparipinada, com folíolos obovais, pequenos e glabros (Figura 2A). Suas inflorescências são do tipo racemo com coloração branca e odor agradável (Figura 2C). Seus frutos se assemelham a vagens, porém são do tipo cápsula que se abrem na

maturidade (deiscentes) possuindo seção triangular (Figura 2D). O fruto pode atingir até 35 cm de comprimento, apresentando sementes oleaginosas e trialadas (Figura 2B) (LORENZI; MATOS, 2002; BEZERRA *et al.*, 2004a).

Figura 1 – Espécie *Moringa oleifera*.



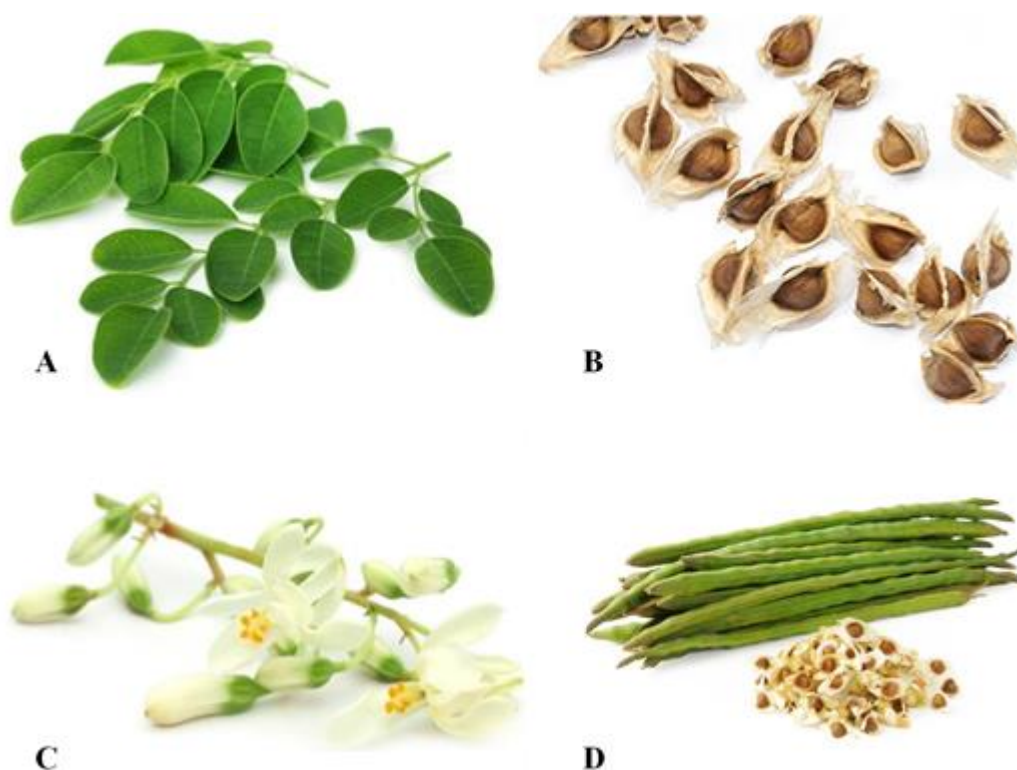
Fonte: <https://www.sitiodamata.com.br/moringa-moringa-oleifera>, acesso em 21 jul. 2019.

M. oleifera é uma planta perene podendo se desenvolver em ambientes irrigados ou secos (LORENZI; MATOS, 2002). Para sua sobrevivência não é necessário solos e adubações especiais (SILVA; KERR, 1999), entretanto consegue se desenvolver muito bem em solos de terra preta com boa drenagem e em terras pretas argilosas, apresentando predileção a solos neutros a levemente ácidos (DALLA ROSA, 1993). O vegetal consegue manter-se vivo e com produção ativa mesmo em zonas com baixa umidade do solo, alta temperatura, alta taxas de evaporação e grandes precipitações, tornando compatível seu cultivo em regiões semiáridas como ocorre na região nordeste brasileira (ALMEIDA *et al.*, 1999).

As sementes de *M. oleifera* (Figura 2B) apresentam cerca de 33,9% de proteínas, 37,2% de lipídeos (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Seu óleo possui cerca de 71,6% de ácido graxo oleico (insaturado dominante) e 6,4% tanto para o ácido graxo palmítico quanto para o behênico (saturados dominante) (LALAS; TSAKINS, 2002). As sementes apresentam maior longevidade em temperaturas menores ou iguais a 10 °C e umidade

relativa em torno 50 a 60% (FREITAS *et al.*, 2000; PÁDUA; VIEIRA, 2001; BEZERRA *et al.*, 2004a).

Figura 2 – Aspectos *Moringa oleifera* (A) folhas, (B) sementes, (C) flores e (D) vagens.



Fontes: https://www.moringaforlife.com.pk/page/Moringa_By_Parts, acesso em 21 jul. 2019 (A); <https://glowroad.com/500-gms-moringa-seeds-moringa-oleifera-seeds-moringa-seed-kernels-moringa-pkm1-seeds-pkm-1-seeds-moringa-tree-seeds/az/B0711N19H1>, acesso em 01 jul. 2019 (B); <https://erva.com.au/blogs/erva/a-flower-for-flowery-sex>, acesso em 21 jul. 2019 (C); <https://www.sadestar.com.br/2017/10/beneficios-sementes-de-moringa.html>, acesso em 01 jul. 2019 (D).

M. oleifera possui variadas aplicações, sendo utilizada na medicina, na indústria e na alimentação humana e de animais (PALADA, 1996; MAKKAR; BECKER, 1997). Diferentes partes da planta são utilizadas popularmente para tratar enfermidades, como escorbuto, feridas e infecções cutâneas, problemas na próstata e na bexiga e até em tumores abdominais (SREELATHA *et al.*, 2011). As sementes de *M. oleifera* apresentam a propriedade de purificar e clarificar a água, tornando-se muito útil em ambientes com carência de tratamento hídrico (OKUDA *et al.*, 2001; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; KUMARI *et al.*, 2006).

M. oleifera é um vegetal rico em nutrientes, apresentando-se como fonte de sais minerais (ferro, magnésio, fósforo e cálcio), vitaminas (B6, B2 e C), carotenoides

provitamina A, proteínas digestíveis, ácidos graxos e aminoácidos essenciais (MORTON, 1991; SESHADRI; NAMBIAR, 2003; FAHEY, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008; MEHTA *et al.*, 2011; MAHESHWARI *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2017).

O extrato aquoso da semente de *M. oleifera*, contendo lectinas, promoveu mortalidade de larvas e ovos de *A. aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012), assim como seu extrato metanólico apresentou efeito larvicida e pupicida sobre *Anopheles stephensis* (PRABHU *et al.*, 2010). Ademais, tanto os extratos etanólico e aquoso apresentaram efeitos sobre *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (CACERES *et al.*, 1991; VIERA *et al.*, 2010). Outro estudo demonstrou que, a associação entre fração de proteínas de semente de moringa e a bentonita (associação de argila) acarretou uma redução de 90% do número de cercárias de *S. mansoni* tornando a água potável, sem riscos de contaminações (LORENZI; MATOS, 2008).

Além dos extratos derivados das sementes, extratos obtidos de flores e folhas também apresentam variadas atividades biológicas, como o extrato de flores e o inibidor de tripsina purificado a partir dele apresentaram ação antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (PONTUAL *et al.*, 2018). Extratos aquosos de folhas e de sementes apresentaram ação bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CACERES *et al.*, 1991; VIERA *et al.*, 2010).

M. oleifera possui ainda diversas outras propriedades como ação antiespasmódica, anti-inflamatória e diurética do extrato aquoso de sementes (CACERES *et al.*, 1992); antitumoral do extrato etanólico de sementes (GUEVARA *et al.*, 1999); hipotensiva do extrato etanólico e frações de sua vagens (FAIZI *et al.*, 1994; FAIZI *et al.*, 1998); anti-hipertensivo do extrato aquoso folhas (DANGI *et al.*, 2002); antifúngica do extrato etanólico de folhas (CHUANG *et al.*, 2007).

2.1.2 *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira-da-praia)

Schinus terebinthifolia Raddi (1820) apresenta grande variedade de nomes populares, tais como aroeira-da-praia, aroeira-pimenteira, aroeira-marrom, aroeira-vermelha, dentre vários outros (SOUZA; LORENZI, 2005). Apresenta distribuição na região tropical e subtropical (SOUZA; LORENZI, 2005), porém sua origem é da América do sul, natural do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (LORENZI, 2002). No Brasil, a planta ocorre nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição geográfica da espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi nos estados brasileiros.



Fonte: Modificado de SILVA-LUZ; PIRANI, 2015.

Essa espécie se desenvolve em ambiente terrestre possuindo porte arbustivo ou arbóreo que varia entre 5 a 10 m de altura e diâmetro caular de 30-60 cm (Figura 4). É uma planta do tipo heliófila e pioneira, encontrada comumente em regiões ribeirinhas, córregos e várzeas úmidas, sendo pouco exigente com o solo e umidade. Sua madeira apresenta notável resistência e durabilidade natural (LORENZI, 2008; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Seu caule é revestido por uma casca grossa de cor parda, com a presença de fendas no sentido longitudinal e transversal, enquanto a superfície interna tem como característica uma cor avermelhada com a presença de estrias longitudinais. Muitas vezes há a presença de resinas na superfície (CORRÊA, 1926; BALBACH, 1956; FLEIG, 1989; JORGE; MARKMANN, 1996; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Figura 4 – Espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi.



Fonte: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/terra-da-gente/flora/noticia/2015/01/aroeria-vermelha.html>, acesso em 21 jul. 2019.

Suas folhas são do tipo compostas, imparipenadas com 5 a 7 folíolos, dimensão de 3-7 cm de comprimento e 2-3 cm de largura. Apresentam consistência do tipo membranácea, com pecíolos cilíndricos, venação penínervia e sem a presença de estípulas (Figura 5). A folhagem se mantém durante todo o ano (tipo perenifólia) de cor verde-escura (LORENZI, 2008; FAGUNDES, 2007).

Sua inflorescência é uma panícula racemosa, caracterizada na forma de cacho, que apresenta disposição axilar (lateral) ou terminal. As inflorescências apresentam pequenas flores com tom esbranquiçado. As flores são melíferas, possuindo a capacidade de atrair as abelhas para a produção de mel. O período de florescimento ocorre no período de setembro a janeiro (FAGUNDES *et al.*, 2007; LORENZI, 2008).

Os frutos de *S. terebinthifolia* são do tipo drupa de forma globosa que apresenta coloração vermelha quando em seu estágio maduro (Figura 5). São utilizados na culinária como condimento e como alimento pelo conjunto de aves da região, que naturalmente tende a disseminar suas sementes (dispersão zoocórica). O período de frutificação prevalece do período de janeiro a julho (LORENZI, 2008).

As folhas, cascas e frutos de *S. terebinthifolia* são utilizados para fins terapêuticos devido a variadas propriedades medicinais (BORIO; CECY; YASUMOTO, 1973; GILBERT; FAVORETO, 2011). O decocto da casca tem sido usado pela população nos tratamentos de inflamação pós-parto, cicatrização, doenças do sistema urinário e do aparelho respiratório, hemoptise e hemorragia uterina, micoses e infecção por *Candida*

(LLOYD *et al.*, 1977; LORENZI; MATOS, 2008; SANTOS *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2013). Alguns ensaios clínicos corroboram com algumas utilizações popular de *S. terebinthifolia*, como a ação dedesinfecção vaginal da casca, sobre quadros de cervicite e cervico-vaginite crônica (AMORIM; SANTOS, 2003; SILVA *et al.*, 2003), ação anti-inflamatório da entrecasca (MEDEIROS *et al.*, 2007), O reparo tecidual de lesões bucais em *Rattus norvegicus* tratados com extrato de folhas (RIBAS *et al.*, 2006), Ação antialérgica e anti-edema da fração acetato de etila de folhas (CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008). Carlini e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram efeito protetor contra ulcerações gástricas, além da redução de hemorragia gástrica e trânsito intestinal.

Figura 5 – Aspectos *Schinus terebinthifolia* Raddi: folhas e frutos.



Fonte: <https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/schinus-terebinthifolius>, acesso em 21 jul. 2019.

As folhas, cascas e frutos de *S. terebinthifolia* apresentam também variadas atividades biológicas. O extrato etanólico da folha apresenta ação inibitória sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans* com concentração mínima inibitória (CMI) variando 0,75 a 0,95 (EL-MASSRY *et al.*, 2009). Frações de hexano e diclorometano das folhas apresentaram ação inibitória (MIC = 15,6 µg/mL) sobre o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (JOHANN *et al.*, 2010). Uma Lectina extraída das folhas (SteLL) apresentou atividade antitumoral e atividade antinociceptiva em camundongos portadores de sarcoma 180, não induzindo alterações hematológicas e efeitos genotóxico, entretanto,

possuindo um certo grau de toxicidade hepática e renal (RAMOS *et al.*, 2019; 2020). O extrato etanólico de folhas ainda apresentou atividade antioxidante, além de inibir (15,62 µg/mL) o crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis*, já o extrato de caule inibiu o *E. faecalis* com CMI de 500 µg/mL (COSTA *et al.*, 2015). O extrato hidroetanólico da casca promoveu efeito anti-herpético inibindo e eliminando cepas do vírus da Herpes simples tipo 1, *in vitro*, além de ação protetora contra lesões ocasionadas pelo vírus em camundongos *Mus musculus* (NOCCHI *et al.*, 2017). Extrato etanólico da casca foi utilizada no tratamento de alveolite em ratos, sendo eficaz contra *Streptococcus viridans*, *Streptococcus β-hemolytica*, *Bacillus corineforme*, *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-positivas presentes na alveolite (MELO-JUNIOR *et al.*, 2000). Há relatos que frações da casca enriquecida com flavonóides, seriam capazes de promover a quebra do DNA, gerando lesões que poderiam acarretar mutações (VARELA-BARCA *et al.*, 2007). Os óleos essenciais dos frutos apresentaram atividade sobre fungos do gênero *Candida*, atividade antioxidante, atividade citotóxica e atividade anticâncer sobre carcinoma mamário (BENDAOU, *et al.*, 2010). Os frutos apresentaram, também, atividade citotóxicas sobre células do adenocarcinoma colorretal epitelial humano, quando as células foram submetidas ao seu extrato diclorometanólico (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Entretanto há relatos da ausência de atividade antitumoral dos óleos essenciais em várias linhagens de câncer humano (ROVEDA *et al.*, 2010).

2.2 METABÓLITOS DE PLANTAS

O metabolismo representa o conjunto de reações catabólicas (degradação) e anabólicas (síntese) que ocorre no ambiente celular. Os compostos químicos formados nos processos síntese, degradação ou transformação são denominados de metabólitos. Em vegetais o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário (DI STASI, 1995; SIMÕES *et al.*, 2010).

2.2.1 Metabólitos primários

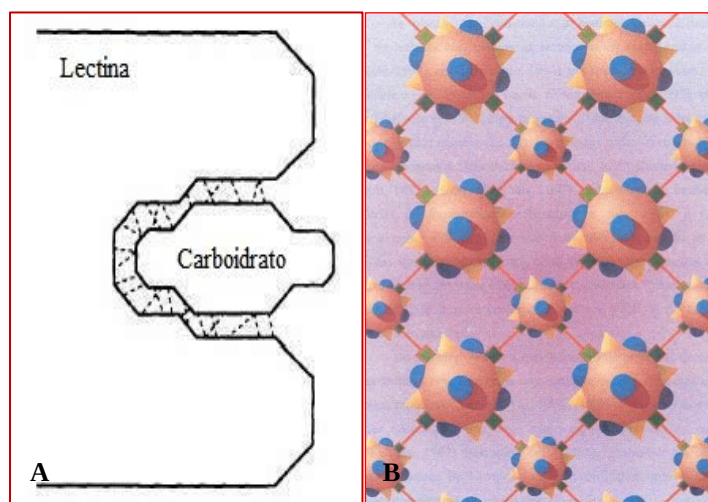
O metabolismo primário é composto por carboidratos, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, que são substâncias químicas vitais para a sobrevivência dos vegetais (BRAZ FILHO, 2010).

Os metabólitos primários estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal, na respiração, na fotossíntese, além da síntese de hormônios e proteínas. São encontrados em todas as espécies dentro de amplos grupos filogenéticos e comumente utilizam as mesmas vias bioquímicas ou similares (HOUNSOME *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Lectinas

Dentre as várias moléculas do metabolismo primário, destacam-se as lectinas. As lectinas são proteínas que possuem a capacidade de se ligar especificamente a carboidratos (Figura 6A). O termo *lectina* provém do latim “lectus” cujo significado é “selecionado”. Essas proteínas interagem com variados tipos celulares sendo, inclusive, capazes de promover aglutinação devido à ligação com os glicoconjugados presentes nas superfícies celulares (Figura 6B). A origem das lectinas não é imunológica, o que as diferencia de anticorpos que também têm a capacidade de reconhecer e aglutinar células (COELHO *et al.*, 2017).

Figura 6 – Representação esquemática da ligação lectina-carboidrato e do mecanismo da aglutinação celular.



(A) Desenho esquemático da ligação lectina-carboidrato. As linhas pontilhadas estão representando pontes de hidrogênio. (B) Representação esquemática da aglutinação celular promovida pelas lectinas. Lectina () interagindo com seus ligantes da superfície celular (, , ) onde os ligantes podem ser carboidratos ou não.

Fonte: A e B Kennedy *et al.*, 1995.

As lectinas são encontradas em variados tipos de organismos, desde vírus até plantas e animais, incluindo os seres humanos, atuando na mediação de eventos de reconhecimento biológico (RINI, 1995). Em plantas, elas têm sido detectadas em diversas partes como folhas (GOMES *et al.*, 2010), sementes (CARVALHO *et al.*, 2015), frutos (WEARNE *et al.*, 2012), flores (SANTOS *et al.*, 2009), raízes (SOUZA *et al.*, 2011), rizomas (SANTANA *et al.*, 2012), casca (ARAÚJO *et al.*, 2012) e cerne (SÁ *et al.*, 2008).

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas às lectinas. Nas plantas, desempenham ação defensora contra microrganismos patógenos e insetos, bem como participação em mecanismos de modulação, estocagem e mobilização de proteínas e carboidratos de reserva além de alongamento da parede celular (KENNEDY *et al.*, 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO *et al.*, 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES *et al.*, 2002; LIMPENS; BISSELING, 2003).

Além destas, outras inúmeras atividades biológicas e aplicações biotecnológicas são descritas, como o reconhecimento, diferenciação e determinação de tipos celulares (DANGUY *et al.*, 1998; FUNK; THOMPSON, 1998), isolamento e análise estrutural de oligossacarídeos e glicoconjugados (ENDO, 1996; HAYUNGA; SUMMER, 1986; XIE *et al.*, 2009; YAMASHITA; OHKURA, 2014), atividade cicatrizante (GONZÁLEZ *et al.*, 2014), atividades antiproliferativa (SILVA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (LEITE *et al.*, 2012), anti-parasitária (CASTANHEIRA *et al.*, 2015), antitumoral (ZHANG *et al.*, 2015), antimutagênico e antioxidante (FRASSINETTI *et al.*, 2015), imunomoduladora (PRASANNA; VENKATESH, 2015), antifúngica (CHIKALOVETS *et al.*, 2015), antibacteriana (CARVALHO *et al.*, 2015), antiviral (GORDTS *et al.*, 2015) e inseticida (NAPOLEÃO *et al.*, 2013).

2.2.1.1.1 Lectina WSMoL

Dentre as várias lectinas bioativas já estudada, a lectina WSMoL obtida de sementes de *M. oleifera* tem revelado variadas atividades promissoras. O termo WSMoL vem do inglês *Water Soluble M. oleifera Lectin*, que se refere a uma lectina solúvel em água isolada a partir das sementes de *M. oleifera* (SANTOS *et al.*, 2005). É uma proteína acídica (pI 5,5) com massa molecular nativa de 60 kDa (MOURA *et al.*, 2016). A WSMoL é isolada por cromatografia de afinidade em coluna de quitina e possui atividade hemaglutinante na faixa de pH entre 4,5 e 9,5. Sua ação hemaglutinante é inibida na presença de frutose e N-acetil-D-glicosamina, suporta aquecimento a temperatura de 100

°C, além de ser estimulada na presença do íon Mg^{2+} (SANTOS *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2009; ROLIM *et al.*, 2011).

A WSMoL apresenta variadas atividades biológicas, salientando a antimicrobiana e a inseticida. Ferreira e colaboradores (2011) demonstraram que esta lectina apresentou concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) sobre o *Staphylococcus aureus* de 7,8 µg/mL e 300 µg/mL respectivamente, enquanto contra *Escherichia coli* demonstrou CMI de 250 µg/mL. Moura e colaboradores (2015) observaram que a WSMoL interferiu no crescimento e sobrevivência de bactérias patogênicas que também podem estar associadas à biocorrosão: *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. pumillus*, *B. megaterium* com CMI de 10,4; 334; 10,4 e 20,8 µg/mL, respectivamente, e CMB de 167 µg/mL para *Bacillus* sp. e de 83,5 para *B. pumillus* e *B. megaterium*.

Outras três espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* também foram avaliadas: *Pseudomonas* sp., *P. stutzeri* e *P. fluorescens* com CMI de 167; 10,4 e 20,8 µg/mL, respectivamente, entretanto apenas foi detectado o CMB para a espécie *P. fluorescens* (20,8 µg/mL). Ademais, um representante do gênero *Micrococcus* e a espécie *Serratia marcescens* também foram avaliados pelos mesmos autores e apresentaram CMI de 41,7 e 5,2 µg/mL, sendo a ação bactericida detectada para *S. marcescens* (CMB igual ao valor de CMI). A avaliação por microscopia de fluorescência indicou que a WSMoL ocasionou a perda da integridade da membrana de *S. marcescens*, além de promover extravasamento de proteínas em todas as espécies sensíveis. Em continuidade ao estudo anterior, Moura e colaboradores (2017) afirmaram que a WSMoL, imobilizada ou não em vidro, preveniu a formação de biofilme por *S. marcescens* e *Bacillus* sp., sendo a ação antibiofilme vinculada à capacidade de danificar as células bacterianas.

No estudo de Coelho e colaboradores (2009) a WSMoL apresentou ação larvicida com concentração letal (CL_{50}) de 0,197 mg/mL sobre o quarto estágio larval de *A. aegypti*. A análise das larvas revelou ausência da camada que delimita o epitélio intestinal com hipertrofia dos segmentos. O extrato aquoso de sementes de *M. oleifera*, contendo WSMoL, demonstrou ação retardante no desenvolvimento das larvas desse mosquito.

Em outra pesquisa realizada por Santos e colaboradores (2012), os autores observaram que a lectina ainda apresentou ação estimulante da oviposição de fêmeas de *A. aegypti* e ação ovicida, promovendo tanto retardo no desenvolvimento quanto morte do embrião (SANTOS *et al.*, 2012). Em 2014, foi demonstrado em um experimento realizado em condições de semi-campo para avaliar o efeito de uma armadilha de captura de ovos de fêmeas adultas de *A. aegypti* (MosquiTRAPTM) contendo a lectina WSMoL

(0,1 mg/mL), que houve um efeito estimulante de oviposição ($65 \pm 14\%$) significativamente similar ($p < 0,05$) ao promovido pelo controle positivo representado pela infusão de *Panicum maximum*, tornando a lectina um candidato interessante para o controle de *A. aegypti* (SANTOS *et al.*, 2014).

Posteriormente, Santos e colaboradores (2018) analisaram o efeito da radiação gama nas doses de 10 mGy e 10Gy sobre a lectina WSMoL e possíveis alterações em sua ação larvícida e ovícida sobre *A. aegypti*. Os resultados mostraram que não houve perda de moléculas, mas ocorreu mudanças na conformação da proteína na dose de 10 Gy, bem como perda das atividades larvícida e ovícida. Porém, quando a lectina foi submetida a 10 mGy houve uma potencialização dessas atividades. No entanto, a estimulação da oviposição por WSMoL não foi observada em nenhuma das amostras irradiadas.

Agra-Neto e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparando a ação larvícida de WSMoL e a dinâmica das atividades enzimáticas de larvas de *A. aegypti* susceptíveis (cepa Rockefeller) ou resistentes (cepas Rec-R) a temefós, quando expostas ou não à lectina. Neste estudo, a WSMoL promoveu a mortalidade das cepas Rockefeller, entretanto, não promoveu as larvas Rec-R. Para as larvas Rockefeller, a lectina estimulou as atividades de protease, tripsina, α -amilase e α -esterase e reduziu β -esterase, enquanto a Rec-R apresentou diminuição da protease e α -amilase. Esses resultados mostram que as larvas dessas cepas apresentaram características bioquímicas diferentes, o que resulta na susceptibilidade diferencial a WSMoL.

Silva e colaboradores (2017) avaliaram a ecotoxicidade de WSMoL sobre embriões e larvas de peixes da espécie *Danio rerio*. A lectina apresentou CL_{50} de 0,190, 0,133 e 0,049 mg/mL após 48, 72 e 96 horas, respectivamente, sobre os embriões e CL_{50} de 0,21 e 0,135 mg/mL, após 24 h e 96 h, respectivamente, sobre as larvas de *D. rerio*. Além da letalidade sobre os embriões e as larvas, a lectina promoveu atraso na eclosão e redução do crescimento dos embriões e ocasionou inibição da acetilcolinesterase e hipoatividade das larvas. Sendo assim, não é recomendado o uso da lectina como larvícida em água contendo outros organismos.

Também foi descrita por Oliveira e colaboradores (2017) a ação de WSMoL sobre a fisiologia digestiva de larvas de farinha do mediterrâneo *Anagasta kuehniella*. O trabalho mostrou que a lectina prejudicou o ganho de peso das larvas em 50 % e promoveu alteração nas atividades das principais enzimas digestivas. A lectina comprometeu mais de 90% da capacidade de digestão das proteínas.

A atividade coagulante da WSMoL foi avaliada pela mediação da resistência elétrica e na presença de monossacarídeos e íons magnésio na pesquisa de Moura e colaboradores (2016). Os dados indicaram que a lectina reduziu tanto a densidade óptica quanto a resistência elétrica da suspensão de caulim, sugerindo que as partículas são desestabilizadas e em seguida ocorre a formação de complexos. Os íons de Mg^{2+} e carboidratos promoveram uma diminuição na capacidade coagulante da lectina, o que sugere que a conformação da proteína é importante para essa propriedade.

Ademais, a WSMoL também apresentou ação coagulante comparável ao sulfato de alumínio, tornando-se uma nova opção para o tratamento hídrico (FERREIRA *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2016). Rolim *et al* (2011) observaram que a WSMoL não possuiu ação genotóxica na faixa de concentração entre 0,0125 a 0,8 $\mu g/\mu L$. Como a concentração do extrato bruto requerida para o tratamento de água para consumo humano é de 0,2 $\mu g/\mu L$, a lectina não promoveria danos ao material genético.

Freitas e colaboradores (2016a) analisaram a eficácia de WSMoL na remoção de metais pesados da água. O estudo revelou que a eficiência de remoção foi de 49,00%, 53,21%, 71,45%, 55,42%, 69,88%, 62,14% e 49,36% para Cd^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} e Al^{+3} , respectivamente. Porém os metais interferiram na atividade hemaglutinante e antimicrobiana da lectina, provavelmente pela interação lectina/metais promovendo sua precipitação. Em outro ensaio, foi avaliada a associação do sulfato de alumínio e da WSMoL com o intuito de reduzir a turbidez e a toxicidade da água poluída. Foi evidenciado que o tratamento do sulfato de alumínio seguido da lectina foi o mais eficaz (96,8%) para a redução da turbidez, comparado à aplicação simultânea (91,3%), além de reduzir a concentração residual de alumínio de 35 para 0,3 mg/L. A ecotoxicidade da água poluída também foi reduzida com a aplicação da lectina (FREITAS *et al.*, 2016b).

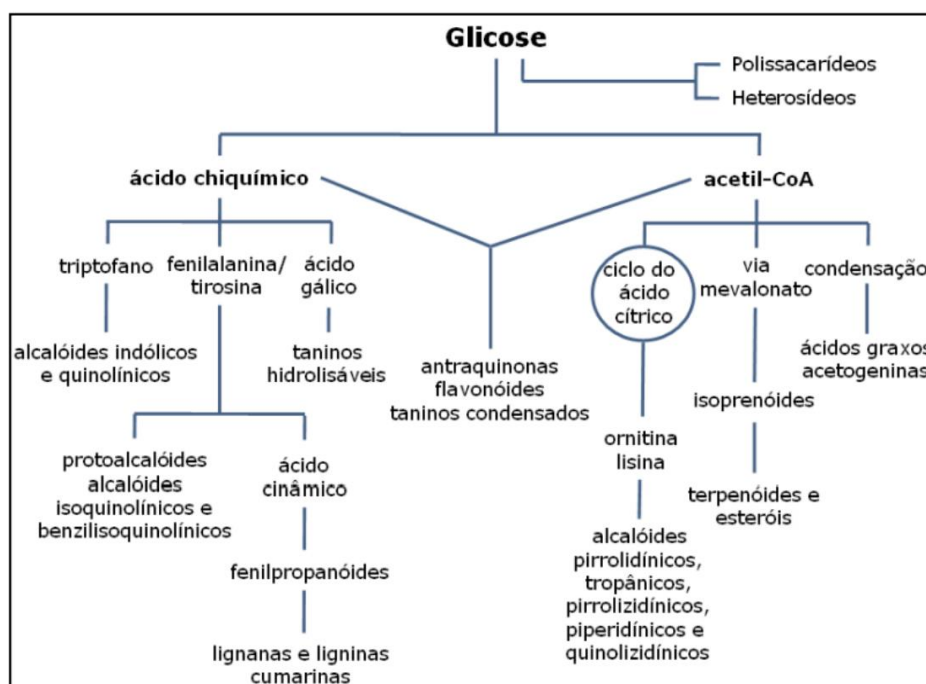
2.2.2 Metabólitos Secundários

Através de variadas rotas metabólicas, os metabólitos primários originam diferentes tipos de metabólitos secundários, com enorme variação estrutural e inúmeras atividades biológicas (SANDES; DI BLASI, 2000, O'CONNOR, 2015). Os metabólitos secundários são moléculas especializadas, derivadas de vias específicas e encontradas em uma faixa limitada de organismos, que não apresentam caráter essencial na manutenção vital do organismo produtor, porém proporcionam vantagens evolutivas (JENKE-

KODAMA; MULLER; DITTMANN, 2008; METLEN; ASCHEHOUG; CALLAWAY, 2009; O'CONNOR, 2015).

Os metabólitos podem ser divididos em três grupos com composição química diferentes entre si, que são os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os compostos fenólicos apresentam um hidrocarboneto aromático associado com uma hidroxila (grupo fenol) em sua estrutura. Apresentam estruturas bem diferenciadas, podendo ser solúveis em água ou solventes orgânicos. São sintetizados por várias vias, sendo as duas mais comuns a do ácido chiquímico (responsável pela maior parte da síntese de fenóis) e a via do acetato (Figura 7). Apresentam várias funções nos vegetais, servindo como substâncias de defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atraindo polinizadores e dispersores de frutas, absorvendo radiação ultravioleta e limitando de crescimento de outros vegetais. Os derivados de ácido benzoico, ácido cafeico, cumarinas, ligninas, flavonoides, antocianinas e taninos têm origem dos compostos fenólicos em diversas vias biossintéticas (Figura 7) (CROTEAU, 2000; DEWICK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 7 – Rota biossintética para diversos tipos de metabólitos secundários utilizando a glicose como precursor.

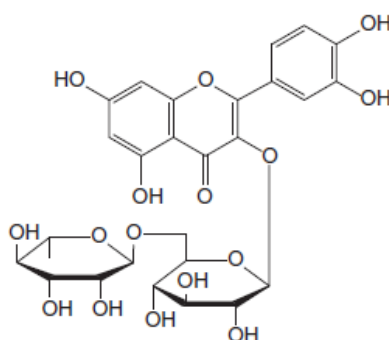


Fonte: SANTOS, 2004.

2.2.2.1 Rutina

Trata-se de um flavonoide glicosídico composto por quercetina e o dissacarídeo rutinose (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona-3-rutinosídeo) conhecido como vitamina P, quercetina-3-rutinosídeo e soforina (Figura 8). É descrito em mais de 70 espécies de vegetais e pode ser encontrado na casca da fruta, folhas, flores e raízes. A concentração de rutina é variável entre as espécies e partes específicas dos tecidos vegetais, bem como pela origem geográfica. Apresenta como principal desvantagem sua baixa biodisponibilidade, que pode ser atribuída a sua reduzida solubilidade aquosa e sua pouca estabilidade (SHARMA *et al.*, 2013). Estes fatores limitam os seus efeitos biológicos *in vivo*, bem como sua incorporação em alimentos funcionais e suplementos (HERNANDEZ-HERRERO; FRUTOS, 2015). Entretanto, a rutina tem papel importante no tratamento clínico de distúrbios vasculares (ex: veias varicosas, hemorragias internas e hemorroidas) e neurodegenerativos, câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia. Ademais, ela também possui propriedades quelantes, antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e antialérgicas (LA CASA *et al.*, 2000; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; JAVED *et al.*, 2012; LEE; JEUNE, 2013; KIM *et al.*, 2015). Suas doses variam entre 500 mg a 2000 mg por dia e podem ser administradas por via oral pelo período de até 6 meses (SHARMA *et al.*, 2013; INCANDELA *et al.*, 2002; LEE; KANG, CHO, 2007).

Figura 8 – Estrutura química da rutina.

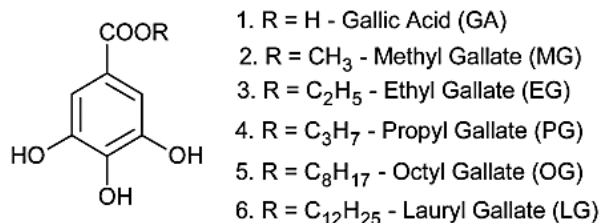


Fonte: SHARMA *et al.*, 2013.

2.2.2.2 Ácido gálico

Identificado por Carl Wilhelm Scheele em 1786 (FISCHER, 1914), o ácido gálico ou galato (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) é um metabólito secundário presente na maioria das plantas. Trata-se de uma molécula plana, com três grupos hidroxílicos fenólicos ligados ao anel aromático e um grupo carboxílico. Dependendo da orientação da ligação do grupo carboxílico e dos grupos hidroxila, o ácido gálico pode ter várias conformações (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015). Há duas possíveis principais vias para a síntese deste polifenol: a partir da fenilalanina e a partir do intermediário do chiquimato, o 3-dehidrochiquimato. O ácido gálico é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e é de grande importância para a formação da galatotanina, um tanino hidrolisável, bem como agente quelante de metais como o ferro. Possui atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e anticancerígena. Além disso, alguns derivados n-alquil ésteres (galato de propilo, galato de octilo e laurel galato) são utilizados na indústria de cosméticos e alimentícia (Figura 9) (KUBO *et al.*, 2001; KUBO *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007; CHIA *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2012; BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

Figura 9 – Estrutura química do ácido gálico e alguns dos seus derivados n-alquil-ésteres.



Fonte: BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015.

2.3 PARASITOSES HUMANAS

2.3.1 *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) pertence ao Filo Platyhelminthes, classe Trematoda, ordem Strigeiforme, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma* (NEVES *et al.*, 2005). Estes helmintos da espécie *mansoni* são predominantes nas Américas do Sul e Central e na África e constituem os principais agentes etiológicos de um tipo de esquistossomose em humanos – a mansônica. Porém, outras quatro espécies podem ocasionar a doença como *S. guineensis*, *S. japonicum* (Indonésia, China e Filipinas), *S. intercalatum* (África) e *S. mekongi* (GRYSEELS *et al.*, 2006; MACCONNACHIE, 2012; BRASIL, 2014). Os representantes do gênero *Schistosoma* possuem variados tipos de classificação: de acordo com a distribuição geográfica; morfologia do verme; morfologia do ovo; evolução dos estágios do ciclo biológico; espécie dos hospedeiros intermediários (moluscos); análise do material genético (DNA) e padrões enzimáticos (isoenzimas) (DESPRÈS; IMBERT-ESTABLET; MONNEROT, 1993).

No Brasil, a esquistossomose mansônica tem como principais sinonímias xistossomose, doença dos caramujos e barriga d'água. De ocorrência tropical, esta esquistossomíase constitui um grave problema de saúde pública mundial (KING *et al.*, 2005), uma vez que já foi registrada em 78 países e considerada endêmica em 54 deles. Ademais, a esquistossomose ocupa o segundo lugar, após a malária, em relação às doenças infecto parasitárias que mais afetam o homem (BRASIL, 2014).

Em relação a sua epidemiologia, na América do Sul a esquistossomose mansônica é prevalente no Caribe, na Venezuela e no Brasil. Neste último, de acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2018) entre 2008 e 2016 foram registrados aproximadamente 4.473 óbitos pela doença no país. A esquistossomose mansônica é endêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe. E ainda apresenta focos de transmissão no Pará, Ceará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2019).

O nordeste brasileiro é considerado a região mais adequada no país para a proliferação do *S. mansoni*. As condições ambientais, sócio-econômicas e culturais dessa macrorregião justificam os altos índices da doença em relação ao Sudeste do país com

74,7% e 24,8%, respectivamente (BRASIL, 2018). Em Pernambuco, o *S. mansoni* está presente em 80% do litoral, sendo responsável pelos 7.024 casos de esquistossomose registrados no estado no ano de 2015 (DATASUS, 2016).

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* é heteroxênico, envolvendo a passagem por dois hospedeiros: um intermediário (reprodução assexuada) e outro definitivo (reprodução sexuada), bem como formas intermediárias de vida livre (MORGAN *et al.*, 2001). Os hospedeiros intermediários são gastrópodes pulmonados de água doce, hermafroditas, do gênero *Biomphalaria* da família Planorbidae. Estes moluscos possuem uma concha em espiral plana e habitam coleções hídricas com pouca correnteza, alimentando-se da vegetação aquática. Entre as várias espécies, três possuem importância epidemiológica por serem vetores naturais do *S. mansoni*, são elas: *B. glabrata* (SAY, 1818), *B. tenagophila*, *B. straminea* (D'ORBIGNY, 1835). Dentre as 27 unidades federativas brasileiras, em 16 o vetor prevalente é o *B. glabrata* (MORGAN *et al.*, 2001; PARAENSE, 2001).

No homem - principal hospedeiro definitivo - os vermes adultos do *S. mansoni*, habitam o sistema porta hepático onde se emparelham, copulam e migram para o plexo mesentérico inferior, culminando com a postura dos ovos que pode chegar a 300 unidades por dia. A inflamação oriunda do aumento da densidade dos ovos pode levar a ruptura da parede das vênulas, liberando-os. Cerca da metade a um terço desses ovos avançam em direção a luz intestinal e chegam ao meio externo através das fezes, enquanto os demais são levados pela corrente sanguínea para o fígado, baço, pulmões, pâncreas e bexiga, iniciando assim o processo granulomatoso nesses órgãos (BOISSIER; MORAND; MONE, 1999; KUNZ, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2011).

O ovo (Figura 10A) apresenta cinco estágios de maturação, que duram até 6 dias para chegar ao estágio maduro embrionado com o miracídio (Figura 10B) e eclodirem. Os ovos maduros do *S. mansoni* possuem uma dimensão de 150 µm de comprimento por 60 µm de largura, de formato oval e contém na região mais larga um espinho lateral (esporão) voltado para trás. A eclosão dos ovos maduros, produzidos pelos vermes adultos de *S. mansoni* liberam os miracídios, larvas ciliadas de vida livre. Estas são de forma cilíndrica com uma proporção de 160-180 µm de comprimento e 64 µm de largura (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Entretanto, o miracídio presente no ovo maduro perece nos tecidos do hospedeiro caso não seja exteriorizado por via fecal em um intervalo de 20 dias. Além disso, a eliminação dos ovos do *S. mansoni* pelas fezes do hospedeiro definitivo pode ter uma duração de 6 a 10 anos. Os ovos também são capazes

de sobreviver por um período de 4 a 5 dias nas fezes e até 2 dias expostos ao sol (SOUZA *et al.*, 1995). Desta forma, para a eclosão dos ovos é necessária uma fonte hídrica, pois a água penetra e rompe a casca do ovo, permitindo a liberação do miracídio. Os cílios auxiliam na movimentação ativa dos mesmos dentro da água, permitindo assim, que se desloquem à procura do hospedeiro intermediário (NEVES *et al.*, 2005; BRASIL, 2014).

A busca pelo hospedeiro é auxiliada por um sistema composto por quimiorreceptores localizados em suas fibras nervosas que apresentam a capacidade de reconhecer algumas substâncias produzidas pelo caramujo, como por exemplo, o muco. Seu período de vida é de cerca de 24 horas na água, caso haja condições térmicas adequadas. A larva ainda possui uma glândula cefálica responsável por produzir substâncias histolíticas que permitem a penetração no molusco hospedeiro (HAAS, 1995; NEVES *et al.*, 2005; BRASIL, 2014; SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

Os miracídeos quando internalizados, são submetidos a diferentes condições fisiológicas de temperatura, pH, osmolaridade, teor de oxigênio entre outros, que induzem mudanças em sua estrutura resultando na transformação em esporocisto primário (ES1) (YOSHINO; BOYLE; HUMPHRIES, 2001; SILVA; NEVES; GOMES, 2008). O estágio de ES1 dura em torno de duas semanas e dentro deles várias células germinativas se multiplicam num processo de poliembrionia por brotamento da parede interna da membrana celular. A formação do esporocisto secundário (ES2), resultante das células germinativas dos ES1, ocorre por volta do 14º dia após a entrada do miracídio. Os ES2 migram da região próxima à entrada do miracídio, onde se desenvolveram, até as glândulas digestivas, ricas em nutrientes, onde passarão por intenso processo de alteração anatômica de suas células germinativas. O desenvolvimento das células germinativas do ES2 origina numerosas cercárias, que são liberadas na água pelos caramujos após 3 a 4 semanas da infecção. Estes hospedeiros invertebrados eliminam as cercárias durante um ano, período que corresponde a toda sua vida (SOUZA *et al.*, 1995, BRASIL, 2014).

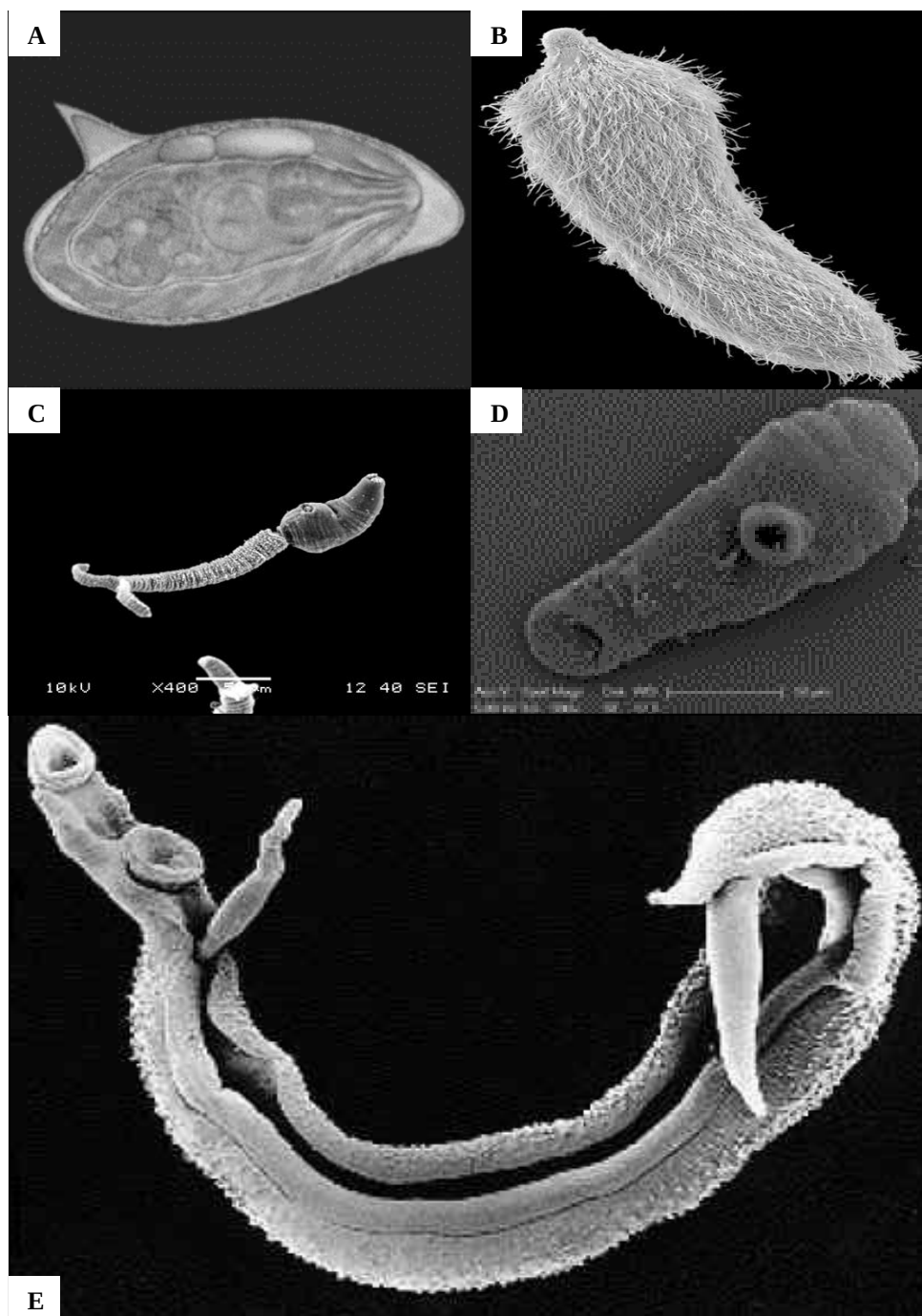
As cercárias (Figura 10C), medem aproximadamente 500 µm de comprimento, possuem um corpo alongado e cilíndrico e uma cauda curta e bifurcada, que constitui um órgão locomotor temporário e essencial para seu deslocamento no ambiente. No homem, a infecção ocorre através do contato com águas (riachos, lagoas, córregos) que apresentem os moluscos infectados com estas formas larvais do parasito. Assim, muitos indivíduos acabam contraindo a esquistossomose mansônica devido a viagens ou passeios, para as regiões litorâneas endêmicas (DORSEY *et al.*, 2002). As cercárias nadam ativamente até alcançarem o hospedeiro definitivo por termotaxia. Ao

estabelecerem contato, fixam-se com a ventosa oral e através da ação de proteases e movimentos vibratórios intensos da cauda penetram por via transcutânea em um processo que dura não mais que 15 minutos. No local de entrada pode-se apresentar uma manifestação pruriginosa na pele, conhecida como dermatite cercariana (MCKERROW; SALTER, 2002; CURWEN; WILSON, 2003; WHITFIEL *et al.*, 2003).

Após a internalização, as cercárias perdem a cauda e se transformam nos esquitosômulos (Figura 10D) (STIREWALT, 1974). Os equistossômulos migram através do tecido subcutâneo atingindo a pequena circulação, na qual o fluxo sanguíneo venoso os leva para os pulmões. Essa migração ocorre por volta de quatro a cinco dias após a infecção. Ao atingirem o pulmão, permanecem de dois a três dias, e posteriormente, através da rede vascular pulmonar se deslocam e instalam-se nos vasos intra-hepáticos, onde os equistossômulos iniciam a organogênese e se transformam em vermes adultos, completando o ciclo do parasita (Figura 11) (LOVERDE; CHEN, 1991; NEVES *et al.*, 2005; SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

Os vermes adultos possuem o corpo achatado dorsoventralmente, com simetria bilateral, não segmentados, providos de ventosas, uma oral na extremidade anterior e uma ventral, denominada acetábulo. São organismos parasitas que apresentam dimorfismo sexual na fase adulta. Os vermes machos, de cor branca, medem entre 0,6 e 1,2 cm, possuem uma estrutura corporal mais larga com uma acentuada curvatura ventral e abaixo do acetábulo há um sulco longitudinal, o canal ginecóforo, que tem por finalidade alojar a fêmea durante a cópula (Figura 10E). As fêmeas, de cor castanho-escuro, são mais cilíndricas, longas e delgadas em comparação aos machos, medindo entre 1,2 e 1,6 cm (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008; HAN *et al.*, 2009). Uma camada sincicial, o tegumento heptalaminar, envolve a superfície externa dos vermes. O tegumento do macho é repleto de tubérculos (pequenas projeções) enquanto o da fêmea é liso (NEVES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2000; REY, 2011). Simpson e colaboradores (1983) conseguiram identificar na superfície dos vermes adultos a presença de diferentes carboidratos complexos de superfície. Carboidratos como glicose/manose; N-acetil-D-glicosamina; galactose; e o ácido siálico. Os carboidratos foram identificados a partir de lectinas marcadas com iodo radioativo (I^{125}).

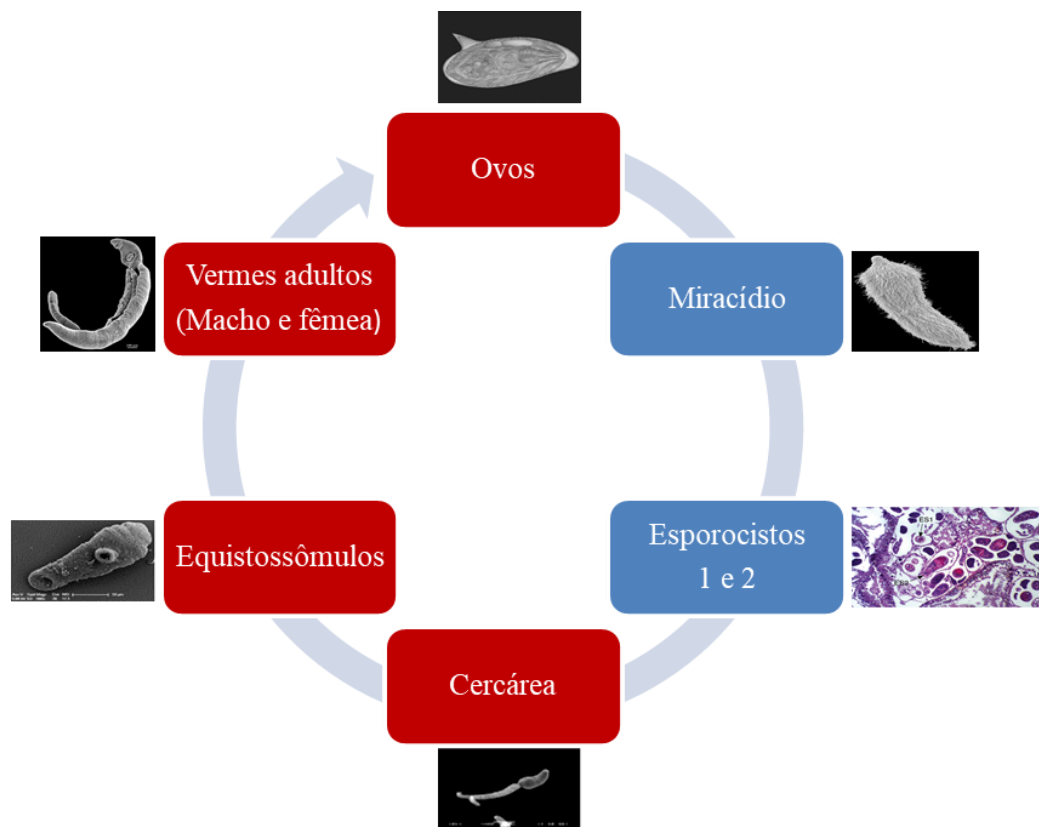
Figura 10 – Micrografia Eletrônica de Varredura de diferentes estágios do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



(A) representa o ovo; (B) o miracídeo; (C) a cercária; (D) o esquistossômulo; (E) casal parasitário.

Fonte: Science Photo Library, acesso em 01 jul. 2019 (A); <http://collinslab.org/> acesso em 01 jul. 2019 (B); PEREIRA *et al.*, 2013 (C); www.aber.ac.uk, acesso em 01 jul. 2019 (D); <https://www.nhm.ac.uk/discover/news/2016/february/slave-trade-brought-deadly-parasite-to-caribbean.html>, acesso em 01 jul. 2019 (E).

Figura 11 – Esquema do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Neves, 2016.

Clinicamente a esquistossomose é classificada em aguda e crônica. Os sintomas vão diferir em decorrência da quantidade, localização e resposta imunológica do organismo aos ovos do parasita. Durante a fase aguda muitos indivíduos são assintomáticos. Entretanto aproximadamente após cinco semanas, período que coincide com o início da eliminação dos ovos nas fezes, os sujeitos podem apresentar febre, cefaleia, apatia, dores abdominais, diarreia, tosse seca e eosinofilia. Após seis meses, há risco do quadro clínico evoluir para a fase crônica, podendo surgir sinais severos de progressão da doença para diferentes órgãos, causando hipertensão pulmonar e portal, ascite, hepatoesplenomegalia, fibrose hepática, hemorragias digestivas e neuroesquistossomose, com a presença de ovos no sistema nervoso central (PITELLA, 1997; BRASIL, 2019).

Em relação ao tratamento, o único fármaco preconizado e disponibilizado gratuitamente pelo Ministério da Saúde para todas as formas clínicas da esquistossomose, é o praziquantel ($C_{19}H_{24}N_2O_2$). Este tem como forma de apresentação comprimidos de 600mg, é administrado em dose única, por via oral (40 a 60mg/kg) e age principalmente

sobre a contração muscular e o tegumento do parasita (DOENHOFF; KIMANI; CIOLI, 2000; BRASIL, 2019). Sua ação resulta provavelmente em sua capacidade de inibir a bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+) dos vermes, aumentando a permeabilidade celular a íons mono e bivalentes, destacando o cálcio (Ca^{2+}) que promove intensas contrações nos esquistossomos com posterior paralisia espástica. Após a atuação do fármaco o helminto é desprendido do endotélio vascular, com posterior deslocamento através das veias mesentéricas para os domínios hepáticos sofrendo ação do sistema imunológico, enquanto os parasitas localizados nas regiões intestinais são expelidos (NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999; GASPARINI; PORTELLA, 2004; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

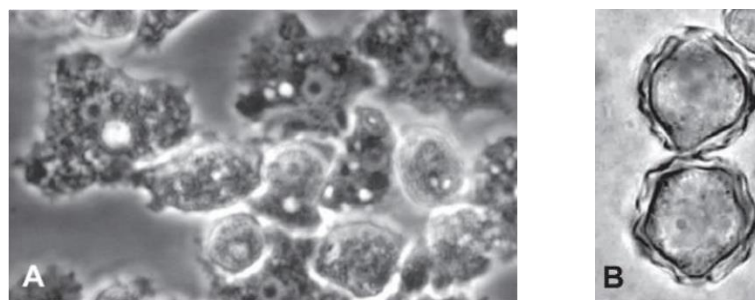
O índice de cura em adultos é de aproximadamente 80%, apresentando leves e transitórios efeitos colaterais como: diarreia, dor abdominal, náuseas e tonturas. Não há evidências de hepatotoxicidade grave associada ao praziquantel, entretanto ele não atua nas formas jovens dos parasitas e ainda há relatos de resistência ao medicamento (DOENHOFF *et al.*, 2002; FENWICH; WEBSTER, 2006; BRASIL, 2019).

2.3.2 *Acanthamoeba castellanii*

As amebas de vida livre (AVL) são organismos cosmopolitas que pertencem ao grupo dos protozoários. São encontrados em ambientes naturais, como fontes hídricas, solo ou no ar, além de ambientes antrópicos como ar condicionado e esgotos. Dentre seus hábitos de vida livre, pode-se relatar seu papel na decomposição de matéria orgânica, além da participação na cadeia biológica, alimentando-se de bactérias, fungos e algas, fagocitando-os e digerindo através do fagolisossomos. Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* é o mais comumente encontrado na natureza, tolerante a várias condições de temperatura, salinidade, osmolaridade e pH (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; GREUB; RAOULT, 2004; NEVES, 2009).

O ciclo de vida do gênero *Acanthamoeba* pode ser dividido em duas formas evolutivas: a forma trofozoítica e a forma cística (Figura 12 A e B).

Figura 12 – Microscopia por Contraste de Fases de Amebas da Espécie *Acanthamoeba castellanii*.



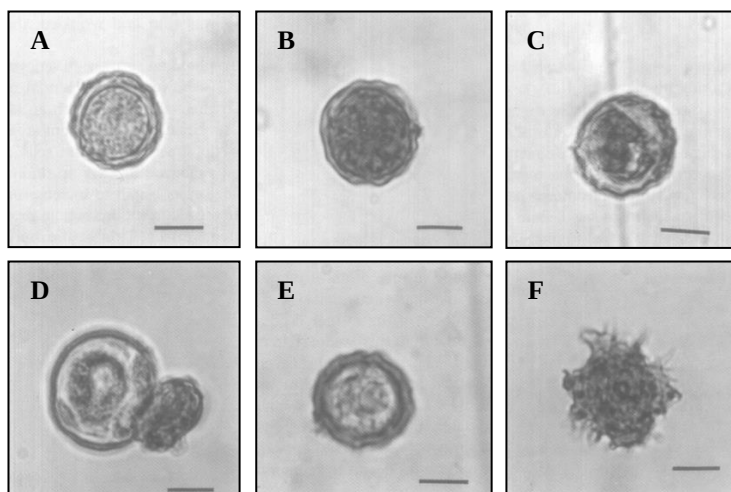
(A) representa a forma trofozoítica de *A. castellanii*; (B) representa a forma cística com formato poligonal.
Fonte: VISVESVARA, 2013.

Os trofozoítos apresentam uma estrutura celular em torno de 15 a 40 μm , com um único núcleo e região citoplasmática periférica, uma zona hialina que permite a formação de projeções denominadas de acantopódios ou filopódios. Estes são responsáveis pela adesão a superfícies biológicas ou inertes, alimentação celular e movimentação da ameba de forma vagarosa. O trofozoíto representa a forma infectante e invasiva da *Acanthamoeba*, se alimentam de bactérias, algas, fungos e matéria orgânica e sua replicação é por fissão binária (KHAN, 2006). Os cistos medem em torno de 15 a 20 μm e representam a forma de resistência destas amebas. Em relação a sua morfologia, podem ser estrelados, poligonais, triangulares, ovais ou arredondados (PUSSARD; PONS, 1977). Formadas por uma parede de dupla membrana, denominados de endocisto e ectocisto. Os endocistos podem apresentar uma forma triangular, poligonal ou apresentar aspecto rugoso. Os cistos ainda apresentam uma região opercular, local este onde ocorrerá o desencistamento (CARLESSO *et al.*, 2007; CIMERMAN, 2008).

Em condições favoráveis como em ambientes a 30 °C, abundância de alimentos, pH neutro e osmolaridade em torno de 60 a 80 mOsm, a forma trofozoítica é mantida, porém condições extremas de pH, temperatura, osmolaridade e a presença de agentes antimicrobianos podem induzir a transformação da forma trofozoítica para a forma cística. Quando os cistos se formam, sua taxa metabólica permanece inativa, ou permanece num padrão de baixa atividade. As formas císticas apresentam resistência contra vários tipos de biocidas, cloração, antibióticos, metais pesados, baixas temperaturas entre 0 a 2 °C, radiação ultravioleta até intensidade de 800 mJ/cm^2 e raios γ até 250 rads, além de resistirem à dessecação por um período longo superando 20 anos. O processo de excistamento ocorre quando as condições voltam a ser favoráveis, demandando processos ativos de síntese metabólica, tanto quanto o processo de encistamento. Os

diferentes estágios de excistamento são mostrados na Figura 13 (KHAN, 2006; SRIRAM *et al.*, 2008; YERA; CORNET; BOURGES, 2013).

Figura 13 – Diferentes estágios de excistamento de *Acanthamoeba castellanii*.



Amebas em meio PGY com temperatura de 30 °C (magnificação x 1250 com barra de 10 µm). (A) cisto maduro; (B) cisto ativado; (C) cisto na fase pré-emergente; (D) cisto na fase emergente; (E) cisto vazio; (F) trofozoíto.

Fonte: Modificado de KHUNKITTI, 1998.

O gênero *Acanthamoeba*, baseadas na sequência do rRNA, é dividido em 18 genótipos diferentes (T1-T18). Dentre elas, o genótipo T4 se destaca, pois é encontrada em até 80% dos casos de ceratite e a principal causadora da EAG e infecções cutâneas (KHAN, 2015). Ao se analisar a superfície de *A. castellanii* deste mesmo genótipo (T4) foi constatado que a representatividade de monossacarídeo era predominantemente de glicose (98,1%), seguido pela ribose (0,8%), manose (0,5%), galactose (0,4%) e xilose (0,2%) não sendo detectado a Arabinose, ramnose, fucose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, N-acetilgalactosamina e N-acetilglicosamina (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009). Outro estudo realizado por Bose e colaboradores (1989) relata que as *A. castellanii* interage muito fortemente com variadas lectinas (conjugadas com FITC), como a concavalina A (Con A), aglutinina de amendoim (PNA), fito-hemaglutinina-P (PHA-P), aglutinina de *Ricinus* (RCA-120), *Ulex* lectina I (UEA I) e fortemente com a aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA). Não interagindo com aglutinina de soja (SBA) e aglutinina do trigo (WGA). No hospedeiro, *Acanthamoeba* interage com vários componentes da matriz celular, incluindo fibronectinas, lamininas e colágenos do tipo I e IV. Proteínas de ligação a manose presentes na superfície de trofozoítos de

Acanthamoeba apresenta papel fundamental na ligação com células hospedeiras (KHAN, 2015), além dos carboidratos D-manose e a D-manopiranosídeo promover a redução de ligação com superfícies inertes, evidenciando a associação das proteínas de ligação a manose com o processo de aderência (IMBERT-BOUYER *et al.*, 2004).

Dentre as espécies de *Acanthamoeba* patológicas ao homem, pode-se evidenciar as espécies *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astroonyxix*, *A. divionensis* e *A. polyphaga*. Essas amebas anfizóicas são oportunistas e acometem principalmente hospedeiros suscetíveis como: diabéticos descompensados, indivíduos com HIV/AIDS e pacientes transplantados, podendo acarretar a encefalite amebiana granulomatosa, infecções pulmonares e cutâneas e a ceratite (CIMERMAN, 2008; NEVES, 2009; ARANCE-GIL *et al.*, 2013).

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção rara, de início lento que acomete o Sistema Nervoso Central, caracterizada por cefaleia, rigidez nuchal, distúrbios visuais, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, ataxia cerebelar, hemiparesia, convulsões e coma. A transmissão ocorre através da inalação das amebas ou lesões na pele, o que faz com que o protozoário alcance a via hematogênica e atravesse a barreira hematoencefálica (BLOCH; SCHUSTER, 2005; TRABELSI *et al.*, 2012; QVARNSTROM; NERAD; VISVESVARA, 2013).

Para o tratamento da EAG, pode-se utilizar uma combinação de fármacos incluindo o cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol ou rifampicina. Esta combinação pode ser eficaz no tratamento da infecção no Sistema Nervoso Central (SNC), entretanto gera graves efeitos colaterais. Há poucos resultados bem sucedidos do tratamento e muitas vezes é difícil diagnosticar a doença só sendo identificado EAG em exames post-mortem. Outros fatores que influenciam no tratamento também é a baixa sensibilidade das *acanthamoebas* a muito desses agentes anti-amebianos ou a incapacidade desses compostos passarem com eficiência a barreira hematoencefálica do SNC. Então há uma necessidade de melhorar o prognóstico da EAG, além da necessidade urgente de identificar novos medicamentos capazes de eliminar espécies de *Acanthamoeba* patológicas (KHAN, 2015).

A ceratite amebiana é uma condição comum aos usuários de lentes de contato colonizadas por biofilmes ou microlesões oculares. Os principais sinais e sintomas são: sensação de corpo estranho no olho, dor ocular intensa; hiperemia conjuntival; opacidade da córnea, visão turva e fotofobia. Em casos mais graves, pode haver ulcerações na córnea com comprometimento permanente da visão. Os tratamentos utilizados para as

acantamebíases são baseados no uso combinado de antimicrobianos, que possuem na maioria das vezes ação apenas sobre os trofozoítos, sendo pouco efetivos sobre os cistos, culminando na recidiva de infecções (PANJWANI, 2010; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Segundo Alvarenga e colaboradores (2000) no tratamento inicial da ceratite, pode-se utilizar a diamida aromático isocianato de propamidina 0,1% associado com um desinfetante catiônico polihexametilbiguanida (PHMB) 0,02% a cada 30 min nas primeiras 12 h e depois a cada hora por pelo menos 3 dias. Esta combinação de fármacos se mostrou menos tóxica e com bons índices de recuperação, além de demonstrar ação cisticida e efeito sobre diferentes tipos de cepas. Há também a possibilidade de associar o isocianato de propamidina 0,1% com a neomicina 1%, entretanto esse último fármaco deve ser utilizado a cada 3 horas apenas no período inicial, pois apresenta ação tóxica sobre a córnea. Outros medicamentos alternativos desses fármacos podem ser utilizados no tratamento, como os antifúngicos tópicos miconazol 1% e clotrimazol 1-2% e sistêmico cetoconazol e itraconazol efetivos como adjuvantes. Hexamidina tem evidenciado uma maior ação cisticida que o isocianato de propamidina e a clorexidina pode substituir PHMB caso a resposta inicial da terapia, não surta o efeito desejado.

2.4 MICRORGANISMOS

Os microrganismos, como próprio nome sugere, representam organismos que apresentam dimensões reduzidas, invisíveis a olho nu. São organismos unicelulares que fazem parte de diferentes domínios e reinos dos seres vivos, englobando quatro grupos gerais: as bactérias, os fungos, os vírus e os protozoários, cada um com características diferentes e variados níveis de complexidade (BROOKS *et al.*, 2014).

As bactérias representam organismos que pertencem ao grupo dos procariotos e ao Domínio Bacteria. O Domínio Bacteria por sua vez é dividido em 23 filos com variados números de classes, ordens, famílias e gêneros. Formam um grupo com ampla variedade de espécies, estruturas fisiológicas e diversificada gama de habitats, o que permite que participem de quase todas as atividades do planeta Terra (MACZULAK, 2011; TORTORA, 2012). Elas podem viver individualmente na natureza ou formar colônias. Sua forma é variável apresentando principalmente a forma de cocos, bacilos ou filamentosa, apresentando arranjos variáveis dependendo do plano de divisão celular. Dentre as estruturas celulares bacterianas, a parede celular tem grande importância na classificação das espécies. De acordo com a parede celular podem ser classificadas em

gram-positiva (+) e gram-negativa (-). As gram-positivas apresentam uma parede celular constituída de polissacarídeos, ácido teicoico e várias camadas de peptideoglicano, já as gram-negativas apresentam uma membrana externa, após poucas camadas de peptidioglicano, formada por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos (BROOKS, 2007; TORTORA, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2014).

Os fungos são organismos com estruturas mais complexas que os das bactérias, pertencendo ao Domínio Eukarya e ao Reino Fungi, apresentando um núcleo bem definido, e a presença de organelas membranosas como mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Os fungos podem atuar como agentes decompositores, na produção de alimentos, metabólitos, enzimas e fármacos, na agricultura ou como agentes alergênicos e infecciosos nos seres humanos (TORTORA, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2014).

Eles apresentam dois tipos morfológicos básicos: a forma de levedura geralmente com formato oval ou esférico e a forma de hifa apresentando células alongadas e ramificadas. Há o caso de fungos leveduriformes, como a do gênero *Candida*, que podem desenvolver pseudo-hifas, que representam uma série de leveduras alongadas, unidas entre si, que após a divisão por brotamento não se separam. O conjunto emaranhado de hifas é denominado de micélios que podem ser do tipo vegetativo responsável pela fase de crescimento e nutrição fúngica e os micélios do tipo reprodutivo é responsável pela fase reprodutiva. O ciclo reprodutivo dos fungos geralmente envolve a presença de esporos sexuais e/ou assexuais nos fungos filamentosos e brotamento e fissão binária nos fungos leveduriformes. Os fungos podem apresentar espécies unicelulares, pluricelulares, ou mesmo dimórficos podendo assumir ambas as morfologias (BROOKS *et al.*, 2014; MADIGAN *et al.*, 2016).

A parede celular encontrada nos fungos é constituída principalmente por polímeros de N-acetilglicosamina (quitina), podendo apresentar outros polissacarídeos como mananas, galactomanas, glucanas, celulose que podem substituir ou complementar a parede quitinosa dos fungos (FUKUDA *et al.*, 2009).

Os microrganismos são encontrados em várias partes do corpo dos seres humanos, como a pele, mucosas, trato gastrointestinal. A maioria delas é inofensiva ao homem, trazendo inúmeros benefícios ao seu hospedeiro, protegendo-o contra espécies patogênicas e doenças (SANTOS, 2004). Embora predomine espécies inofensivas ao homem, algumas delas promovem infecções graves. A seriedade da infecção dependerá de variáveis fatores como a espécie ou cepa responsável pela infecção, em que região

corporal ocorreu a infecção e o estado da imunidade do hospedeiro. Quando esses microorganismos apresentam capacidade de invadir indivíduos sadios, superando o sistema imunológico de defesa, são denominados patógenos verdadeiros. Já quando bactérias normalmente encontradas no hospedeiro provocam danos à saúde do indivíduo, são denominados de patógenos oportunistas, cuja invasão resulta do comprometimento do sistema imunológico local ou sistêmico (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; GOMES *et al.*, 2014).

Para lidar com essas bactérias que promovem danos ao nosso corpo, utiliza-se um conjunto de fármacos denominados de antibióticos. Os antibióticos, em sentido amplo, são compostos naturais, sintéticos e semissintéticos capazes de interferir no crescimento ou na sobrevivência de bactérias e outros microrganismos. São denominados de bactericidas os antibióticos que promovem a morte celular bacteriana e de bacteriostáticos quando promovem a inibição do crescimento. Os principais mecanismos de ação das drogas antimicrobianas envolvem a inibição da parede celular, da síntese proteica, da síntese de metabólitos, da replicação dos ácidos nucleicos e do processo de transcrição, além de danos à membrana plasmática celular (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; TORTORA, 2012).

Utilizam-se os antibióticos nos tratamentos de infecções, quando o sistema imunológico do hospedeiro não apresenta êxito no combate ao quadro infeccioso. Contudo, o uso inadequado pode resultar no estabelecimento de cepas resistentes (KOH *et al.*, 2009). Algumas bactérias podem apresentar genes, que quando expressos, resultam em mecanismos bioquímicos que conseguem suplantar os efeitos dos antibióticos, evitando assim, a morte celular (RAMOS *et al.*, 2014).

2.4.1 Bactérias patogênicas

As Bactérias patogênicas apresentam a capacidade de promover doenças em hospedeiros vulneráveis. A patogênese microbiana principia após contato entre microrganismo/hospedeiro, com posterior aderência, invasão e desenvolvimento da infecção, podendo ocasionar, se bem sucedida, danos teciduais e estabelecer o quadro clínico da doença (MADIGAN *et al.*, 2016). Dentre as bactérias gram-negativas patogênicas, pode-se exemplificar *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, já entre as gram-positivas *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*.

Klebsiella pneumoniae é geralmente encontrada no solo e na água. É uma bactéria do tipo bastonete, apresentando seu corpo em forma de bastão. Apresenta uma cápsula de polissacarídeo em torno de sua estrutura celular, que a auxilia a impedir a fagocitose pelo sistema de defesa do hospedeiro, além de permitir a sua aderência ao trato respiratório, facilitando assim, a colonização. É anaeróbia facultativa e normalmente coloniza a flora gastrointestinal dos seres humanos e de outros animais. Porém, pode causar doenças respiratórias e urinárias, sendo comum ocasionar infecções nosocomiais, acometendo principalmente pacientes imunodeprimidos (HANSEN *et al.*, 1998; SCARPATE e COSSATIS, 2009; TORTORA, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria móvel do tipo bastonete. Normalmente se encontram individualizadas, ou em pares e eventualmente podem ser encontradas formando cadeias curtas. Podem produzir pigmentos azulado, esverdeado, avermelhado e preto dependendo das cepas. São aeróbios obrigatórios, sendo necessária e indispensável a presença de oxigênio para o crescimento microbiano. São classificadas como barotolerante conseguindo sobreviver a altas pressões na faixa de 400 a 600 atmosferas e se desenvolvem bem na faixa de temperatura de 37 a 42 °C, sendo a temperatura de crescimento de 42 °C uma característica que a diferencia de outras espécies de *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* apresenta variados fatores de virulência como as fímbrias do tipo IV, exopolissacarídeos, exotoxina A, enzimas extracelulares como elastase, protease, e duas hemolisinas (fosfolipase C e glicolípídeo). São classificadas como patógenos oportunistas promovendo alta incidência de infecção, de morbidade e de mortalidade. Podem ocasionar infecções respiratórias agudas geralmente associada a pacientes mecanicamente ventilados ou imunocomprometidos; infecções crônicas, como os portadores de fibrose cística; além de doenças no trato urinário, nos olhos e na pele (BROOKS, *et al.*, 2007; GOLDMAN; GREEN, 2015).

Salmonella enteritidis é um bacilo anaeróbico facultativo, não produz endósporo nem cápsula polissacarídica. Apresentam motilidade, devido à presença flagelos ao redor do seu corpo celular (peritríqueo) (BERCHIERI JR., 2000). É conhecida no mundo por causar enterocolite tóxica em seres humanos (LAN *et al.*, 2009). Estima-se que haja 80,3 milhões de infecções causados pela salmonela em todo mundo (MAJOWICZ *et al.*, 2010). De 4 a 48 h após a ingestão de alimentos contaminados, inicia-se o quadro de náusea, cefaleia, febre baixa, vômitos e diarreia profusa, com escassa presença de leucócitos nas fezes. O quadro patológico, comumente finda num período de 2 a 3 dias. O quadro de

bacteremia é raro nas infecções ocasionadas pelas salmonelas (2 a 4% das infecções) (BROOKS, *et al.*, 2007).

Micrococcus luteus é uma espécie bacteriana que apresenta formato esférico que não apresenta motilidade. É facilmente encontrado no solo, poeiras, água e ar, além de estarem presentes como parte da flora residente ou transitória da superfície da pele de mamíferos. Embora faça parte da flora microbiana dos seres humanos, pode ocasionar infecções como pneumonia, artrite séptica, meningite e bacteremia. É responsável por infecções nosocomiais, devido à supressão imunológica do paciente enfermo, reforçando outros tipos de infecções como meningite, pneumonia e infecções do trato urinário (PECES *et al.*, 1997; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Staphylococcus aureus é uma bactéria do tipo coco, cujo arranjo celular se assemelha a um cacho de uvas irregulares, dividindo-se em dois planos de divisão celular. São bactérias que não apresentam mobilidade e não formam endósporos. É um organismo halotolerante, podendo se desenvolver em um ambiente com alto teor de cloreto de sódio (até cerca de 3 M). Vivem na maioria das vezes em comensalismo na pele humana, narinas e superfícies mucosas de forma residente ou transitória. Embora possam ser encontrada naturalmente no corpo humano, pode vir a causar variados tipos de enfermidades oportunistas em diferentes partes do corpo, como infecções de tecidos moles, abscessos em tecidos e órgãos, osteomielite, síndrome da pele escaldada, endocardite, impetigo, foliculite intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e pneumonia necrozante. É a espécie responsável pela maior parte das infecções hospitalares adquiridas. Possuem variados tipos de fatores de virulência como as proteínas ancoradas na parede celular (adesinas), hemolisinas, leucocidinas, estafilocinase, enterotoxinas, cápsula polissacarídica, exopolissacarídeos, sistema de transporte de ferro, moduladores das funções imunológica dos hospedeiros, além de genes de resistência a antibióticos (TORTORA, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2014; GOLDMAN; GREEN, 2015).

2.4.2 Bactérias fitopatogênicas

As bactérias fitopatogênicas são responsáveis por significativa perdas econômicas em diferentes culturas de produção. Podem ocasionar nos vegetais, desde danos severos a danos inperceptíveis, dependendo de práticas de cultivo, condições ambientais,

variabilidade patogênica e variedades vegetais utilizadas (ALMEIDA, 2001; GAMA *et al.*, 2016).

O gênero *Pectobacterium* é formado por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, apresentando espécies em forma de bastão, gram-negativas, fermentativas, aeróbicos facultativos, que não formam esporos e apresentam flagelos em torno de toda a célula, reunindo patógenos, saprófitos e endófitos (HOLT *et al.*, 1994; KWON *et al.*, 1997; 2000; TOTH *et al.*, 2001). O gênero inicialmente era descrito como *Erwinia* (PÉROMBELON, 1992). Possui distribuição cosmopolita, ocasionando podridões em uma grande variedade de vegetais (AGRIOS, 1996). Pode ocasionar a podridão-mole no período de crescimento, de colheita, de armazenamento, ao longo do período de transporte e comercialização (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Podem ter disseminação zoocórica, através dos insetos que são atraídos pelo tecido danificado de plantas, facilitando o contato e a entrada da bactéria no tecido vegetal lesionado (GRAHAM *et al.*, 1979). Produzem enzimas que promovem a degradação de substâncias pécnicas como propectina, ácido pécico, ácido pectínico e pectina, que são encontrados na região da lamela média nos vegetais. Pectina liase, pectato liase, pectina metil-esterase, poligalacturonase são as principais enzimas pectinolíticas encontradas nas espécies do gênero *Pectobacterium* (COLLMER; KEEN, 1986; GOTO, 1992; PÉROMBELON, 2002).

2.4.3 Fungos patogênicos

Os fungos patogênicos representam uma pequena parcela dos fungos já descritos que apresenta importância médica. Cerca de 50 espécies ocasionam mais de 90% das infecções fúngicas em seres humanos e em outros animais. Eles podem ser classificados em superficiais, cutâneas, subcutâneas, endêmicas e oportunistas. Dentre as espécies oportunistas destaca-se os fungos do gênero *Candida* (BROOKS *et al.*, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* pertencem à família Cryptococcaceae, da classe Ascomycetes e filo Ascomycota. Possuem formato oval ou arredondado e sua reprodução pode ser por brotamento ou gemulação (GUARRO, 1998). São organismos comensais, encontrados no meio ambiente e presentes na microbiota humana (cavidade bucal, trato gastrointestinal e sistema genitourinário) e animal. Cerca de 20 a 80% da população adulta saudáveis apresentam espécies do gênero *Candida* no trato gastrointestinal e cerca de 20 a 30% das mulheres são colonizadas na região vaginal. Entretanto, em situações

como alterações no mecanismo de defesa, barreiras anatômicas e patologias pode ocorrer um desequilíbrio na relação *Candida*-hospedeiro, propiciando a invasão e a reprodução deste microrganismo. Estes fungos leveduriformes são responsáveis por infecções superficiais e sistêmicas que acometem principalmente pacientes imunodeprimidos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; KO; CASADEVALL; PERFECT, 2015).

Entre as infecções, a mais prevalente é a candidíase, cuja espécie mais frequentemente envolvida é *Candida albicans* (ALANGADEN, 2011). Embora esta apresente-se como o agente etiológico mais comum da candidíase, outras espécies como *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* também constituem importantes patógenos de infecções fúngicas oportunistas (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Devido ao surgimento de cepas de *Candidas* resistentes a drogas antifúngicas como a anfoterinica B e azólicos, dificuldades no diagnóstico e terapêuticas e constituírem um gênero constantemente associados a infecção fúngicas nos seres humanos, torna-se imprescindível a busca por novos compostos com ação fugiostática ou fungicida capazes de neutralizar ou auxiliar nos tratamentos dessas infecções (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; JIN *et al.*, 2016; BERKOW; LOCKHART, 2017).

3 RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de artigos.

3.1 ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DE EXTRATO AQUOSO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA (WSMOL) DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* SOBRE *Acanthamoeba castellanii*

Bernardo do Rego Belmonte^a, Edclécia Nascimento Santos^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Silvio Santana Dolabella^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil.*

*Autor para correspondência: Tel: +558121268540; Fax: +558121268576

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

Algumas espécies de amebas de vida livre, como *Acanthamoeba castellanii*, podem ocasionar enfermidades como encefalite amebiana granulomatosa e ceratite amebiana. Já é relatado o aparecimento de formas resistentes dessa espécie para diferentes biocidas utilizados, principalmente em sua forma cística, sendo necessário a busca por novos compostos bioativos capazes de eliminá-los. Um grupo de proteínas capazes de se ligarem a carboidratos, denominados de lectinas, tem mostrado ação contra variados grupos de microrganismos como protozoários, bactérias e fungos. O presente trabalho analisou efeitos de preparações de sementes *M. oleifera* contendo a lectina WSMoL (extrato aquoso, fração proteica e WSMoL purificada) sobre a viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. As amebas foram incubadas com as amostras por 24 e 48 h e a viabilidade celular foi determinada por coloração com sulforodamina B (SRD B) 1% (p/v). Foi avaliada também a integridade da membrana plasmática e possíveis alterações no tamanho e complexidade celular de trofozoítos de *A. castellanii*. O extrato apresentou IC₅₀ de 2.150 µg/mL para o período de 24 h e 1.520 µg/mL para o período de 48 h. Para a fração, os valores de IC₅₀ foram de 453,72 e 469 µg/mL para 24 h e 48 h, respectivamente. Nas concentrações de 130 e 250 µg/mL, WSMoL, promoveu redução de viabilidade de 35% e 39%, respectivamente. Análises em citômetro de fluxo revelaram que o tratamento com extrato (2000 µg/mL) e fração (469 µg/mL) afetou a integridade da membrana, sendo detectada marcação positiva com iodeto de propídeo para 98,1% e 93,1% dos trofozoítos, respectivamente. Além disso, o extrato promoveu uma redução no tamanho das amebas. Em conclusão, o estudo amplia o potencial de preparações proteicas de sementes de *M. oleifera* ao indicar o potencial amebicida.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; lectina; *Moringa oleifera*; trofozoítos.

1. Introdução

As amebas de vida livre são seres ubíquos presentes em variados ambientes terrestres, aquáticos e aéreos, englobando também objetos e ambientes antrópicos, como equipamentos médicos, ar condicionado, lentes de contato e hospitais (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Algumas cepas de *Acanthamoeba* podem ocasionar a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), uma infecção grave que atinge o sistema nervoso central levando muitas vezes o indivíduo a óbito, e a ceratite amebiana (CA) que atinge a região da córnea e que, se não tratada, pode evoluir para cegueira (CLARKE; NIEDERKORN 2006; KHAN; SIDDIQUI 2009; LORENZO-MORALES et al., 2015; PETRY et al., 2006; SCHEID et al., 2008; VISVESVARA, 2010). Outras enfermidades ocasionadas são lesões cutâneas e sinusite, que acometem pacientes imunodeprimidos (DUNAND et al., 1997; MAY; SIDHU; BUCHNESS, 1992; TORNIO et al., 2000).

O tratamento da EAG apresenta vários fatores limitantes, como o difícil prognóstico devido ao estado assintomático na fase inicial da doença ou a atuação comprometida dos antimicrobianos devido à barreira hematoencefálica. O tratamento da EAG associa diferentes drogas como sulfadiazina, flucitosina, isotionato, pentamidina e fluconazol ou itraconazol. Por outro lado, no tratamento da CA, as amebas apresentam resistência aos fármacos utilizados até o presente momento, podendo ocasionar recidivas nos pacientes infectados, sendo de fundamental importância a busca por novos medicamentos (DART et al., 2009).

Nesse contexto, insere-se *Moringa oleifera* (Moringaceae) uma planta pantropical cujas partes possuem múltiplas aplicações: suas sementes são utilizadas como emoliente de cosméticos, tratamento de água, fertilizante, na dieta animal, além do uso na culinária; os frutos são usados na dieta humana; as flores em cosméticos e dietas medicinais; as folhas em dieta humana e animal, além de aplicações medicinais (SANTOS et al., 2015). Diversas propriedades da planta têm sido investigadas ao longo dos anos, como sua ação antioxidante (CHUMARK et al., 2008), anti-inflamatória (MARRUFO et al., 2013), inseticida (PONTUAL et al., 2012), diurética (CACERES et al., 1991), antidiabética (GUPTA et al., 2012), tripanocida (PONTUAL et al., 2018) e antifúngica (BIJINA, et al., 2011). De suas sementes é extraída uma lectina solúvel em água denominada WSMoL, que apresenta atividades biológicas como ação larvicida, estimulante de oviposição e ovicida contra *Aedes aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012),

antibacteriana (MOURA et al., 2015, 2017) e atividade coagulante e removedora de metais em água (FERREIRA et al., 2011; FREITAS et al., 2016; MOURA et al., 2015).

O objetivo desse trabalho foi analisar a atividade amebicida sobre trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* de preparações proteicas das sementes de *M. oleifera* contendo WSMoL (extrato aquoso, fração proteica e WSMoL isolada).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Um exemplar está depositado sob o número 73.345 também no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As sementes saudáveis e íntegras foram secas a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 48 h, trituradas com um moedor elétrico e armazenadas a -20°C . Os autores possuem autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente para a coleta da planta (número 38690).

2.2. Obtenção do extrato aquoso, fração proteica e lectina WSMoL

As preparações avaliadas foram obtidas conforme descrito por Coelho et al. (2009). O extrato aquoso foi obtido adicionando-se 10 g de pó de sementes de *M. oleifera* em 100 ml de água destilada, seguido de homogeneização com o auxílio de um agitador magnético por 16 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período, o extrato foi coletado após filtração com gaze e centrifugado a 3000 g por 15 min. Para obtenção da fração proteica, o extrato foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio a 60% por 4 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspendido e dialisado contra água destilada e NaCl 0,15 M por 8 h a 4°C . Para isolamento de WSMoL, aplicou-se a fração proteica em uma coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo de 0,3 mL/min); após lavagem com a solução de equilíbrio, a lectina foi eluída com ácido acético 1,0 M e dialisada contra NaCl 0,15 M (6 h a 4°C).

2.3. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi definida através da técnica de Lowry et al. (1951), utilizando-se uma curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 100 µg/mL).

2.4. Atividade hemaglutinante (AH)

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços (TPP-Techno Plastic Produto, Trasadingen, Suíça), incubando-se 50 µL de diferentes diluições das amostras com uma suspensão a 2,5% (v/v) em solução salina (NaCl 0,15 M), de eritrócitos de coelho glutarizados (BING et al., 1967). AH foi estabelecida como o inverso da maior diluição em que foi observada completa aglutinação dos eritrócitos. A atividade hemaglutinante específica (AHE) foi calculada a partir da razão entre AH e a concentração proteica (mg/mL). Realizou-se o teste de inibição da AH, no qual a amostra de WSMoL foi previamente incubada por 45 min com frutose 0,2 M antes de se adicionar a solução de eritrócitos tratados com glutaraldeído. Este método foi aprovado através do Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), utilizado para a coleta dos eritrócitos (processo 23076.033782 / 2015-70).

2.5. Ensaio amebicida

Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* foram adquiridos através de um isolado clínico de ceratite amebiana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Sergipe – UFS e foram cultivados em meio de cultura PYG (2% protease peptona, 0,2% extrato de levedura, e 1,8% de glicose) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. O teste amebicida contra trofozoítos de *A. castellanii* foi realizado na fase logarítmica de crescimento (48-72 h de cultura). Inicialmente foram adicionados em microplacas estéreis de 96 poços (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) 100 µL do extrato aquoso, fração proteica e lectina WSMoL solubilizados em meio PYG, ou apenas 100 µL de meio PYG para o controle negativo. Para o extrato foram utilizadas concentrações de 130, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ou 3000 µg/mL, já para a fração proteica 0-60% e a WSMoL foram utilizadas concentrações de 130, 250, 500, 1000 µg/mL. Após distribuição das amostras, adicionou-se 100 µL da cultura das amebas em meio PYG na ordem de 8×10^4 células/mL. O

experimento foi realizado em dois experimentos independentes e em triplicata para cada concentração. Os períodos de exposição das amebas às amostras foram de 24 e 48 h em testes independentes. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado a técnica de coloração com sulforodamina B (SRD B) segundo Ortega-Rivas et al. (2016). Após a incubação do controle e das amostras testes, foi adicionado a cada poço 50 µL de ácido tricloroacético 50% (p/v) a 4 °C, seguido de incubação por 1 h. Descartou-se o sobrenadante, e a placa foi lavada 3 vezes com água destilada e secou naturalmente em temperatura ambiente. Após a secagem, adicionou-se 25 µL da solução de SRD B 1% (p/v) dissolvida em ácido acético 1% com subsequente incubação por 15min. Em sequência, o excesso de corante foi removido por três processos de lavagens com ácido acético 1% e em seguida a placa foi seca em temperatura ambiente. Acrescentou-se 150 µL de Tris 10 mM pH 10,5, agitando-se a placa levemente por 10 min. Ao final, a absorbância a 562 nm foi mensurada em espectrofotômetro.

2.6. Avaliação da integridade de membrana celular por citometria de fluxo.

Trofozoítos de *A. castellanii* (1×10^5 células/mL na fase de crescimento logarítmico) foram incubados com o extrato aquoso (2000 µg/mL) ou a fração proteica (469 µg/mL) de sementes de *M. oleifera* pelo período de 24 h, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS pH 7,2 e incubadas durante 10 min protegidas da luz com 2 µL de solução de iodeto de propídio (PI) na concentração de 100 µg/mL. Após o tratamento, as células foram mantidas no gelo até a análise no Citômetro Attune® Acoustic Focusing (Life Technology). Trofozoítos tratados por 20 min em banho-maria a 90 °C foram utilizados como controle positivo e não-tratados como controle negativo (BORAZJANI et al., 2000). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região correspondente às células da ameba e analisados pelo programa Attune® Cytometer Software. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas em cada situação testada.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram estabelecidos como média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em dois experimentos independentes. A significância das diferenças foi determinada usando o teste de análise de variância (ANOVA) uma via,

seguido de teste de Tukey independente por grupos. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 5[®]. Os valores IC₅₀ foram calculados com a percentagem de sobrevivência celular para cada concentração nos períodos de 24 e 48h por análise de regressão linear utilizando o GraphPad Prism 5[®] com um limite de confiança de 95%.

3. Resultados e discussão

Este estudo buscou averiguar o efeito do extrato, fração e WSMoL de *M. oleifera* sobre trofozoítos de *A. castellanii* um protozoário de vida livre e potencialmente patogênico. Inicialmente, os trofozoítos de *A. castellanii* foram expostos ao extrato aquoso de *M. oleifera* por um período de 24 h (Figura 1A), onde não foi detectada alteração significativa na viabilidade nos tratamentos com as concentrações de 130, 250 e 500 µg/mL em relação ao controle. Já nas concentrações de 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 µg/mL houve uma redução significativa dose-dependente de 25, 42, 49, 55 e 68%, respectivamente, em relação ao controle. Ademais, para as amebas expostas ao extrato ao longo de 48 h, também foi observado um efeito dose-dependente apresentando uma diminuição significativa entre 31 e 82,6% na viabilidade celular, nas concentrações entre 1000 e 3000 µg/mL, em relação ao controle. O valor da IC₅₀ no período de 24 h foi de 2150 µg/mL e para o período de 48h foi de 1520 µg/mL.

Comparando-se com os dados da literatura, Malatyali e colaboradores (2012) submeteram os trofozoítos de *A. castellanii* ao extrato metanólico de *Satureja cuneifolia* na concentração de 2000 µg/mL, cuja viabilidade média foi de 74% no período de 24 h e 70% em 48h. Estes dados correspondem a uma taxa de 25% e 17% maior de viabilidade celular nos períodos de 24 e 48h quando comparados ao extrato aquoso de *M. oleifera*, indicando que *S. cuneifolia* apresentou um menor efeito sobre a inibição das amebas. Adicionalmente Malatyali e colaboradores (2012) afirmaram que as amebas foram expostas ao extrato de *Melissa officinalis*, na mesma concentração (2000 µg/mL) e apresentaram viabilidade de 90 e 86% nos períodos de 24 e 48 h, respectivamente, representando uma taxa de viabilidade 41 e 33% maior que o extrato de semente de *M. oleifera*.

Outro estudo sobre a viabilidade celular foi conduzido por Tepe e colaboradores (2012) que expuseram por 72h os trofozoítos de *A. castellanii* aos extratos metanólicos de *Teucrium polium* e *T. chamaedrys*, ambos na concentração de 2000 µg/mL, onde foi

encontrado taxas de viabilidade de 86 e 85% após o período de 24h e 48h, respectivamente, para a espécie *T. polium* e taxas de 64 e 62% após 24h e 48h, nesta ordem, para a espécie *T. chamaedrys*. Analisando o estudo com os dados encontrados neste trabalho, as amebas submetidas ao extrato aquoso de *M. oleifera* apresentaram 33 e 34 % a menos de viabilidade celular quando comparadas as amebas expostas ao *T. polium* nos períodos de 24 e 48h, respectivamente, e apenas 15 e 9% a menos na viabilidade de *T. chamaedrys* nos mesmos períodos de tempo (24-48h).

O efeito da fração proteica 0-60%, derivado do extrato aquoso, sobre *A. castellanii* também mostrou ser dose dependente. Em um período de 24 h (Figura 2A) houve uma redução significativa de 23%, 66% e 73% na viabilidade celular nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL em relação ao controle. Já no período de 48h a redução na viabilidade celular foi de 21%, 46% e 86% comparado ao controle nas mesmas concentrações. Na concentração de 130 µg/mL não houve diferença estatística em relação ao controle. O valor da IC₅₀ no período de 24 h foi de 453,72 µg/mL e para o período de 48 h foi de 469 µg/mL. Ao correlacionar-se com o extrato, a fração apresentou uma IC₅₀ 4,7 vezes menor que a do extrato no período de 24 h e 3,24 vezes menor no período de 48 h, indicando que a fração proteica 0-60% apresenta, em maior concentração, possivelmente uma ou mais proteínas bioativas capazes de promover a redução na viabilidade celular de *A. castellanii*.

Em um período de 24 h, nos tratamentos com a lectina WSMoL a 130 e 250 µg/mL, houve uma redução média de 35% e 39%, respectivamente, na viabilidade celular das amebas em relação ao controle. Já nas concentrações maiores que 500 µg/mL houve um aumento da turbidez dos poços, imediatamente após à adição da lectina, impedindo a avaliação da viabilidade. Provavelmente, a lectina interagiu com componentes do meio PYG, gerando uma suspensão particulada que se acumulou no fundo da microplaca. Após um período de 48 h, houve uma redução de 52 e 65% na viabilidade das amebas nos tratamentos com concentrações de 130 e 250 µg/mL da lectina em relação ao controle. Comparando o efeito da lectina e fração sobre viabilidade das amebas, a WSMoL na concentração de 130 e 250 µg/mL apresentou 32% e 40% menor de viabilidade celular, nesta ordem, que a fração protéica no período de 24h e uma redução de 50 e 42% no período de 48 h, mostrando que a lectina, nas concentrações analisadas apresentou um maior efeito sobre os trofozoítos de *A. castellanii*. Após exaustivas buscas literárias não foram encontrados relatos dos efeitos de frações enriquecidas em proteínas e de lectinas

contra espécies do gênero *Acanthamoeba*, o que sugere ser o primeiro trabalho tratadas com lectinas bioativas.

Foi analisada, através da técnica de citometria de fluxo, a integridade da membrana plasmática e possíveis alterações no tamanho e complexidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* expostos por 24 h ao extrato aquoso e fração proteica na IC₅₀. A figura 3A representa o controle negativo, em que foi observada baixíssima (0,067%) marcação com PI indicando membranas com estruturação intacta. A Figura 3B revela que as células que foram submetidas ao banho-maria (90°C/20min) apresentaram marcação com PI com taxa de 94,2%, conforme o esperado (BORAZJANI et al., 2000). As amebas submetidas ao extrato e fração proteica (Figuras 3C e D, respectivamente), também apresentaram elevada marcação com PI, com valores de 98,1 e 93,1%, respectivamente, revelando que ambos os tratamentos promoveram danos à membrana dos trofozoítos, conduzindo-os a um estado de permeabilidade celular e consequente morte celular. Segundo Mogoa et al. (2010), cloro ativo oriundo do hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 5 µg/mL promoveu marcação positiva para PI em 90% das células de *A. castellanii*. Outra pesquisa realizada por Borazjani et al. (2000) mostrou marcação de 93 a 99% de células de *A. castellanii* quando incubadas com o antisséptico clorexidina (50 µg/mL). Observa-se então, que a marcação positiva para PI do desinfetante hipoclorito de sódio e do antisséptico clorexidina apresentaram índices de permeabilização semelhantes (acima dos 90%), aos encontrados para as amebas tratadas com o extrato e fração de sementes de *M. oleifera*.

Foi avaliada também através da citometria de fluxo a possibilidade de alterações no tamanho e complexidade celular dos trofozoítos de *A. castellanii* tratados com o extrato aquoso e fração na IC₅₀. O controle (Figura 4A) mostrou duas tendências na população de células baseado na dispersão da luz, sendo algumas delas com menor tamanho celular (menor FSC) e maior granulosidade celular (maior SSC) enquanto a outra tendeu a ter maior tamanho e menor granulosidade. Foi evidenciado nas amebas submetidas ao banho-maria (Figura 4B) um aumento da dispersão lateral (SSC) e uma diminuição da dispersão frontal (FSC), revelando que o calor contínuo a 90°C por 20 min, tendeu a aumentar a granulosidade e a diminuição do tamanho celular. Houve uma maior concentração da população de amebas com um tamanho reduzido nas amebas tratadas com o extrato aquoso, indicando uma resposta clássica da atividade amebicida, com marcação PI positiva associada a diminuição do tamanho celular (MOGOA et al., 2011). (Figura 4C). Já as amebas tratadas com a fração proteica apresentaram características

similares ao controle, sugerindo que apesar da fração apresentar ação amebicida, a(s) molécula(s) ativa(s) não promoveram significativas alterações morfológicas na população de amebas.

4. Conclusão

Em virtude dos dados encontrados, observou-se que o extrato aquoso e a fração 0-60% de sementes de *M. oleifera* inviabilizaram trofozoítos de *A. castellanii* de forma dose-dependentes. Constatou-se também que o tratamento das amebas com o extrato e fração da moringa promoveram altos índices de permeabilização do marcador iodeto de propídeo, indicando danos a membrana plasmática celular e consequente morte celular. É a primeira vez que estudos são feitos analisando os efeitos do extrato, frações e lectina WSMoL de *M. oleifera* sobre organismos do gênero *Acanthamoeba*.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (407192/2018-2) e concessão de bolsas de pesquisa (PMGP e THN), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro (APQ-0108-2.08/14) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001). Belmonte, B.R. agrade à FACEPE pela concessão de bolsa de Doutorado (IBPG-0281-2.08/15).

Referências

- BIJINA, B. et al. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. *Saudi J Biol Sci*, v. 18, n. 3, p. 273-281, 2011.
- BING, D.H.; WEYAND, J.G.M.; STAVISTSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, p. 1166-1170, 1967.

- BORAZJANI, R. N. et al. Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*, v.66, n. 3, p. 1057–1061, 2000.
- CACERES, A. et al. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: preliminary screening for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, v. 33, n. 3, p. 213–216, 1991.
- CHUMARK, P. et al. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol*, v. 116, n. 3, p. 439–446, 2008.
- CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis*. *Trends Parasitol*, v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006.
- COELHO, J.S. Et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v. 77, n. 7, p. 934–938, 2009.
- DART, J.K.; SAW, V.P.J.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis and treatment update. *Am J Ophthalmol*, v. 148, n. 4, p. 487–499, 2009.
- DUNAND, V. A. et al. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clin Infect Dis*, v. 25, p. 267–272, 1997.
- FERREIRA, R.S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett Appl Microbiol*, v. 53, n. 2, p. 186–192, 2011.
- FREITAS, J.H.E.S. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. *Protein Pept Lett*, v. 23, n. 7, p. 645–649, 2016.
- GUPTA, R., et al. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *J Diabetes*, v. 4, n. 2, p. 164–171, 2012.
- KHAN, N.A.; SIDDIQUI, R. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction protein. *Int J Parasitol*, v. 39, n. 14, p.1611–1616, 2009.
- LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N.A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, v. 22, n.10, p. 1–20, 2015.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J BiolChem*, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MALATYALI, E. et al. *In vitro* amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res*, v. 110, p. 2175–2180, 2012.

- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*, v.16. p. 273-307, 2003.
- MARRUFO, T. et al. 2013. Chemical composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. *Molecules*, v. 18, n. 9, p. 10989-11000, 2013.
- MAY, L. P.; SIDHU, G. S.; BUCHNESS, M. R. Diagnosis of *Acanthamoeba* infection by cutaneous manifestations in a man seropositive to HIV. *J Am Acad Dermatol*, v. 26, p. 352-355, 1992.
- MOGOA, E. et al. *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. *Experimental Parasitology*, v. 126, p. 97-102, 2010.
- MOGOA, E. et al. *Acanthamoeba castellanii*: Cellular Response of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* to Chlorine, Chlorine Dioxide, and Monochloramine Treatments, v. 77, n. 14, p. 4974–4980, 2011.
- MOURA, K.S. et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 180, n. 7, p. 1361-1371, 2016.
- MOURA, M.C. et al. Multi-efeito da lectina da *Moringa oleifera* solúvel em água contra *Serratia marcescens* e *Bacillus* sp.: propriedades antibacterianas, antibiofilme e anti-adesivas. *J Appl Microbiol*, v.123, n. 4, p. 861-874, 2017.
- MOURA, M.C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*, v. 119, p. 666- 676, 2015.
- ORTEGA-RIVAS, A. et al. *Acanthamoeba castellanii*: A new high-throughput method for drug screening *in vitro*. *Acta Tropica*, v. 164, p. 95-99, 2016.
- PETRY, F. et al., Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* v. 44, n. 5, p. 1903-1904, 2006.
- PONTUAL E.V. et al. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch Insect Biochem*. v. 79, n. 3, p. 135-152, 2012.
- PONTUAL, E.V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. *Nat Prod Res*, v. 32, p. 2940-2934, 2018.
- SANTOS, A. F. S. et al. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree. *Advances in Research*, v. 4, n. 6, p. 388-402, 2015.

- SANTOS, N.D.L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. PLoS One, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.
- SCHEID, P., et al. An extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp. isolated from a patient with keratitis. Parasitol Res, v. 102, n. 5, p. 945-950, 2008.
- SIFAOU, I. et al. Activity assessment of Tunisian olive leaf extracts against the trophozoite stage of *Acanthamoeba*. Parasitol Res, v. 112, p. 2825-2829, 2013.
- TORNO, M. et al. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. J Am Acad Dermatol, v. 42, p. 351-354, 2000.
- VISVESVARA, G.S. Amebicmeningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. Curr Opin Infect Dis, v. 23, n. 6, p. 590-594, 2010.
- TEPE, B. et al. In vitro amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. Parasitol Res, v. 110, p. 1773-1778, 2012.

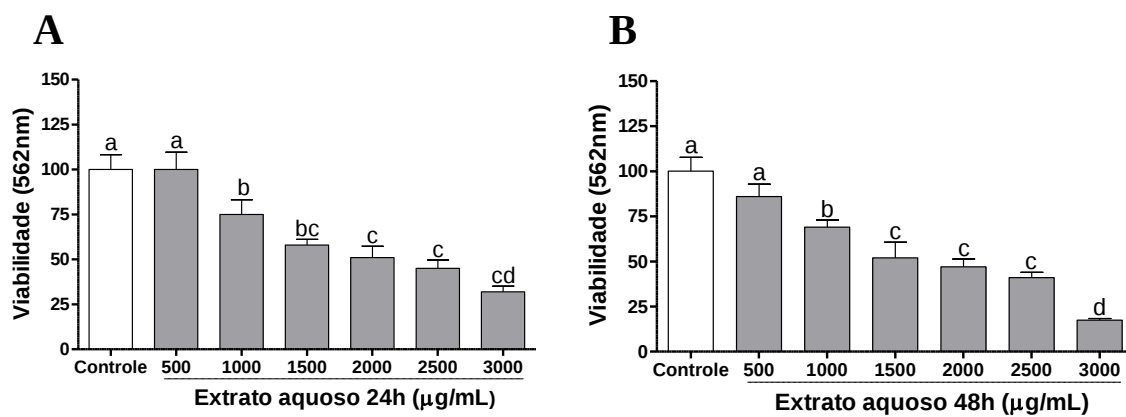


Figura 1 – Efeitos *in vitro* do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* na viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (8×10^4 céls/mL) tratados por um período de 24 h (A) ou 48 h (B). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Análise de dois experimentos independentes em triplicata.

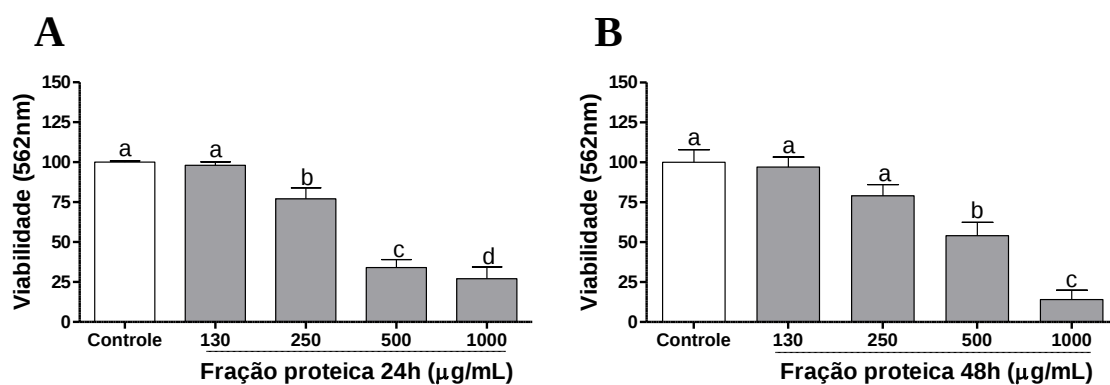


Figura 2 – Efeitos *in vitro* da fração proteica do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* na viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (8×10^4 céls/mL) tratados por um período de 24 h (A) ou 48 h (B). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Análise de dois experimentos independentes em triplicata.

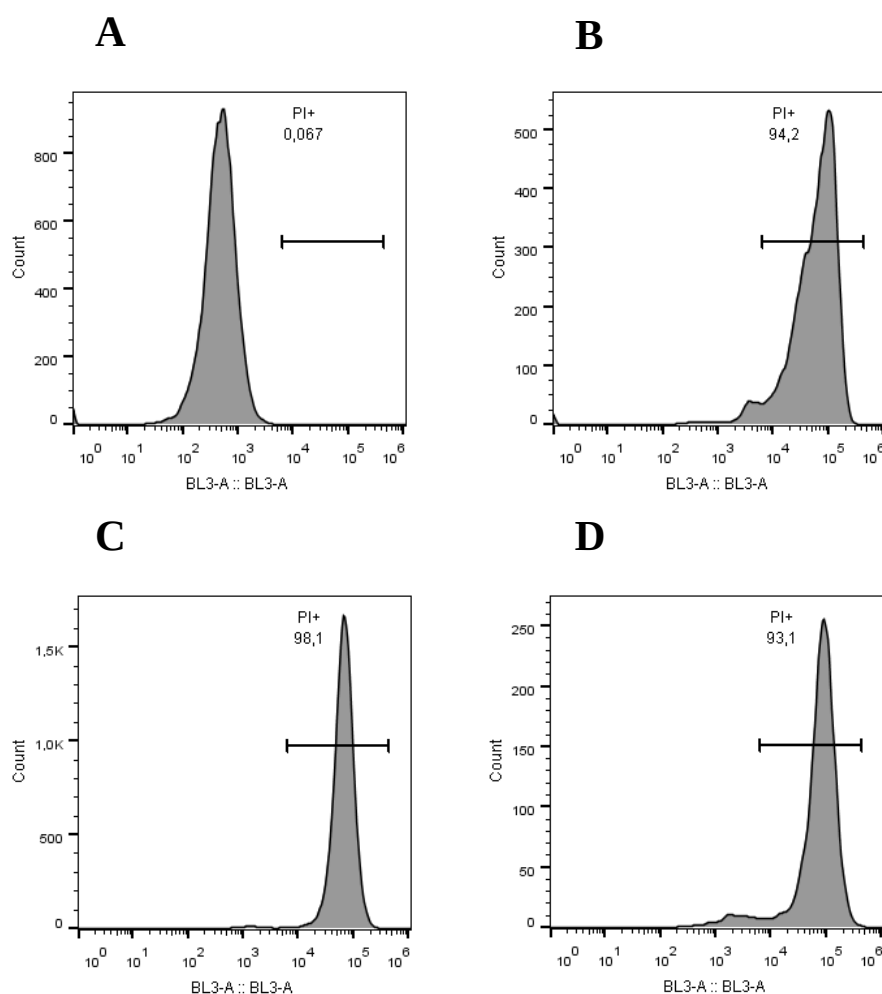


Figura 3 – Histograma do efeito sobre a viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (1×10^5 céls/mL) submetidos ao tratamento com extrato aquoso e fração proteica de sementes de *M. oleifera* após um período de 24 h. As amebas foram coradas com iodeto de propídeo (PI). O gráfico *Count* (contagem) versus BL3-A (640 nm) foram usados para discriminar a integridade da membrana de células do controle (A), de células mortas submetidas ao banho-maria (90°C/20min) (B), tratamento com o extrato na concentração de 2000 µg/mL (C) e o tratamento com a fração proteica na concentração de 469 µg/mL (D).

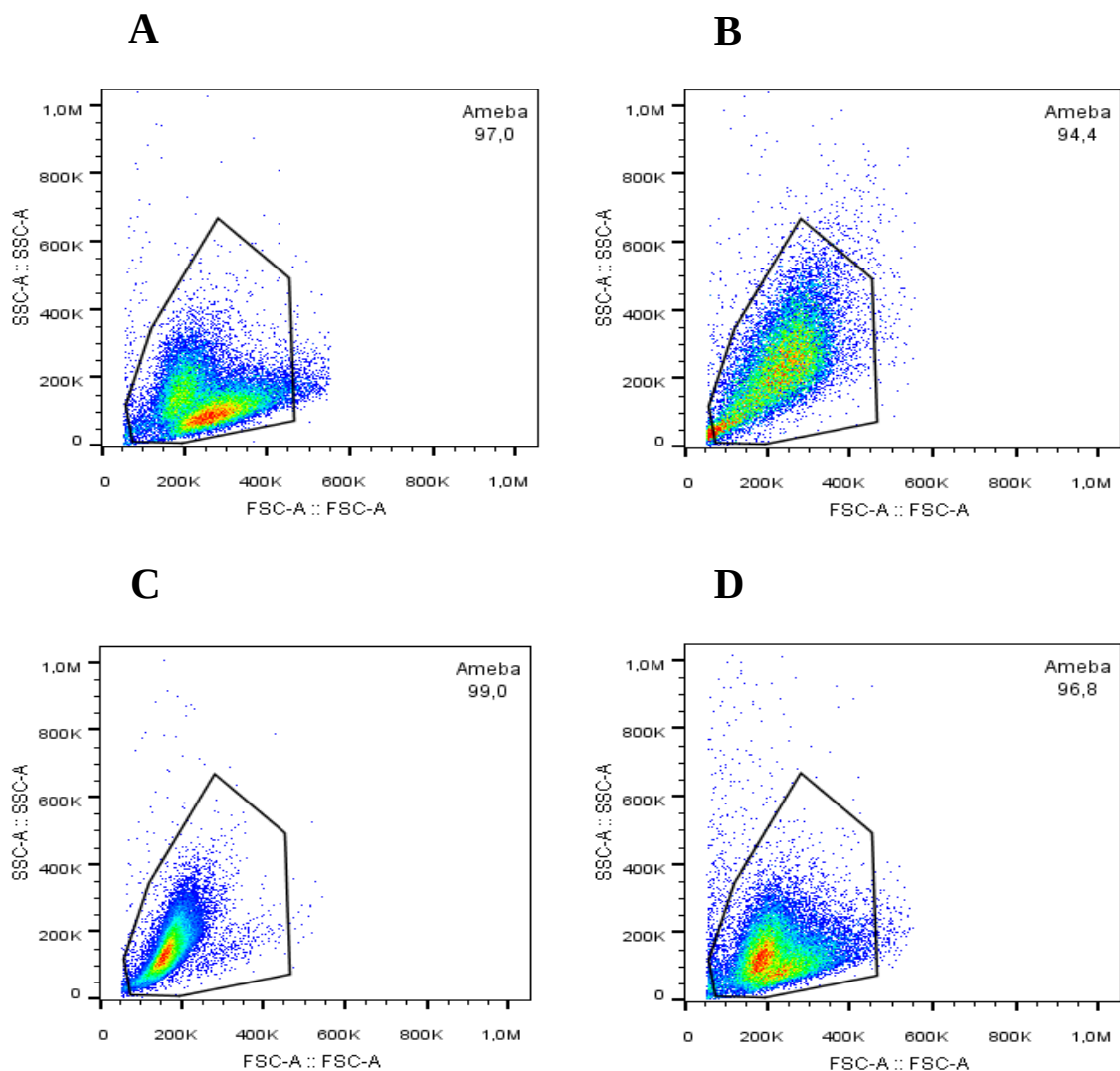


Figura 4 – Efeito de extrato aquoso e fração proteica de sementes de *M. oleifera* sobre o tamanho de células (FSC – Forward Scatter) e granulosidade ou complexidade celular (SSC – Side Scatter) de trofozoítos de *A. castellanii*. Os gráficos SSC versus FSC foram usados para determinar a influência das amostras. Estão representadas células controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria (90°C/20min) (B), extrato aquoso na concentração de 2000 µg/mL (C), fração proteica na concentração de 469 µg/mL (D).

3.2 ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICÍDICA DE PREPARAÇÕES DE LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* em *Schistosoma mansoni*

Bernardo do Rego Belmonte^a, André de Lima Aires^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco 50670-420, Recife. Pernambuco, Brasil.*

*Autor para correspondência. Tel: +558121268540; Fax: +558121268576

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

A esquistossomose é uma doença crônica debilitante causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*. É considerada uma das doenças pantropicais negligenciadas, afetando mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Casos de resistência ao praziquantel (PZQ), medicamento de referência, foram documentados, o que torna essencial a busca de novos medicamentos para controlar a doença. Buscando novas fontes de compostos bioativos com atividade equistossomicida, foi escolhida a espécie *Moringa oleifera*, pertencente à família Moringaceae, utilizada para diversos fins nutricionais e medicinais em todo o mundo, além de apresentar atividades biológicas variadas, inclusive em moluscos do gênero *Biomphalaria*. O presente trabalho analisou os efeitos do extrato, fração e lectina extraídos de *M. oleifera* na viabilidade de casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Foi determinado o processo de dessalinização entre os pares de vermes, o parâmetro de motilidade, por meio de escores (0-3) e a sobrevivência dos vermes adultos após a incubação com as amostras em monitoramento cronológico às 3, 6, 12 e 24 horas de exposição. A viabilidade celular dos pares de vermes de *S. mansoni* também foi analisada por um ensaio de citotoxicidade (MTT) e submetida a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para analisar a integridade do tegumento. Os dados sugerem que o extrato aquoso (EA) e a fração proteica 0-60% (FP) das sementes de *M. oleifera* foram eficazes na promoção da remoção de vermes adultos. Nos quais o EA apresentou 100% de desacoplamento em concentrações de 25 a 100 µg/mL no período de 6h a 12h de exposição. O FP apresentou o desacoplamento total nas concentrações de 6,25 a 50 µg/mL e no período de 3 a 6 h. Alterações na motilidade foram detectadas em vermes submetidos a EA de 3 h em concentrações de 25 a 100 µg/mL e no mesmo período em todas as concentrações. A mortalidade de 100% nas concentrações de 50 e 100 µg/mL de EA foi às 12 e 24h, respectivamente, enquanto a FP foi obtida nas concentrações de 50, 25, 12,5 µg/mL às 6, 12 e 24 h. No ensaio de viabilidade celular, os EA nas concentrações de 50 e 100 µg/mL não apresentaram diferença significativa em relação ao praziquantel (PZQ), o mesmo ocorreu no PF nas concentrações de 12,5 a 50 µg/mL. O IC₅₀ do EA foi de 23,48 µg/mL e o PF foi de 8,93 µg/mL. O estudo contribuiu para aumentar o conhecimento do potencial equistossomicida do extrato aquoso de *M. oleifera* e possivelmente indicar um composto natural para o combate de vermes adultos de *S. mansoni*.

Palavra-chave: Extrato; *Moringa oleifera*; Atividade Schistosomicida; *Schistosoma mansoni*.

1. Introdução

A esquistossomose representa uma doença aguda causada por vermes trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, relatada em 78 países, sendo endêmica em 52 deles com grau de transmissão moderado a alto. Estima-se que cerca de 206,4 milhões de pessoas precisassem de tratamento preventivo e mais de 89 milhões foram submetidas a tratamento em 2016 (Organização Mundial da Saúde, 2018). O Praziquantel é o medicamento atualmente usado para o tratamento da esquistossomose. No entanto, ele não tem ação contra o esquistossomo no estágio juvenil, não previne recorrências e tem sido relatado como causa de lesões no fígado e baço. Além disso, existe uma preocupação crescente com a resistência de algumas cepas, o que torna necessário o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da esquistossomose (Magalhães et al., 2009; 2010; Miranda et al., 2012; Vale et al., 2017).

Moringa oleifera é uma planta nativa da África Oriental e sul da Índia que apresenta distribuição pantropical, sendo encontrada nos continentes asiático, africano e americano. Muitos a consideram uma planta multiuso, com aplicações em nutrição e diversas áreas da biotecnologia e biomedicina. Várias atividades biológicas são descritas para preparações obtidas de diferentes órgãos da planta, como folhas, flores e sementes. Suas sementes são utilizadas como emolientes de cosméticos, na produção de biodiesel, para tratamento de água, na dieta de animais e na culinária (Santos et al., 2015; Followo et al., 2018). Um extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* apresentou atividade moluscicida em caracóis das espécies *Biomphalaria alexandrina* e *Biomphalaria glabrata*, hospedeiros intermediários de *S. mansoni* (Coelho da Silva; Vargas; Baptgas, 2013; Ibrahim e Abdalla, 2017). O extrato aquoso das flores de *M. oleifera* também mostrou atividade moluscicida em caracóis de *B. glabrata*, além de retardar o desenvolvimento de embriões (Rocha-Filho et al., 2015).

As sementes de *Moringa oleifera* contêm uma lectina solúvel em água (proteína de ligação a carboidratos) chamada WSMoL, que é uma proteína ácida de 60 kDa e ácida (Moura et al., 2016) que foi anteriormente relatada como um agente inseticida contra *Aedes aegypti* (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2012) e ter atividades antibacterianas (Moura et al., 2015, 2017; Coriolano et al., 2019) e atividades nematocidas (Medeiros et

al., 2018). O WSMoL também é capaz de reduzir a turbidez e remover metais da água (Freitas et al., 2016; Moura et al., 2016) e não foi genotóxico pelos ensaios de Ames e Kado (Rolim et al., 2011) e não mostrou toxicidade às células mononucleares do sangue periférico humano, podendo modular a liberação de citocinas por essas células (Coriolano et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade esquistossomocida *in vitro* de preparações de sementes de *M. oleifera* contendo WSMoL (extrato de água, fração de proteína e lectina isolada) em casais de *S. mansoni* adulto.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

Sementes de *M. oleifera* foram coletadas em Recife, Pernambuco, Brasil. Os autores possuem autorização (nº 38690) para coleta de plantas do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. As sementes foram secas a 28 °C por 48 h, trituradas com um liquidificador e armazenadas a -20 °C. Uma amostra de voucher é depositada sob o número 73.345 no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (Recife, Brasil). O acesso foi registrado (AA245C5) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

2.2. Obtenção do extrato e preparação de proteínas

O pó de semente de *M. oleifera* (10 g) foi suspenso em água destilada (100 mL) e homogeneizado em agitador magnético por 16 horas a 28 °C. Após filtração por gaze e centrifugação (3000 × g, 15 min, 4 °C), o extrato aquoso foi obtido. As proteínas do extrato foram precipitadas por tratamento com sulfato de amônio a 60% de saturação por 4 horas a 28 °C. Após centrifugação, a fração precipitada foi coletada, ressuspensa em NaCl 0,15 M e dialisada (membrana de 3,5 kDa) contra NaCl 0,15 M (6 h a 4 °C).

2.3. Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante (AH)

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina sérica bovina (31,25–500,00 µg / mL). O ensaio da atividade de hemaglutinação (AH) foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo em V (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Suécia) de acordo com Paiva e Coelho (1992) usando eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967). O número de unidades de AH foi definido como o recíproco da maior diluição da amostra que promoveu aglutinação total dos eritrócitos. O AH específico foi calculado pela razão entre o AH e a concentração de proteína (mg/mL). O Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) aprovou o método utilizado para a coleta dos eritrócitos (processo 23076.033782 / 2015-70).

2.4. *Schistosoma mansoni*

Os adultos de *S. mansoni* utilizados pertencem à linhagem BH (Belo Horizonte, Brasil), mantida no Laboratório Experimental de Esquistossomose da UFPE, através de passagens sucessivas em caracóis do gênero *Biomphalaria glabrata* e Swiss Webster. Quinze camundongos Swiss Webster, com 30 dias de idade, pesando 28 ± 2 g, foram infectados por via percutânea (Olivier e Stirewalt, 1952) com cerca de 100 cercárias de *S. mansoni*, linhagem BH (Belo Horizonte, Brasil). Os camundongos foram mantidos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE em ambiente controlado (20 ± 2 °C, ciclo de 12 h), com livre acesso a alimentos (Labina / Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (nº 23076.047560 / 2016-15).

2.5. Efeitos *in vitro* em casais de vermes adultos

2.5.1. Tratamento

Cinquenta dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados por entorse cervical e os vermes foram recuperados assepticamente por perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9%, p / v). Os vermes recuperados foram separados de acordo com o sexo em machos ou casais. Apenas casais intactos foram transferidos imediatamente para o meio RPMI 1640, suplementado com HEPES 20 mM, penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e estreptomicina 100 e soro

fetal bovino a 10%, e lavados três vezes com este meio. Em seguida, os vermes foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços com poços contendo 2 mL desse meio (dois casais por poço) e incubados a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 2 h de incubação, a amostra, solubilizada em meio de cultura suplementado, foi adicionada para atingir concentrações finais variando de 12,5 a 100 µg/mL (extrato de água) e 6,25 a 50 µg/mL (fração de proteína). Como controle, os casais de vermes foram incubados na presença de meio RPMI 1640 suplementado (controle negativo) ou exposto a 10 µM de PZQ (controle positivo). Todas as experiências foram realizadas em oito repetições (n = 16 vermes / oito casais por grupo) e repetidas pelo menos duas vezes.

2.5.2. Avaliação de motilidade e sobrevivência

Um microscópio invertido (Leica Microsystems, DM IL Wetzlar, Alemanha) foi utilizado para avaliar a motilidade e sobrevivência dos vermes nas 3, 6, 12 e 24 h de exposição, de acordo com os critérios propostos por Silva et al. (2018), sendo classificados em uma escala de 0 a 3: escore 3, vermes que mostram movimentos típicos, mostrando peristaltismo dos órgãos internos e ventosas em movimento aderidas ao fundo ou aos lados da placa de cultura; escore 2, movimentos reduzidos em todo o corpo, peristaltismo dos órgãos internos e de sucção; escore 1, movimentos apenas nas extremidades ou em apenas uma extremidade (anterior e/ou posterior), com ausência de peristaltismo dos órgãos internos e ausência de aderência de ventosas; pontuação 0, ausência completa de movimentos e tegumento com ou sem alterações de cor. O tratamento foi considerado letal quando não foi possível observar movimentos parasitários por até 2 minutos.

2.5.3. Viabilidade celular

A viabilidade celular de casais de *S. mansoni* foi avaliada pelo teste de citotoxicidade com base no brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) de acordo com Aires et al. (2014). Resumidamente, dois casais foram colocados em poços individuais em placas de 96 poços contendo 100 µL de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato, PBS) e incubados a 37 °C por 30 min. Posteriormente, a solução MTT foi substituída por 200 µL de DMSO, a fim de dissolver os cristais roxos de formazan e foi medida a densidade óptica a 550 nm. Como grupos

controle, os casais de *S. mansoni* foram incubados em RPMI 1640 (controle negativo) ou expostos a 10 μ M de PZQ (controle positivo). Todas as experiências foram realizadas em oito repetições e repetidas pelo menos duas vezes.

2.6. Análise estatística

Os dados são expressos como desvio padrão da média (DP) e foram analisados com o software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla - CA, EUA). As diferenças estatísticas foram determinadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) associada ao teste de Tukey para comparações múltiplas em uma única etapa. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

Nas últimas décadas, houve um aumento no número de estudos que buscam contribuir para novas estratégias terapêuticas para doenças tropicais, incluindo a esquistossomose, principalmente devido à ocorrência de eficácia reduzida do fármaco de referência praziquantel e ao aparecimento do patógeno em (Moraes et al., 2012; Vale et al., 2017). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso, fração protéica e lectina isolados em adultos de *S. mansoni* na busca de novos compostos com efeito esquistossomicida.

Primeiramente, foi avaliado o processo de desacasalamento de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o extrato de água e a fração protéica. No tratamento com o extrato a 100 μ g/mL, houve dissociação de 62,5% e 100% dos casais em 3 e 6 h, respectivamente. A 50 μ g/mL, todos os casais (100%) estavam em processo de desacasalamento em 3 horas e 100% de desacasalamento foi observada após 6 h. A 25 μ g/mL, 75% dos casais estão em processo de desacasalamento e 25% permanecem acasalados, após 6 horas todos no processo de desacasalamento e em 12 horas todos se separaram. Finalmente, na concentração de 12,5 μ g/mL, não houve desmontagem nas primeiras 3 horas, mas 25% estava em desacasalamento após 6 e 12 h. Após 24 h, 37,5% foram desacasalamento. Em resumo, pode-se observar que o extrato causou desacasalamento em todas as concentrações testadas, impedindo o ciclo reprodutivo de vermes adultos.

A fração proteica de 0 a 60%, nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, causou desacasalamento de 100% nas primeiras 3 h. Na concentração de 12,5 µg/mL, 87,5% dos vermes foram desacasalamento dentro de 3 horas e 100% em 6 horas. Na concentração de 6,25 µg/mL, a desacasalamento atingiu 75% em 3 h e 100% em 6 h. A fração mostrou-se mais eficiente em relação ao extrato, pois promoveu o desacasalamento de todos os vermes duas vezes mais rápido na concentração de 50 µg/mL e quatro vezes mais rápido em 25 µg/mL. Na concentração de 6,25 µg/mL, a fração teve um efeito equivalente às concentrações de 50 e 100 µg/mL do extrato de água no mesmo período de tempo (6 h).

Oliveira et al. (2014), investigaram a ação de um extrato diclorometanólico das partes aéreas de *Baccharis trimera* e uma fração aquosa derivada desse extrato no adulto *S. mansoni* e descobriram que o extrato (130 µg/mL) induzia uma taxa de desacasalamento de 40% após um período de 6 horas e a fração (130 µg/mL) causou 100% de dissociação nesse mesmo período. Comparativamente, o extrato de água das sementes de *M. oleifera* teve um efeito melhor que a fração aquosa de *B. trimera* nas primeiras 6 horas, uma vez que taxas de desacasalamento semelhantes foram observadas em concentrações mais baixas de 100 e 50 µg/mL. A fração proteica de *M. oleifera* foi muito mais eficaz que o extrato e fração de *B. trimera*.

Substâncias e medicamentos capazes de promover o desacasalamento são úteis para interromper o processo de reprodução de vermes adultos, uma vez que o acasalamento é primordial para a continuidade da maturidade sexual das fêmeas. Na ausência de acasalamento, a fêmea não poderia produzir células e ovos da gema amadurecida (Erasmus, 1986; Kunz, 2001; Carvalho et al., 2008).

Os escores de motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* submetidos ao extrato de água são mostrados na Tabela 1. No tratamento a 100 µg/mL, após um período de 3 h, 6,25% dos vermes estavam mortos (escore 0) enquanto os outros mostraram com movimentos apenas na extremidade (escore 1) ou movimentos reduzidos (escore 2). Após 6 h, a maioria dos vermes (75%) já estava morta e o restante foi classificado no escore 1. Ao completar 12 h do experimento, todos os vermes já estavam mortos. Na concentração de 50 µg/mL, a maioria dos vermes (87,5%) estava no escore 2 nas primeiras 3 horas, e após 6 e 12 h a porcentagem no escore 0 (morto) aumentou para 18,75% e 87,5%, respectivamente. Ao final do bioensaio (24 h), a mortalidade atingiu 93,75%. A 25 µg / mL, foi observada mortalidade (31,25%) em um período de 12 horas e metade dos vermes apresentou motilidade reduzida (escore 1); após 24 h, 56,25% estavam mortos. Na

concentração mais baixa, 12,5 µg/mL, não houve mortalidade, mas alterações na motilidade foram observadas nos tratamentos por 12 e 24 h.

Um estudo realizado Yones et al. (2016) mostraram que extratos etanólicos de folhas e casca de *Punica granatum* promoveram 100% de mortalidade de vermes adultos após 12 h de exposição a uma concentração de 100 µg/mL, semelhante ao extrato de água de *M. oleifera*. Em outro estudo, taxas de mortalidade de 60% e 100% foram detectadas após períodos de exposição de 6 e 24 horas, respectivamente, para vermes adultos tratados com o extrato diclorometanólico de *B. trimera* e sua fração aquosa, ambos na concentração de 130 µg/mL (Oliveira et al., 2014). O extrato aquoso de moringa foi mais eficiente que as preparações de *B. trimera*, pois promoveu 100% de mortalidade na metade do tempo (12 h) e em menor concentração (100 µg/mL).

A Tabela 2 mostra os escores de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* submetidos a tratamentos com a fração protéica de sementes de *M. oleifera*. Três horas de exposição à concentração de 50 µg/mL resultaram em morte de 75% dos vermes (escore 0) e mortalidade de 100% após 6 h. A 25 µg/mL, a porcentagem no escore 0 foi de 62,5% nas primeiras 3 horas e aumentou para 100% após 12 horas de exposição. Na concentração de 12,5 µg/mL, a mortalidade dos vermes começou no intervalo entre 3 e 6 horas e os outros vermes estavam movendo apenas as extremidades (escore 1). Após 12 e 24 h, 75% e 100% dos vermes estavam mortos. A menor concentração testada, 6,75 µg/mL, não promoveu mortalidade, mas, após 24 h, 50% dos vermes foram encontrados no escore 1 e os demais apresentaram motilidade reduzida.

A fração protéica mostrou maior eficiência na promoção da mortalidade dos vermes adultos do que o extrato aquoso. A 50 µg/mL, a fração eliminou todos os vermes duas vezes mais rápido em comparação com a concentração de 100 µg/mL do extrato e quatro vezes mais rápido que a mesma concentração do extrato. Além disso, o efeito da fração a 12,5 µg/mL foi semelhante ao do extrato a 50 µg/mL.

A fração proteica das sementes de *M. oleifera*, na concentração de 50 µg/mL, promoveu mortalidade completa dos vermes adultos em um período quatro vezes menor (6 h) que a fração hexana (50 µg/mL) e a fração acetato de etila (75 µg/mL) de um extrato etanólico do epicarpo de frutos de *Garcinia brasiliensis* (Castro et al., 2015).

Alguns fatores que podem afetar o padrão de motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* são alterações na homeostase do cálcio, níveis de neurotransmissores e/ou neuromoduladores ou alterações musculares estruturais (Kohn et al., 1982; Shaw e

Erasmus, 1983; Noël, 2008). Testes adicionais precisavam ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos do extrato e da fração de *M. oleifera*.

Os resultados do teste de viabilidade celular são mostrados nas Figuras 1 e 2. Os resultados revelaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular nos tratamentos com o extrato desde 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1) e um IC_{50} de 23,48 [19,35 –28,49] $\mu\text{g/mL}$ foi calculado. Para a fração protéica, foi detectada uma redução significativa da viabilidade ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas (Figura 2), sendo o valor de IC_{50} 8,93 [7,71-10,36] $\mu\text{g/mL}$, valor 2,63 vezes menor que o determinado para o extrato.

4. Conclusão

De acordo com os resultados analisados neste estudo, a fração de extrato e proteína de *M. oleifera* apresentou ampla ação no casal adultos de *S. mansoni*, promovendo o desacoplamento, alterando a motilidade e a viabilidade celular dos vermes tratados. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* não são necessários para entender os possíveis mecanismos de ação e alterações produzidas nos vermes. Levando em consideração o que foi observado, extrato e fração de potenciais agentes esquistossomicidas.

Referências

- AIRES, A. L. et al. Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Experimental Parasitology*, v. 142, p. 83–90, 2014.
- BHATIA, S.; OTHMAN, Z.; AHMAD, A. L. Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant. *Journal of Hazardous Materials*, v. 145, p. 120–126, 2007.
- BING, D.H.; WEYAND, J.G.M.; STAVISTSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, p. 1166-1170, 1967.
- CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Med*, v. 81, p. 733–741, 2015.
- COELHO DA SILVA, C. L. P. A.; VARGAS, T. S.; BAPTISTA, D. F. Molluscicidal activity of *Moringa oleifera* on *Biomphalaria glabrata*: Integrated dynamics to the

- control of the snail host of *Schistosoma mansoni*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 23, n. 5, p. 848–850, 2013.
- COELHO, J.S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere, v.77, p. 934-938, 2009.
- FALOWOA, A. B. et al. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. Food Research International, v.106, p. 317–334, 2018.
- HALLYSSON, D. A. A. et al. Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and *in vitro* anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica, v. 192, p. 1-10, 2019.
- IBRAHIM, A. M.; ABDALLA, A. M. Impact of *Moringa oleifera* seed aqueous extract on some biological, biochemical, and histological aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. Environ Sci Pollut Res Int, v. 24, n.36, p. 28072-28078, 2017.
- KOHN, A.; LÓPEZ-ALVAREZ, M.L.; KATZ, N. Transmission and scanning electron microscopical studies in the tegument of male *Schistosoma mansoni* after oxamniquine treatment. Ann. Parasitol. Hum. Comp, v. 57, n. 3, p. 285-291, 1982.
- KUNZ, W. Schistosome male–female interaction: induction of germ-cell differentiation. trends in parasitology, v.17, n.5, p. 227-231, 2001.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MAGALHÃES, L.G. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitol Res, v. 104, n. 5, p.1197–1201, 2009.
- MAGALHÃES, L.G. et al. *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from Dryopteris species against *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitol Res v. 106, n.2, p. 395–401, 2010.
- MIRANDA, M.A. et al. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. Parasitol Res, v. 111, p. 257–262, 2012.
- MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales (Ed.), Current Topics in Tropical Medicine. InTech Open, Rijeka, pp. 333–358, 2012.
- NOËL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: Carvalho, OS., Coelho, PMZ., and Lenzi, HL., orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 207-244, 2008.

- OLIVEIRA, R. N. et al. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, v. 139, p. 63–72, 2014.
- OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol*, v. 38, p. 19–23, 1952.
- OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol*, v. 38, p. 19–23, 1952.
- PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-118, 1992.
- ROCHA-FILHO, C. A. A. et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere*, v. 132, p. 188–192, 2015.
- SANTOS, A. F. S. et al. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree. *Advances in Research*, v. 4, n. 6, p. 388-402, 2015.
- SHAW, M. K.; ERASMUS, D.A. *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental surface changes after *in vivo* treatment with praziquantel. *Z Parasitenkd*, v.69, p. 643-653, 1983.
- SILVA, L.M.M.G. et al. New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. *Chem. Biol. Interact*, v. 283, p. 20-29, 2018.
- SILVA, L.M.M.G. et al. New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. *Chem. Biol. Interact*, v. 283, p. 20-29, 2018.
- TEIXEIRA, C. M. L. L.; KIRSTEN, F.V.; TEIXEIRA, P. C. N. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, p. 557–563, 2012.
- VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 5, 2017.
- WHO. Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>> Acesso em: 30/07/2018.
- YONES, D. A. et al. Comparative Evaluation of Anthelmintic Activity of Edible and Ornamental Pomegranate Ethanolic Extracts against *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, v. 2016, p.1-15, 2016.

Tabela 1 – Escores de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com praziquantel (PZQ) e extrato aquoso de *Moringa oleifera* em diferentes tempos pós-incubação.

Grupos	Percentual de vermes (%) nos escores de motilidade após a incubação															
	3 h				6 h				12 h				24 h			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Controle				100				100				100				100
PZQ																
10 μ M	100				100				100				100			
Extrato																
100 μ g/mL	6.25	43.75	50		75	25			100				100			
50 μ g/mL		12.5	87.5		18.75	43.75	37.5		87.5	12.5			93.75	6.25		
25 μ g/mL			62.5	37.5			100		31.25	50	18.75		56.25	43.75		
12.5 μ g/mL				100				100			62.5	37.5		18.75	81.25	

Nota: No rastreio do teste de praziquantel móvel e do extrato aquoso, foram utilizados 8 pares de vermes para cada concentração (16 machos e 16 fêmeas). Escore 3, vermes que mostram movimentos típicos, exibindo peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento aderidas ao fundo ou aos lados da placa de cultura; descrições típicas de worms de controle negativo; escore 2, movimentos reduzidos em todo o corpo, peristaltismo dos órgãos internos e de sucção; escore 1, movimentos apenas nas extremidades ou em apenas uma extremidade (região anterior e/ou posterior), com ausência de peristaltismo dos órgãos internos e sem adesão de ventosas; pontuação 0, ausência completa de movimentos e tegumento com ou sem alterações de cor. O tratamento foi considerado letal quando não foi possível observar movimentos parasitários por até 2 minutos.

Tabela 2 – Escores de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com praziquantel (PZQ) e fração protéica de sementes de *Moringa oleifera* em diferentes tempos pós-incubação.

Grupos	Percentual de vermes (%) nos escores de motilidade após a incubação															
	3 h				6 h				12 h				24 h			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Controle				100				100				100				100
PZQ																
10 µM	100				100				100				100			
Fração																
50 µg/mL	75	25			100				100				100			
25 µg/mL	62.5	37.5			81.25	18.75			100				100			
12.5 µg/mL			100		31.25	68.75			75	25			100			
6.75 µg/mL			75	25			87.5	12.5		31.25	68.75			50	50	

Nota: No rastreio do teste de praziquantel móvel e do extrato aquoso, foram utilizados 8 pares de vermes para cada concentração (16 machos e 16 fêmeas). Escore 3, vermes que mostram movimentos típicos, exibindo peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento aderidas ao fundo ou aos lados da placa de cultura; descrições típicas de worms de controle negativo; escore 2, movimentos reduzidos em todo o corpo, peristaltismo dos órgãos internos e de sucção; escore 1, movimentos apenas nas extremidades ou em apenas uma extremidade (região anterior e/ou posterior), com ausência de peristaltismo dos órgãos internos e sem adesão de ventosas; pontuação 0, ausência completa de movimentos e tegumento com ou sem alterações de cor. O tratamento foi considerado letal quando não foi possível observar movimentos parasitários por até 2 minutos.

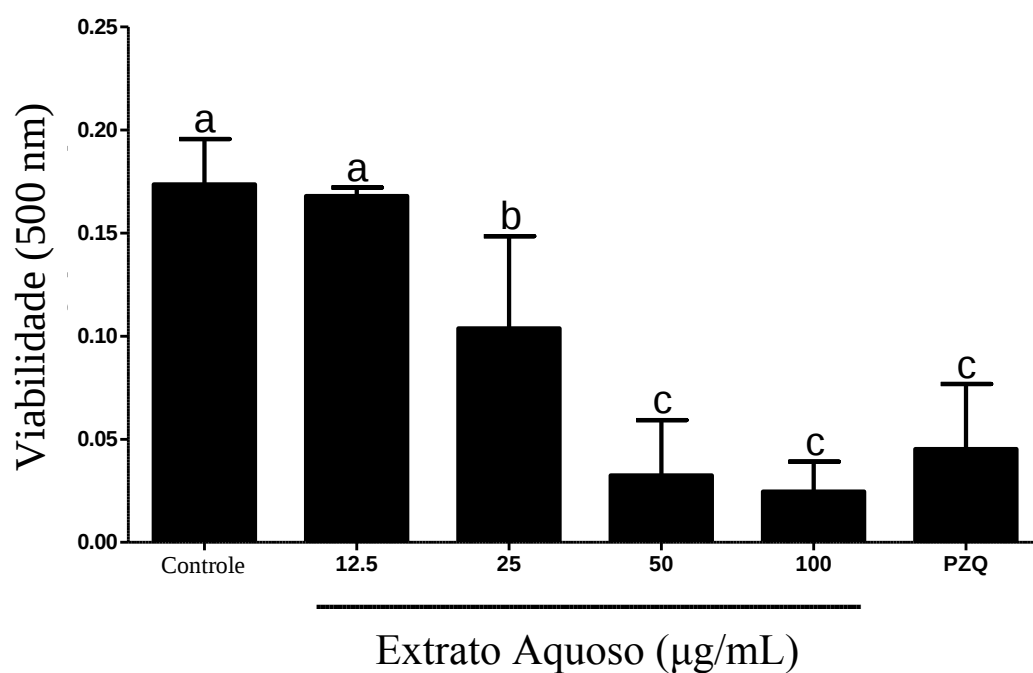


Figure 1 – Efeitos *in vitro* do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* na viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. Gêmeos de vermes adultos foram tratados com amostras em diferentes concentrações (12,5 - 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h, a viabilidade foi medida usando o ensaio MTT e a leitura do corante formazan reduzido registrada a 550 nm. Os controles negativos dos vermes foram incubados no RPMI 1640. O Praziquantel (PQZ, 10 μM ou 3,124 $\mu\text{g / ml}$) foi usado como grupos de controle positivo. A viabilidade foi expressa como média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

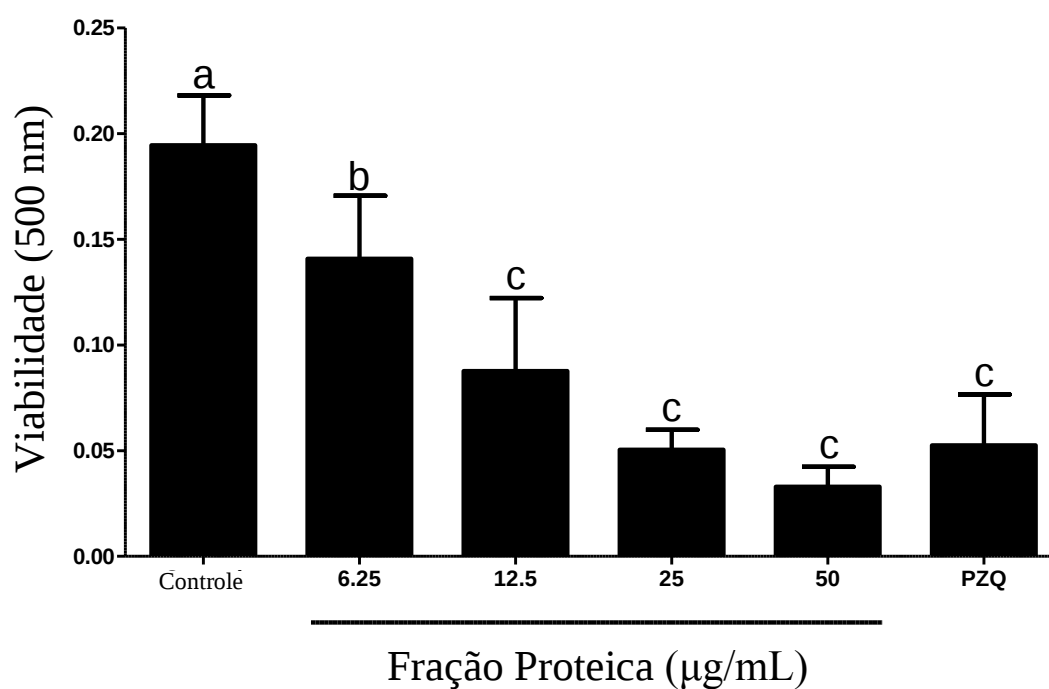


Figura 2 – Efeitos *in vitro* da fração proteica do extrato aquoso de *M. oleifera* na viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. Gêmeos de vermes adultos foram tratados com amostras em diferentes concentrações (6,25 - 50 µg/mL) por 24 h, a viabilidade foi medida usando o ensaio MTT e a leitura reduzida de corante de formazan registrada a 550 nm. Os controles negativos dos vermes foram incubados no RPMI 1640. O Praziquantel (PQZ, 10 µM ou 3,124 µg/mL) foi usado como grupos de controle positivo. A viabilidade foi expressa como média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3 ARTIGO 3 - ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E AMEBICIDA *in vitro* DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Schinus terebinthifolia* FOLHAS E SUAS FRAÇÕES

Bernardo do Rego Belmonte^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Maiara Celine de Moura^a, Edclécia Nascimento Santos^b, Wliana Alves Viturino da Silva^c, Patrícia Cristina Bezerra-Silva^d, Roberto Araújo Sá^e, Ana Rosa Peixoto^f, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^d, Silvio Santana Dolabella^b, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^c, Luiz Alberto Lira Soares^c, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil.*

^c*Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^d*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^e*Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Pernambuco, Brasil.*

^f*Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, Bahia, Brasil.*

*Autor para correspondência. Tel: +558121268540; Fax: +558121268576

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

A resistência microbiana tem progredido e ganhado destaque no mundo inteiro, caracterizando-se como um sério problema de saúde pública. Esta resistência está relacionada principalmente com a adaptação de microrganismos patogênicos aos diferentes biocidas utilizados de forma indiscriminada e inadequada. O período necessário para o surgimento de resistência tem se mostrado curto para muitos fármacos, além de um número limitado de drogas antimicrobianas, tornando-se indispensável a busca por novos medicamentos, principalmente de fontes naturais como as plantas medicinais. Este trabalho avaliou a ação do extrato etanólico e frações orgânicas da planta medicinal *Schinus terebinthifolia* sobre bactérias e fungos patogênicos, bactérias fitopatogênicas e o protozoário *Acanthamoeba castellanii*. Através da análise fitoquímica foi detectado no extrato etanólico e frações a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, terpenos, esteróides, cumarinas e açúcares redutores através da cromatografia em camada delgada (CCD). Uma posterior análise foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) onde foi possível evidenciar a presença de ácido gálico e um dos seus derivados (270 nm), bem como um pico similar a rutina (350 nm). O extrato apresentou ação inibitória sobre as espécies de bactérias patogênicas: *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC e UFPEDA-670, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC e UFPEDA-261, já as frações do extrato permaneceu inibindo a cepa *S. aureus* ATCC e *S. aureus* UFPEDA-670, entretanto com atividade reduzida. Foi detectada ainda atividade inibitória do extrato sobre fungos da espécie *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e das frações sobre *C. albicans*, porém em menor intensidade. Sobre as bactérias fitopatogênicas foi detectado atividades inibitórias e bactericidas do extrato sobre variadas cepas de *Pectobacterium* sp isolados de diferentes substratos. Das amostras testadas apenas a fração butanólica apresentou potente ação amebicida sobre o trofozoíto da espécie *A. castellanii*, onde ocorreu a redução da viabilidade celular no período de 24 e 48h. O extrato foi ativo contra a maior parte dos microrganismos testados, evidenciando uma ampla ação inibitória, enquanto que apenas a fração butanólica revelou ser um potente agente redutor da viabilidade celular de *A. castellanii*.

Palavras-Chave: *Schinus terebinthifolius*; atividade antimicrobiana; extrato; atividade amebicida.

1. Introdução

As plantas têm sido tradicionalmente usadas para fins medicinais e suas bioatividades medicinais estão associadas a diferentes tipos de compostos que foram prospectados (Compean e Ynalvez, 2014). Existe um interesse crescente em estudar extratos e compostos de plantas medicinais como fonte de novos agentes antimicrobianos, principalmente devido ao aumento da incidência de microrganismos resistentes aos antibióticos atualmente utilizados (Riffel et al., 2002; Hossain et al., 2012).

Entre essas plantas de interesse medicinal está a espécie *Schinus terebinthifolia* Raddi, planta pertencente à família Anacardiaceae, endêmica e nativa da América do Sul, sendo encontrada principalmente no Brasil, Paraguai e Argentina. Pode ser encontrada em vários habitats, mas prevalece nas regiões de Mata Atlântica (Bendaoud et al., 2010). Vários usos medicinais são relatados, inclusive contra inflamações e infecções no trato urogenital, bem como para tratar feridas e úlceras, por exemplo (Gilbert e Favoreto, 2011). Muitas atividades biológicas também foram descritas para preparações e moléculas obtidas de diferentes partes desta planta, como inseticidas (Procópio et al., 2015; Camaroti et al., 2018), acaricida (Nascimento et al., 2012), antimicrobiano (Gomes et al., 2013) atividades. As folhas de *S. terebinthifolia* contêm vários compostos com ação antimicrobiana contra patógenos humanos dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Shigella*, como lectina SteLL, óleos essenciais e extratos etanólicos e metanólicos. (Martinez et al., 1996; El-Massry et al., 2009; Gomes et al., 2013). As folhas de *S. terebinthifolia* também apresentaram efeito antibacteriano nas bactérias fitopatogênicas *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (Badawy e Abdelgaleil, 2014).

As cepas de *Acanthamoeba* podem atuar como patógenos oportunistas humanos, causando lesões cutâneas, infecções sinusais, ceratites e encefalites, que representam uma infecção rara, porém fatal (Marciano-Cabral e Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007; Siddiqui e Khan, 2012). A fase trofozoíta é sensível a vários agentes quimioterapêuticos, como antibióticos, anti-sépticos, antifúngicos, antiprotozoários, entre outros; no entanto, a exposição prolongada e contínua da fase cística, que é resistente a medicamentos, gera uma pressão de seleção que favorece a propagação da resistência. Diferentes cepas resistentes a medicamentos já foram relatadas, tornando crucial a busca por agentes amebicidas alternativos (Turner et al., 2000, 2004; Khan, 2006; Castrillon e Orozco, 2013; Pérez-Cota et al., 2019). Na busca de novos agentes amebicidas, algumas plantas

têm sido avaliadas como fontes de agentes antiacanthamoeba, como extratos metanólicos de *Origanum syriacum* e *Origanum laevigatum*, bem como extratos metanólicos e etanólicos de *Olea europaea*. (Degerli et al., 2012; Sifaoui et al., 2013).

Neste trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* e suas frações contra espécies bacterianas e fúngicas patogênicas para seres humanos e bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*. Além disso, foi avaliado o efeito amebicida dessas preparações em *Acanthamoeba castellanii*.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

As folhas de *S. terebinthifolia* foram coletadas em setembro de 2016, em Recife, Pernambuco, nordeste do Brasil. Um espécime de comprovante (número 73.431) é depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil. As folhas foram secas a 28 ° C, trituradas e armazenadas a -20 ° C. Os autores têm autorização (nº 38690) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil para coletar a planta. O acesso foi registrado (AA245C5) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

2.2. Preparação do extrato da folha

As folhas secas (300 g) foram pulverizadas em moedor elétrico (Spolu, Itajobi, Brasil) e o pó foi adicionado ao etanol absoluto na proporção de 2:1 (p/v). A extração foi realizada por 15 dias, sendo o solvente substituído a cada 5 dias. As amostras obtidas a cada 5 dias foram reunidas e o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo (CVC Vacuubrand 3000, Wertheim, Alemanha) sob pressão reduzida. O extrato foi transferido para copos de penicilina de 20 mL, pesado e armazenado em temperatura ambiente até o uso.

2.3. Partição do Extrato

O extrato etanólico seco (0,5 g) foi solubilizado em 6 mL de etanol com o auxílio de um banho ultrassônico (Ultracleaner, Unique, Indaiatuba, Brasil) e, em seguida, foi adicionada água destilada até atingir o volume final de 80 mL. Esta solução hidroalcoólica foi submetida a particionamento líquido-líquido utilizando um funil de separação e 100 mL de solvente por extração. Foram utilizados 500 mL de hexano, 800 mL de diclorometano, 400 mL de acetato de etila e 100 mL de butanol, nesta ordem. As partições (frações) obtidas em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol foram denominadas F₁, F₂, F₃ e F₄, respectivamente. As frações obtidas foram submetidas a evaporação rotativa a uma temperatura de 40 ° C sob pressão reduzida. O volume restante das frações foi transferido para copos de penicilina de 20 mL para secagem total à temperatura ambiente em exaustores. Depois de completamente secos, eles foram armazenados em temperatura ambiente até o uso.

2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras de extrato ou fração (2 mg) foram solubilizadas em 2 mL de metanol e levadas ao banho de ultrassom por 10 minutos para completa solubilização. As fases móveis, agentes cromogênicos e padrões estão listados na Tabela 1. Todos os padrões foram utilizados na concentração de 1 mg/mL. A CCD foi conduzida em placas de sílica gel 60-F₂₅₄ (Macherey-Nagel, Alemanha), que foram desenvolvidas em câmaras após a saturação (15 min) com a fase móvel. Após a eluição, as placas foram secas à temperatura ambiente e observadas através de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e luz visível, pulverizadas com agentes cromogênicos específicos para cada metabolito e depois digitalizadas. A aquisição das imagens e observações UV foi realizada utilizando o sistema de imagem MultiDoc-It modelo 125, com o software UVP (Analytik Jena US LLC, Upland, CA, EUA) e acoplado a uma câmera Rebel T3 (Canon, Ota, Japão).

2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras de extrato ou fração (2 mg) foram solubilizadas em 2 mL de metanol para HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA) e levadas a um banho de ultrassom por 30 minutos para completa solubilização. Padrões de flavonóides (vitexina e rutina, 98%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico, 98% e ácido elágico, 95%; Sigma-Aldrich) foram pesados 10 mg e diluídos em 10 mL de metanol.

Uma alíquota de 500 µL foi transferida para um balão volumétrico (2 mL) e o volume foi completado com água ultrapura (Purelab Classic UV; Elga Labwater, High Wycombe, Reino Unido). Depois disso, as soluções foram passadas por filtros de seringa de PVDF de 0,45 µm.

A análise por CLAE foi realizada no sistema Ultimate 3000 HPLC acoplado a um detector de fotodíodo (DAD) e equipado com um desgaseificador de bomba binária (HPG-3x00RS) e um amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm para detecção de taninos e 350 nm para flavonóides. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i, 5 µm; Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) equipada com pré-coluna (C₁₈; 4 mm x 3,9 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA). As separações foram realizadas a 26 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e metanol (B), ambas acidificadas com ácido trifluoroacético a 0,05% e o fluxo foi ajustado para 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado de acordo com a metodologia de Camaroti et al. (2018): 0–10 min, 5–20% B; 10–13,5 min, 20–25% de B; 13,5 a 20 minutos, 25 a 40% de B; 20-25 minutos, 40-80% de B; 25-30 minutos, 80% de B; 30-34 min, 80-5% B. Os dados foram processados e analisados com o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific).

2.6. Actividade antimicrobiana

2.6.1. Preparação de inóculos

Isolados não resistentes de *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Micrococcus luteus* (F00112), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e isolados resistentes a antibióticos de *S. aureus* (UFPEDA 670) e *P. aeruginosa* (UFPEDA 261) foram obtidos na Coleção de Culturas (WDCM 114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Isolados das bactérias fitopatogênicas *Pectobacterium carotovorum brasiliensis* Uneb 23 (repolho isolado), *Pectobacterium carotovorum carotovorum* Uneb 2 (PJD II), *Pectobacterium* sp. 25 de Uneb (rúcula isolada), *Pectobacterium* sp. Uneb 28 (isolado de alface), *Pectobacterium* sp. Uneb 30 (P. almeida) foram obtidos no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais da Universidade do Estado da Bahia. As leveduras *Candida albicans* (URM

5901), *Candida tropicalis* (URM 6551), *Candida glabrata* (URM 4246) e *Candida krusei* (URM 6391) foram obtidas na coleção de culturas Universidade Recife Micologia, do Departamento de Micologia da UFPE.

As culturas de estoque foram mantidas a -20 °C em caldo Mueller Hinton estéril (bactérias patogênicas humanas), Dextrose Nutritiva de Levedura (bactérias fitopatogênicas) ou Caldo Sabouraud Dextrose (leveduras) com glicerol a 10% (v/v). Para uso nos ensaios, as bactérias foram cultivadas em Mueller Hinton Agar ou Nutrient Yeast Dextrose Agar durante a noite a 37 °C e a densidade da cultura foi ajustada turbidimetricamente a 600 nm (OD_{600}) para 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL em NaCl 0,15 M estéril e subsequentemente diluído para 1×10^6 UFC/mL. As leveduras foram cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar durante a noite a 28 °C e a densidade foi ajustada turbidimetricamente a 600 nm (OD_{600}) para 1×10^4 UFC/mL em solução salina estéril.

2.6.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), bactericida (CMB) e fungicida (CMF)

O ensaio de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar os valores de CMI. Primeiramente, foi realizada uma diluição em série da amostra (extrato ou fração) em 80 µL de água destilada em uma fileira de uma microplaca de 96 poços. Água destilada (80 µL) foi utilizada no controle de crescimento de 100%. Em seguida, foram adicionados 40 µL de Caldo Mueller Hinton, ágar nutritivo de levedura dextrose ou Caldo Sabouraud Dextrose e 80 µL do inóculo de microrganismos. Também foi realizado um controle de esterilidade contendo apenas o meio de cultura. O OD_{600} foi medido no tempo zero e após incubação a 37 °C (bactérias) ou 28 °C (leveduras) por 24 h. A CMI foi determinada como a menor concentração de amostra que foi capaz de promover uma redução de OD_{600} em 50% ou mais em comparação com o controle de crescimento de 100% (Amsterdã, 1996). Para determinar o CMB/CMF, os sobrenadantes de cada poço contendo a amostra na concentração $\geq$ CMI foram esfregados no ágar Mueller Hinton, ágar nutritivo de levedura dextrose ou ágar Sabouraud Dextrose e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C ou 28 °C. O CMB ou CMF correspondeu à menor concentração da amostra que foi capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em comparação com o inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicado e foram realizadas duas experiências independentes.

2.7. Atividade amebicida

Um isolado clínico de *Acanthamoeba castellanii* (queratite amebiana), obtido no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Sergipe, foi mantido em meio PYG (2% (p/v) de peptona, 0,2% (p/v) de extrato de levedura, 1,8 % (p/v) de glicose) à temperatura ambiente. Para a realização do ensaio amebicida, o extrato etanólico e as frações de *S. terebinthifolia* foram solubilizados em meio PYG nas concentrações de 3,9, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500 µg/mL e distribuídos em 96 poços. microplacas estéreis com um volume de 100 µL por poço. Posteriormente, 100 µL de trofozoítos (8×10^4) foram adicionados por log na fase log (48-72 h de cultura) em meio PYG. Cada concentração foi avaliada em triplicado e as experiências foram realizadas duas vezes. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após o tratamento, as placas foram submetidas ao processo de coloração com sulforodamina B, segundo Ortega-Rivas et al. (2016) para avaliar a viabilidade celular. A absorvância a 562 nm foi determinada em um leitor de microplacas Synergy™ H1 (Biotek, Winooski, VE, EUA). A inibição percentual do crescimento, concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀), foi calculada por análise de regressão linear com limites de confiança de 95%.

2.8. Avaliação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo

Trofozoítos na fase de crescimento logarítmico (48 a 72h de cultura) de *A. castellanii* (10^5 células / ml de meio PYG) foram incubados com a fração butanol (F4) de *S. terebinthifolia* na concentração de 35 µg/ml de meio PYG ($1 \times \text{IC}_{50}$) por 24 horas em microplacas microtérteis de 24 poços (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça). Após a incubação, os trofozoítos foram lavados em tampão fosfato-solução salina pH 7,2 e incubados em 2 µl de 100 µg/ml de solução de iodeto de propídio por 10 min no escuro. Em sequência, as células foram mantidas em gelo até a análise citométrica de fluxo usando o citômetro Attune® Acoustic Focusing (Life Technology). Como controle positivo, os trofozoítos foram submetidos a banho-maria (90 °C) por 20 min e não tratados como controle negativo (BORAZJANI et al., 2000). Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região correspondente às células da ameba e analisados pelo programa Attune® Cytometer Software. Os resultados foram expressos como porcentagem de células marcadas em cada teste realizado.

3. Resultados e discussão

Neste estudo, a composição fitoquímica do extrato etanólico e das frações foliares de *Schinus terebinthifolia* foram analisadas pela técnica de CCD e CLAE-DAD, bem como o efeito desses compostos em fungos patogênicos, bactérias patogênicas e fitopatogênicas e no protozoário *Acanthamoeba castellanii*.

A análise fitoquímica do extrato etanólico pela técnica de CCD revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, terpenos, esteróides, cumarinas e açúcares redutores. O processo de particionamento foi realizado com solventes orgânicos com crescente grau de polaridade. E na análise de TCL mostrou que o F1 (hexano) continha apenas esteróides, F2 (diclorometano) e F3 (acetato de etila) continham polifenóis e esteróides, e F4 (butanol) continha polifenóis, flavonóides, terpenos e esteróides. Johann et al. (2007) e El-Massry et al. (2009) relataram a presença de saponinas, flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos no extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia*.

Após essa triagem fitoquímica, o extrato e as frações foram submetidos à análise por CLAE-DAD. A presença de ácido gálico, um tanino hidrolisável com tempo de retenção (Rt) aos 12,21 min, foi detectada nos cromatogramas a 270 nm do extrato etanólico, F2 e F3 (Figura 1A). Outro pico (Rt = 24,3 min) a 270 nm também foi observado no extrato etanólico, com absorção máxima em 216,3 e 273,3 nm, provavelmente correspondendo a um derivado do ácido gálico. O conteúdo de ácido gálico no extrato etanólico, F2 e F3 foi de $0,197 \pm 0,003$, $0,021 \pm 0,002$ e $0,144 \pm 0,003$ g%, respectivamente. Foi relatada a presença de ácido gálico nas folhas de *S. terebinthifolia* (Cavalher-Machado et al., 2008; El-Massry et al., 2009). Galato de etila e galato de metila são dois derivados do ácido gálico que foram identificados nas folhas de *S. terebinthifolia* (Ceruks et al., 2007; Cavalher-Machado et al., 2008).

Além disso, a partir dos espectros de varredura desses picos encontrados nos cromatogramas, os picos não identificados apresentaram o mesmo comprimento de onda de absorção máxima (255,6 e 355,0 nm) e o espectro UV é semelhante ao flavonóide rutina. Além disso, após o processo de particionamento, esses picos também foram observados na fração butanol (F4) e não estavam presentes nas demais frações. O conteúdo de derivados de rutina no extrato etanólico foi de $0,673 \pm 0,100$ g% e em F4 foi de $1,481 \pm 0,31$ g%.

Outros compostos fenólicos que foram identificados no extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolia* foram ácido cafeico, ácido seringa, ácido coumarico, ácido

elágico e catequinas (El-Massry et al., 2009). Queires et al. (2006) relataram a presença de rutina ($R_t = 30,84$ min) na fração de acetato de etila derivada de uma preparação de polifenol de folhas de *S. terebinthifolia*. Outros flavonóides já foram descritos nas folhas de *S. terebinthifolia*, como miricetina, miristil, quercitrina e outros derivados de miricetina e quercitrina (Queires et al., 2006; Ceruks et al., 2007; Farag, 2008).

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados do ensaio antibacteriano usando patógenos humanos. O extrato foi ativo contra todas as bactérias que apresentaram ação bacteriostática mais forte para isolados de *S. aureus* (Tabela 2). Entre as bactérias patogênicas utilizadas neste estudo estavam estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 261 resistentes ao aztreonam; gentamicina; imipenem; ceftazidina; ticarcilina associada ao ácido clavulânico; piperacilina associada ao tazobactam; cefepima, bem como uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina UFPEDA 670. Comparando os dados encontrados com a literatura, o estudo de El-Massry et al. (2009) relataram um efeito bacteriostático de um extrato de folha de *S. terebinthifolia* em *S. aureus* e *P. aeruginosa* com CMI de 0,75 mg/mL para ambas as espécies. Este CMI foi 46,8 e 23,4 vezes superior ao encontrado neste estudo para as linhagens UFPEDA 02 e UFPEDA 670 das espécies de *S. aureus*, mas foi 2,66 e 5,46 vezes menor para as espécies ATCC 27853 e UFPEDA 261 da espécie *P. aeruginosa*. Recentemente, Uliana et al. (2016) relataram, pelo método de microdiluição, uma CMI de 0,5 mg/mL para um extrato etanólico de *S. terebinthifolia* sai de *S. aureus* ATCC 25923, 31,25 vezes maior que o encontrado para a cepa UFPEDA 02 usada em nosso trabalho atual.

A atividade das frações foi então avaliada contra *S. aureus* (Tabela 3). Todas as frações estavam ativas, no entanto, com valores de CMI superiores aos obtidos para o extrato. A atividade bactericida foi detectada para extrato e frações. A atividade mais alta do extrato do que suas frações indica um efeito sinérgico de diferentes compostos. Provavelmente, o ácido gálico não foi o principal responsável pela atividade antibacteriana, pois foi relatado que este composto não mostrou efeito sobre *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando testado a 1 mg/mL pelo método de microdiluição (Lima et al., 2016). Além disso, Chung et al (1993) afirmam que nenhuma zona de inibição foi detectada quando o ácido gálico foi testado em concentrações de até 5 mg/mL em *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e 11 outras cepas patogênicas. Por outro lado, Akiyama et al (2001) encontraram uma CMI de 8 mg/mL para ácido gálico contra 18 cepas de *S. aureus*, de acordo com o método da placa de ágar.

Os derivados da rutina são provavelmente candidatos a participar da atividade antimicrobiana, pois, quando purificados por Singh et al (2008), apresentam CMI de 0,07 mg/mL para *S. aureus* e 0,03 mg/mL para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. No entanto, Ilić et al (2004) mostram que a rutina isolada de *Linum capitatum* não mostrou atividade em *S. aureus*. Além de ter efeito direto sobre diferentes microrganismos, a rutina ainda pode potencializar a ação de outros compostos, pois, como Arima et al (2002), os compostos quercitina e miricetina apresentaram uma redução da CMI de 3 e 2,66 vezes em *S. enteritidis* quando associada à rutina.

A tabela 4 apresenta os resultados do teste antifúngico. O extrato etanólico inibiu o crescimento de todas as espécies, exceto *Candida glabrata*, e a maior atividade foi detectada em *Candida albicans*. Nenhuma atividade fungicida foi detectada. A avaliação da atividade antifúngica das frações em *C. albicans* indicou ação fungistática com valores de CMI superiores aos do extrato (Tabela 5). Este resultado indica uma ação sinérgica entre os compostos do extrato, semelhante à encontrada para a atividade antibacteriana. El-Massry et al. (2009) relataram a ação fungistática de um extrato etanólico de *S. terebinthifolia* contra *C. albicans* com CMI de 0,8 mg/mL, cujo valor é 6,83 maior que o encontrado neste trabalho.

Uliana et al. (2016) relataram uma CMI de 0,75 mg/mL do extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* obtidas pelo método de maceração e a CMI de 0,075 mg/mL para o extrato produzido pelo método de ultrassom em *C. albicans*. Comparativamente, a CIM encontrada neste estudo foi 6,41 vezes menor no método de maceração e 1,56 vezes maior na técnica ultrassonográfica. Os autores atribuíram essa diferença à eficiência dos métodos de extração de diferentes classes de metabólitos, uma vez que o extrato obtido pelo método ultrassônico apresentava um conteúdo flavonóide maior que o dos compostos fenólicos, ocorrendo o inverso na técnica de maceração. Por outro lado, Martinez et al. (1996) relataram que um extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia* em concentrações de até 63 mg/mL não teve efeito inibitório ou fungicida sobre *C. albicans*, valor superior a 500 vezes o CMI encontrado neste estudo.

Além disso, Johann et al (2007) relataram que o extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolia* apresentava um CMI de 125 µg/mL para *C. glabrata* ATCC 2001, 250 µg/mL para *C. krusei* ATCC 20298 e *C. tropicalis* ATCC 750. Os autores não encontraram CMI para *C. albicans* ATCC 18804. O CMI encontrado por Johann et al. foram 7,5 vezes menores para *C. krusei* e *C. tropicalis*, no entanto, neste trabalho, a atividade fungistática foi detectada em *C. albicans* e não em *C. glabrata*.

Para as bactérias fitopatogênicas, foi detectada ação bacteriostática e bactericida do extrato em todos os isolados, sendo a mais sensível a *Pectobacterium* sp. isolado da rúcula (Tabela 6). Para as frações, esse mesmo isolado foi o mais sensível e, neste caso, os valores de CMI foram inferiores aos do extrato para todas as amostras; no entanto, nenhuma ação bactericida foi detectada (Tabela 7). Um estudo de EL-Hefny et al. (2017) mostraram que os extratos acetônico e butanólico de flores de *Callistemon viminalis* e o extrato butanólico de casca de *Eucalyptus camaldulensis* apresentaram valores de CMI de 0,125, 0,250 e 0,016 mg/mL, respectivamente, sobre *P. carotovorum*. Comparativamente, os valores do extrato butanólico foram 1,2 vezes inferiores aos encontrados neste trabalho. No entanto, apenas *Pectobacterium* sp. isolados de rúcula e alface submetidos a frações foliares de *S. terebinthifolia* apresentaram valores de CMI inferiores aos do extrato acetônico e butanólico de flores de *C. viminalis*.

Dentre os extratos e frações das folhas de *S. terebinthifolia* avaliados aqui, apenas a fração butanol apresentou ação amebicida contra os trofozoítos de *A. castellanii*. Após um período de 24 h (Figura 2A), houve uma redução entre 37% e 90,69% na viabilidade celular nos tratamentos de 15,6 a 500 µg/mL. Após um período de 48 h (Figura 2B), houve uma forte redução da viabilidade celular nos tratamentos a 125, 250 e 500 µg/mL. O IC₅₀ foi de 33,72 µg/mL por 24 horas e 38,55 µg/mL por 48 h. Os extratos metanólico e etanólico das folhas de *Olea europaea* apresentaram IC₅₀ de 33,66 e 22,99 µg/mL, respectivamente, em *A. castellanii* após 72 h de exposição (SIFAQUI et al., 2013). Ghazouani et al. (2017) afirmam que extratos de partes aéreas de *Teucrium ramosissimum* obtidos com os solventes hexano, acetato de etila, acetona e etanol inibiram metade da população de trofozoítos de *A. castellanii* com valores superiores a 100 µg/mL em um período que variou de 72 a 144 horas, sendo menos eficaz que as amostras de *S. terebinthifolia*. Estudos adicionais são necessários para identificar os princípios ativos e as possíveis ações sinérgicas dos compostos presentes na fração butanólica, mas possivelmente os derivados da rutina e outros flavonóides presentes na folha são os principais responsáveis pela ação, pois na fração butanólica ocorre um aumento na concentração de derivados de rutina de cerca de 2,2 vezes, além de serem detectados flavonóides.

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática (Figura 3), através de marcação fluorescente com iodeto de propídio (PI), e possíveis alterações no tamanho e complexidade ou granularidade celular (Figura 4) dos trofozoítos de *A. castellanii* submetidos à fração butanólica das folhas de

S. terebinthifolia, na concentração de 35 µg/mL por 24 h. Os dados indicam que o controle (Figura 3A) apresentou baixa internalização do IP (0,067%), revelando boa integridade da membrana plasmática. As amebas submetidas ao banho-maria (Figura 3B) apresentaram uma PI positiva de 94,2%, mostrando que a maioria das amebas apresenta danos à membrana plasmática. Por outro lado, as amebas expostas à fração butanol (Figura 3C) apresentaram 29,9% de marcação IP, indicando que na concentração e durabilidade do teste existem células amebianas com membrana danificada e consequente morte por permeabilidade celular.

A Figura 4 mostra dados sobre o tamanho e granularidade dos trofozoítos do controle e aqueles tratados com a fração butanol. Observou-se no controle (Figura 4A) duas tendências populacionais, suportadas pelo espalhamento de luz, um dos grupos com menor dispersão frontal e maior dispersão lateral representando células menores e mais complexas e outro grupo com maior dispersão frontal e lateral, caracterizando células maiores e com menor granularidade celular. As amebas submetidas ao banho-maria (Figura 4B) apresentaram maior complexidade celular e menor tamanho, devido à exposição ao calor capaz de promover a morte celular. As amebas tratadas com a fração butanólica (Figura 4C) mostraram tendências populacionais semelhantes ao controle, mas a parcela da população equivalente às células controle com tamanhos menores e mais complexos reduziu ainda mais seu tamanho, indicando um possível efeito da fração, além de poder representar aproximadamente 29,9% de IPs positivos, uma vez que é uma ação amebicida clássica para reduzir o tamanho e aumentar as células positivas para IP (Mogoa et al., 2011).

4. Conclusão

O extrato etanólico e suas frações das folhas de *S. terebinthifolia* tiveram efeito inibitório sobre bactérias patogênicas e leveduras humanas. E também foram ativos contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*. A fração butanol do extrato etanólico apresentou ação amebicida em *A. castellanii*. Este estudo contribuiu para a expansão do conhecimento sobre o uso de extratos e frações orgânicas de *S. terebinthifolia* com atividades biológicas em bactérias patogênicas e fitopatogênicas, além do potencial amebicida. É a primeira vez que estudos são realizados analisando os efeitos do extrato e frações de *S. terebinthifolia* em organismos do gênero *Acanthamoeba* e *Pectobacterium*.

Referências

- AKIYAMA, H. et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 48, p. 487-491, 2001.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 66, n, 5, p. 1009-1014, 2002.
- BADAWY, M.E.I.; ABDELGALEIL, S.A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. Industrial Crops and Products, v.52, p. 776-782, 2014.
- BENDAOUD, H. et al. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. J Food Sci. v. 75, p. 466-472, 2010.
- BORAZJANI, R.N. et al. Flow Cytometry for Determination of the Efficacy of Contact Lens Disinfecting Solutions against *Acanthamoeba* spp. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n.3, p. 1057-1061, 2000.
- CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). Industrial Crops & Products, v.116, p. 81-89, 2018.
- CASTRILLÓN, J. C.; OROZCO, L. P. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Rev Chilena Infectol, v. 30, n. 2, p. 147-155, 2013.
- CAVALHER-MACHADO, S.C. et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. International Immunopharmacology, v.8, p.1552-1560, 2008.
- CERUKS, M. Constituintes fenólicos polares de *schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae). Quim. Nova, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.
- CHUNG, K.T. et al. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. Letters in. Applird Microbiology, v. 17, p. 29-32, 1993.
- COMPEAN, K.L.; YNALVEZ, R.A. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. Research Journal of Medicinal Plants, v. 8, p. 204-213, 2014.
- DEGERLI, S. et al. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Experimental Parasitology, v. 131, p. 20-24, 2012.

- EL-HEFNY, M. et al. Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of four phytopathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 348-356, 2017.
- EL-MASSRY, K.F. et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J Agric Food Chem*, v. 57, p. 5265-5270, 2009.
- FARAG, S.F. Polyphenolic compounds from de leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, p. 319-329, 2008.
- GHAZOUANI, N. et al. Essential oil composition and anti *Acanthamoeba* studies of *Teucrium ramosissimum*. *Experimental Parasitology*, v.183, p. 207-211, 2017.
- GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Fitos*, v. 6, n. 1, p. 43-56, 2011.
- GOMES, F.S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J Appl Microbiol*, v.114, n. 3, p. 672-679, 2013.
- HOSSAIN, K. et al. Antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic activity of *Cassia senna* Leaves (Family: Fabaceae). *J. Applied Pharm. Sci.*, v. 2, p. 86-190, 2012.
- ILIĆ, S.B.; KONSTANTINOVIĆ, S.S.; TODOROVIĆ, Z.B. Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum capitatum* kit. *Physics, Chemistry and Technology*, v. 3, n. 1, p. 73-77, 2004.
- JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 632-637, 2007.
- KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 564–595, 2006.
- LIMA, V.N. et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*, v. 99, p. 56-61, 2016.
- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*, v.16. p. 273-307, 2003.
- MARTINEZ, M.J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, v. 52, p. 171-174, 1996.

- MOGOA, E. et al. Cellular Response of the Amoeba *Acanthamoeba castellanii* to Chlorine, Chlorine Dioxide, and Monochloramine Treatments. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, n.4, p. 4974-4980, 2011.
- NASCIMENTO, A.F et al. Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. *Nat. Prod. Commun*, v. 7, n. 1, p. 129-132, 2012.
- ORTEGA-RIVAS, A. et al. *Acanthamoeba castellanii*: A new high-throughput method for drug screening in vitro. *Acta Tropica*, v. 164, p. 95-99, 2016.
- PÉREZ-COTA, F. et al. New insights into the mechanical properties of *Acanthamoeba castellanii* cysts as revealed by phonon microscopy. *Biomedical Optics Express*, v. 10, n. 5, p. 2399-2408, 2019.
- PROCÓPIO, T.F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. 1-19, 2015.
- QUEIRES, L.C. et al. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Research*, v. 26, p. 379-87, 2006.
- RIFFEL, A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Braz. J. Med. Biol. Res*, v. 35, p. 811-818, 2002.
- SCHEID, P., et al. An extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp. isolated from a patient with keratitis. *Parasitol Res*, v. 102, n. 5, p. 945-950, 2008.
- SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 6, p. 1-13, 2012.
- SIFAOU, I. et al. Activity assessment of Tunisian olive leaf extracts against the trophozoite stage of *Acanthamoeba*. *Parasitol Res*, v. 112, p.2825-2829, 2013.
- SINGH, M. et al., Antimicrobial Flavonoid Rutin from *Pteris Vittata* L. Against Pathogenic Gastrointestinal Microflora. *American Fern Journal*, v. 98, n. 2, p. 98-103, 2008.
- TURNER, N. A. et al. Resistance, biguanide sorption and biguanide induced pentose leakage during encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Microbiol*, v. 96, n. 6, p. 1287-95, 2004.
- TURNER, N. A. et al. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol*, V.89, p. 751-759, 2000.

- ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Industrial Crops and Products*, v. 83, p. 235-240, 2016.
- VISVESVARA, G.S.; Moura, H.; Schuster, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 50, p. 1-26, 2007.

Tabela 1 – Fase móvel, agentes cromogênicos e padrões utilizados na análise fitoquímica da cromatografia em camada delgada (CCD).

Classes	Fase móvel	Agentes cromogênicos	Padrões
Polifenóis (taninos hidrolisáveis)			Ácido gálico e ácido elágico (Sigma [®])
Derivados cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ácido cafeico e ácido clorogênico (Sigma [®])
Flavonóides			Quercetina e Rutina (Sigma [®])
Taninos condensados		Vanilina clorídrica	Catequina (Sigma [®])
Terpenos e Esteróides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β-sitosterol (Sigma [®])
Saponinas	100:11:11:26		Escin (Sigma [®])
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina (Phytolab [®])
Açúcares redutores	50:20:10:10	Thymol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-fructose (Chromadex [®])
Alcaloides	50:6.75:5	Dragendorff	Nitrato de pilocarpina (Sigma [®])
Antraquinonas		HNO ₃ + KOH 10%	Sennoside A (Sigma [®])

Sistemas: 90: 5: 5 - acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 - tolueno: acetato; 50:50:50 - éter etílico: acetato de etilo: ácido acético a 10% (saturação); 100: 11: 11: 26 - acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50: 20: 10: 10 - acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50: 6,75: 5 - acetato de etilo; metanol; água. NEU: reagente de Neu (2-aminoetildifenilborinato). PEG: polietileno glicol; HNO₃: ácido nítrico; KOH: hidróxido de potássio; H₂SO₄: ácido sulfúrico; Δ: aquecimento.

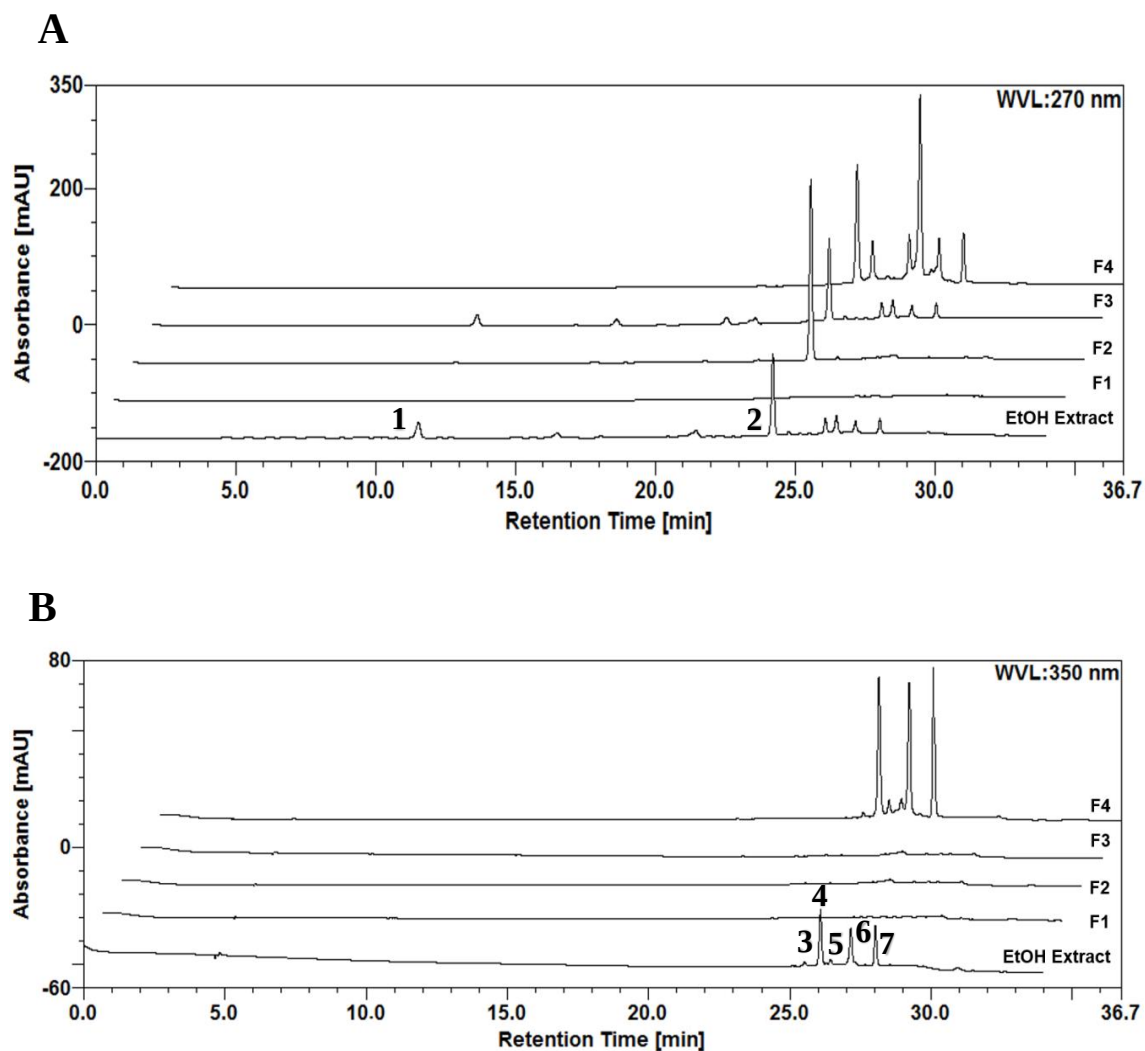


Figura 1 – Espectros de varredura do cromatograma de extrato etanólico e frações (F1-F4) de folhas de *S. terebinthifolia*. (A) Cromatograma com leitura em 270 nm. O pico 1 (Rt = 12, 21 min) é indicativo da presença de ácido gálico e o pico 2 (Rt = 24, 3 min) de seus derivados. (B) Cromatograma com leitura a 350 nm. Picos entre 3 e 7 (Rt = 26 e 28 min) são indicativos da rutina e seus derivados.

Tabela 2 – Atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolia*.

Bactéria	Extrato etanólico	
	CMI ₅₀ ^a	CMB ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 396 (-)	1.562	50.0
<i>Micrococcus luteus</i> F00112 (+)	0.195	25.0
<i>Salmonella enteritidis</i> UFPEDA 414 (-)	1.562	25.0
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02 (+)	0.016	0.52
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 670 (+)	0.032	4.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (-)	2.000	4.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 261 (-)	4.160	4.20

^aCMI (concentração mínima inibitória) e ^bCMB (concentração mínima bactericida).

Valores expressos em mg/mL. (-) gram negativo. (+) gram-positivo.

Tabela 3 – Atividade antibacteriana de frações (F₁-F₄) de folhas de *S. terebinthifolia* em *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e UFPEDA 670.

Frações	CMI ₅₀ ^a		CMB ^b	
	02	670	02	670
F ₁	0.118	0.475	3.80	3.80
F ₂	0.182	0.365	2.92	5.84
F ₃	0.450	0.450	3.60	7.20
F ₄	0.118	0.950	7.60	7.60

^aCMI (concentração mínima inibitória) e ^bCMB (concentração mínima bactericida). Frações do extrato etanólico obtidas por partição com hexano (F₁), diclorometano (F₂), acetato de etila (F₃) e butanol (F₄). Valores expressos em mg/mL.

Tabela 4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico de *S. terebinthifolia* sai em fungos do gênero *Candida*.

Fungos	CMI ₅₀ ^a
<i>Candida albicans</i> URM 5901	0.117
<i>Candida tropicalis</i> URM 6551	1.875
<i>Candida glabrata</i> URM 426	ND
<i>Candida krusei</i> URM 6391	1.875

^aCMI (concentração mínima inibitória). Valores expressos em mg/mL. ND: não detectado.

Tabela 5 – Atividade antifúngica das frações (F₁-F₄) de folhas de *S. terebinthifolia* em *Candida albicans* URM 5901.

Partições	CMI ₅₀ ^a
F ₁	0.6
F ₂	0.6
F ₃	0.6
F ₄	ND

^aCMI (concentração mínima inibitória). Frações do extrato etanólico obtidas por partição com hexano (F₁), diclorometano (F₂), acetato de etila (F₃) e butanol (F₄). Valores expressos em mg/mL. ND: não detectado.

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S. terebinthifolia* em bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*.

Bactéria	Extrato Etanólico	
	CMI ₅₀ ^a	CMB ^b
<i>Pectobacterium carotovorum brasiliensis</i> Uneb 23 ^c	0.300	0.600
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i> Uneb 2 ^d	0.300	0.600
<i>Pectobacterium</i> sp. Uneb 25 ^e	0.075	0.300
<i>Pectobacterium</i> sp. Uneb 28 ^f	0.300	0.600
<i>Pectobacterium</i> sp. Uneb 30 ^g	0.150	0.300

^aCMI (concentração mínima inibitória) e ^bCMB (concentração mínima bactericida). ^c extraído do repolho; ^d PJD II; ^e rúcula; ^f alface; ^g pimentas. Valores expressos em mg/mL.

Tabela 7 – Atividade antimicrobiana das frações (F₁-F₄) de *S. terebinthifolia* em bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*.

Bactéria	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
	CMI ₅₀ ^a	CMI ₅₀	CMI ₅₀	CMI ₅₀
<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>brasiliensis</i> UNEB 23 ^b	0.300	0.300	0.300	0.300
<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>carotovorum</i> UNEB 2 ^c	0.300	0.300	0.150	0.300
<i>Pectobacterium</i> sp. UNEB 25 ^d	0.037	0.037	0.037	0.037
<i>Pectobacterium</i> sp. UNEB 28 ^e	0.075	0.075	0.075	0.075
<i>Pectobacterium</i> sp. UNEB 30 ^f	0.300	0.300	0.150	0.150

^aCMI (concentração mínima inibitória). ^b extraído do repolho; ^c PJD II; ^d rúcula; ^e alface; ^f pimentos. Valores expressos em mg/mL.

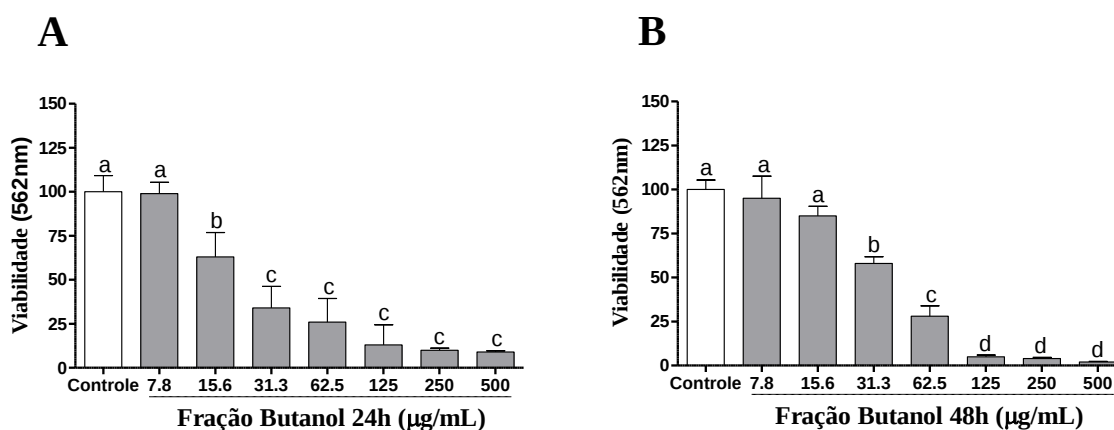


Figura 2 – Efeitos in vitro da fração butanol de *S. terebinthifolia* sobre a viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (8×10^4 células/mL) submetidos ao período de 24 h (A) e ao período de 48 h (B) analisados no espectrofotômetro a 562 nm, através do teste de sulforodamina B. A viabilidade foi expressa como média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância de seis experimentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Análise de duas experiências independentes em triplicata.

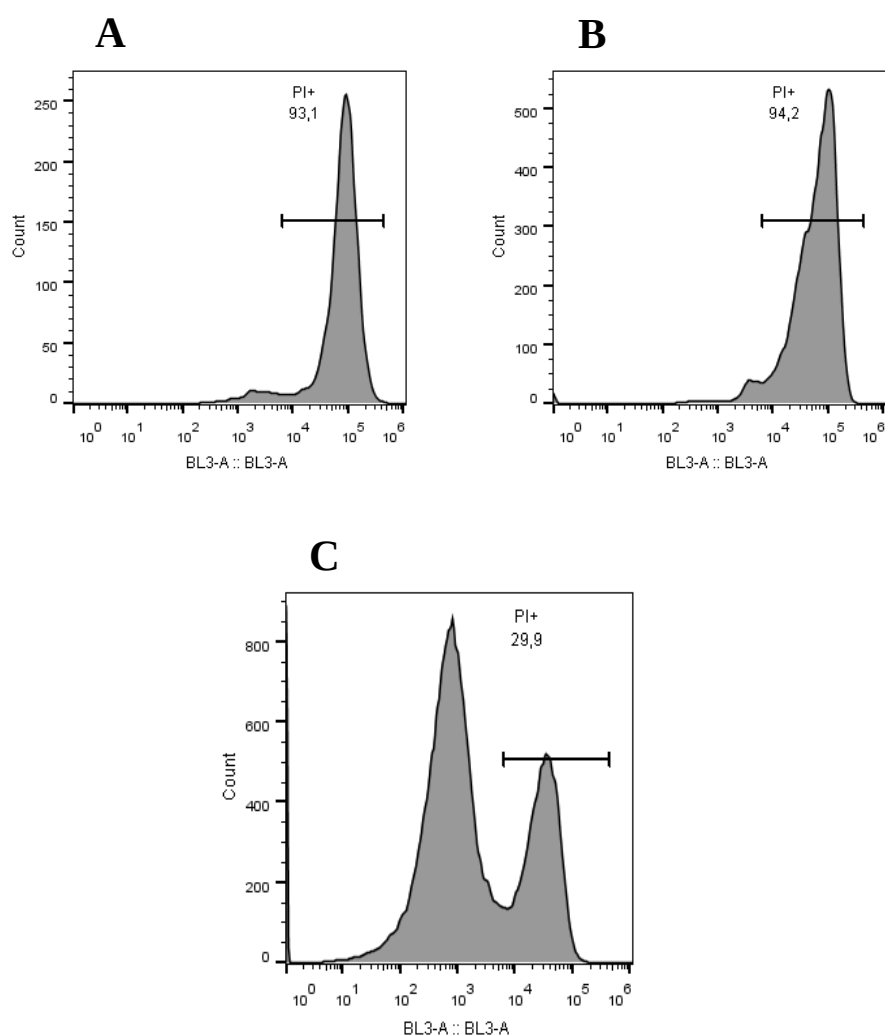


Figura 3 – Histograma do efeito sobre a viabilidade celular de trofozoítos de *A. castellanii* (1×10^5 células/mL) submetidos ao tratamento com a fração butanol de *S. terebinthifolia* sai após 24 h, corado com iodeto de propídio (PI). O gráfico Count vs. BL3-A (640 nm) indica a integridade das células da membrana do controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria (90 °C / 20 min) (B), tratamento com F_4 na concentração de 33,72 $\mu\text{g/mL}$ (C).

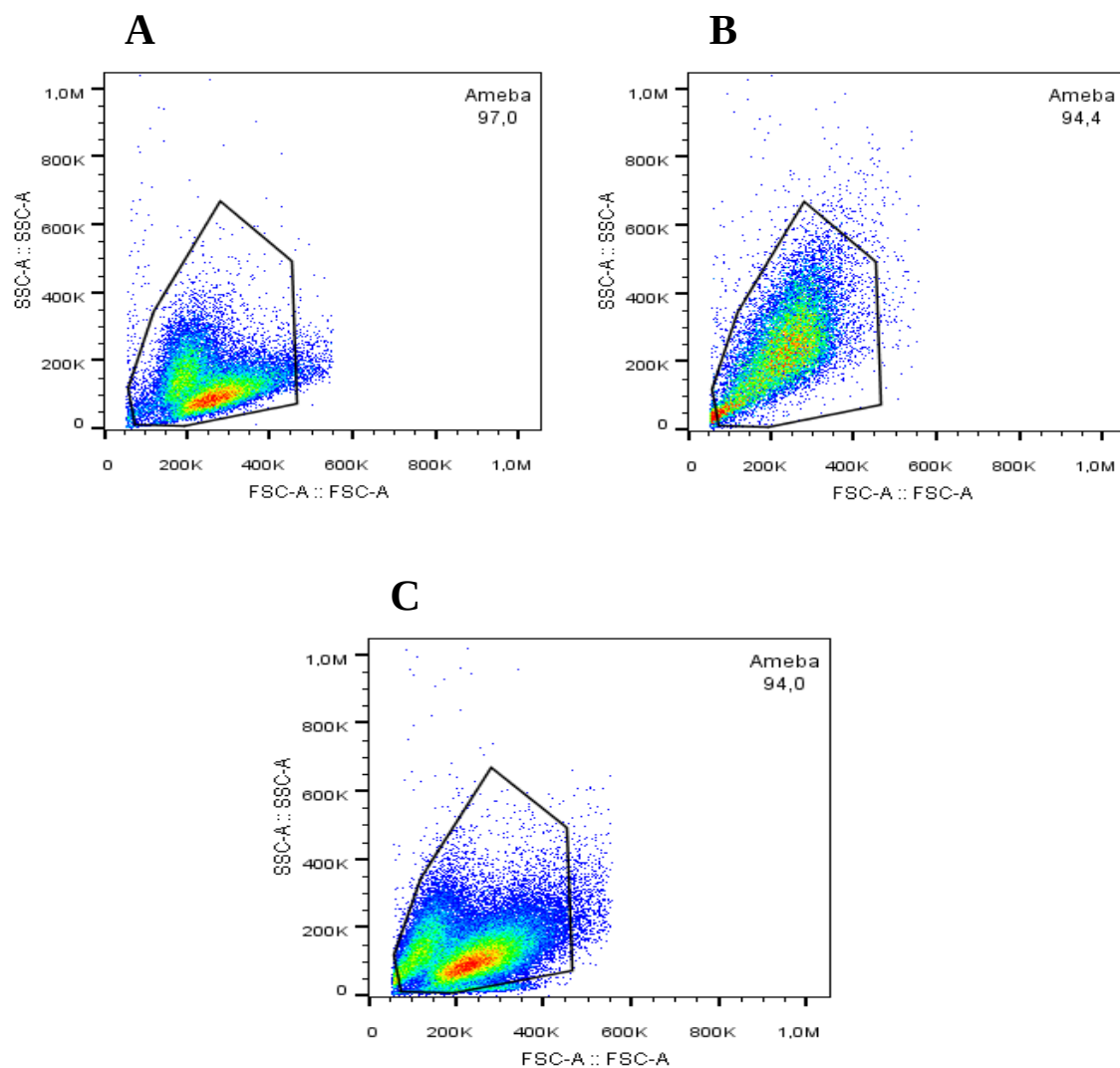


Figura 4 – Efeito da fração butanol de folhas de *S. terebinthifolia* no tamanho celular (FSC - Forward Scatter) e granularidade ou complexidade celular (SSC - Side Scatter) de trofozoítos de *A. castellanii*, caracterizados nos gráficos SSC versus FSC. Células controle (A), células mortas submetidas ao banho-maria (90 °C / 20 min) (B), tratamento com F_4 na concentração de 33,72 $\mu\text{g/mL}$ (C) foram evidenciadas.

4 CONCLUSÃO

O extrato e a fração proteica extraída das sementes de *M. oleifera* apresentaram ação amebicida sobre os trofozoítos de *A. castellanii* de forma dose-dependente, além de promoverem danos na membrana plasmática. É importante ressaltar que, o mesmo extrato e fração proteica também demonstraram uma ampla atividade esquistossomicida sobre os casais de vermes adultos de *S. mansoni*, desacasalando-os, alterando seus padrões de motilidade, além de ocasionar sua mortalidade e reduzir a viabilidade celular.

O efeito inibitório sobre as bactérias e as leveduras patogênicas ao homem, bem como a ação inibitória e bactericida sobre diferentes bactérias do gênero *Pectobacterium*, foram evidenciados no extrato e nas frações de folhas de *S. terebinthifolia*. Ademais, a fração butanólica de folhas de *S. terebinthifolia* também apresentou ação amebicida sobre a ameba *A. castellanii*.

Dessa forma, as espécies *M. oleifera* e *S. terebinthifolia* foram promissoras no combate aos organismos patogênicos e fitopatogênicos estudados, abrindo caminho para outros estudos mais aprofundados.

REFERÊNCIAS

- AGRA-NETO, A.C. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitol Res**, v.113, p. 175–184, 2014.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathol.** 4 ed, New York: Academic Press, 1996. 635p.
- ALANGADEN, G.J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infect Dis Clin North Am**, v. 25, p. 201-225, 2011.
- ALMEIDA, I.M.G. Bactérias fitopatogênicas exóticas, **Biológico**, v.63, n.1/2, p.45-47, 2001.
- ALVARENGA, L. S.; DE FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 2, p. 155–159, 2000.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 10-15. 2001.
- AMORIM, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, p. 95-102, 2003.
- ARABSHAHI, D.S.; DEVI, D.V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chem**, v.100, n. 3, p.1100-1105, 2007.
- ARANCE-GIL, A. *et al.* Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. **Contact Lens Anterior Eye**, v. 13, n. 1, p. 313–315, 2013.
- ARAÚJO, L.C.C. *et al.* Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS One**, v.8, n. 12, p. 1-15, 2013.
- ARAÚJO, R.M.S. *et al.* *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Sci**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARNAUD, D.; DESCLOS-THEVENIAU, M.; ZIMMERLI, L. Disease resistance to *Pectobacterium carotovorum* is negatively modulated by the Arabidopsis Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5. **Plant Signal Behav**, v. 7, n. 9, p. 1070-1072, 2012.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Adv**, v. 5, p. 27540–27557, 2015.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. 2 ed, São Paulo: Missionária “A verdade presente”, 1956. 440p.

- BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Sci**, v.161, n. 5, p. 1025-1033, 2001.
- BARBOSA, F.S. **Tópicos em malacologia médica** [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. 314p.
- BARROSO, G.M. *et al.* **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v.2, 1 ed. Minas Gerais: Ed. Imprensa Universitária, 1991. 377p.
- BARY, A. de. **Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen, und Bacterien**. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1884. 558p.
- BENDAOUD, H. *et al.* Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 466–472, 2010.
- BENNETT, J.L. *et al.* The development of resistance to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. **Exp Parasitol**, v. 87, n. 3, p. 260-267, 1997.
- BERCHIERI JR, A. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri Jr.A, Macari M. (Eds). **Doenças das aves**. Facta, Campinas, 2000, p. 185-196.
- BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol**, v.18, n. 7, p. 309-314, 2002.
- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237–245, 2017.
- BEZERRA, A.M.E. *et al.* Avaliação da qualidade das sementes de *Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento. **Ciências Agrotec, Lavras**, v. 28, n. 6, p. 1240-1246, 2004a.
- BHATIA, S., OTHMAN, Z., AHMAD, A. L. Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant. **J Hazard Mater**, v. 145, n. 1-2, p. 120–126, 2007.
- BLOCH, K. C.; SCHUSTER, F. L. Inability to make a pre mortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal *Granulomatous amebicencephalitis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 3003–3006, 2005.
- BOISSIER, J.; MORAND, S.; MONE, H. A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. **Parasitol**, 119: 447-454, 1999.
- BORIO, E.B.L.; CECY, C.; YASUMOTO, Y. Pharmacognostic study of the bark of *Schinus terebinthifolius* (Raddi – Anacardiaceae). **Cien Cult**, v.25, n.7, p.631-634, 1973.

BOSE, K.; GHOSH D.K.; BHATTACHARY, A. Membrane of and naegleria by fluorescein-conjugated lectins. **International journal for parasitology**, v. 19, n. I, p. 737–741, 1989.

BRASIL. DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. **Sistema Tabnet**: Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE). Acesso em: 1 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8. ed. rev. Brasília, 2010. 444p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Educação em saúde para o controle da esquistossomose**. Brasília, 2018. 40p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3 ed. Brasília, 2019. 740p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Mapa da esquistossomose**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/jpg/2016/julho/08/mapadistribucaoesquistossomose.jpg>. Acesso em: 1 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da esquistossomose – dados**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-az/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 1 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016**. v. 49, n. 49, p. 1-15, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília, 2014. 144p.

BROOKS, G.F. *et al.* **Jawetz Melnick & Adelbergs medical microbiology**. 24 ed, New York: McGraw-Hill, 2007. 864p.

BROOKS, G.F. *et al.* Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg [recurso eletrônico] / Geo. F. Brooks ... [et al.]; [tradução: Cláudio M. Rocha-de-Souza; revisão técnica: José Procópio Moreno Senna]. - 26. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: AMGH, 2014.

BUNK, B. *et al.* A short story about a big magic bug. **Bioeng. Bugs**, v. 1 n. 2, p. 85–91, 2010.

CACERES, A. *et al.* Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*: 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **J Ethnopharmacol**, v. 36, n. 3, p. 233-237, 1992.

CACERES, A. *et al.* Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 33, n. 3, p. 213-216, 1991.

- CAMPELO, Y. *et al.* Structure–Activity Relationship of Piplartine and Synthetic Analogues against *Schistosoma mansoni* and Cytotoxicity to Mammalian Cells. **Int J Mol Sci**, v. 19, p. 1-17, 2018.
- CARLESSO, A.M. *et al.* Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 3, p. 316-320, 2007.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 5, p. 692–698, 2010.
- CARVALHO, A. de S. *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **Int J Biol Macromol**, v.75, p. 402-408, 2015.
- CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. 1124 p.
- CASTANHEIRA, L. *et al.* Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **Int J Biol Macromol**, v. 74, p. 568-574, 2015.
- CASTILHO-JUAREZ, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **J Etnopharmacol**, v. 114, n. 1, p. 72-77, 2007.
- CAVADA, B.S. *et al.* Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochem**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.
- CAVALHER-MACHADO, S. C. *et al.* The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1552–60, 2008.
- CHASE, M.W.; REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Bot J Linn Soc**, v. 161, p.122–127, 2009.
- CHEN, C. H. *et al.* Characterisation of the β -lactam resistance enzyme in *Acanthamoeba castellanii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 2, 2020.
- CHIA, Y. *et al.* Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. **Molecules**, v. 15, p. 8377-8389, 2010.

- CHIKALOVETS, I.V. *et al.* A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 42, n. 2, p. 503-507, 2015.
- CHIRINO, M.; CARIACY, M.; FERRERO, A.A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepdoptera: Tortricidae). **Boletín de Sanidad Vegetal Pragas**, v. 27, p. 305-314, 2001.
- CHUANG, P.H. *et al.* Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresour Technol**, v. 98, n. 1, p. 232-236, 2007.
- CHUMARK, P.K. *et al.* Regulation of mRNA level of low-density lipoprotein receptors in hep g2 cells treated with water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Atherosclerosis Supp**, v. 13, n. 2, p.10, 2009. paginas
- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 402p.
- CLARKE, N.A.; COWLES, PB. Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of *Bacillus megaterium* II. **J Bacteriol**, v. 63, n. 2, p. 177-186, 1952.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric**, v. 79, p. 362-372, 1999.
- COELHO, J.S. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegyti* larvae. **Chemosphere**, v.77, n. 7, p. 934-938, 2009.
- COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem Anal**, v. 11, p. 295-300, 2000.
- COELHO, M.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp Biochem Physiol C, Toxicol Pharmacol**, v. 146, n. 3, p. 406-414, 2007.
- COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annu Rev Phytopathol**, v. 24, p. 383-409, 1986.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- CORDEIRO, C.K. *et al.* **Otimização dos tempos de mistura e decantação no processo de coagulação/floculação da água bruta por meio da *Moringa oleifera* Lam.** Acta Scientiarum Technology, Brasil, 2008. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/in dex.php/ActaSciTechnol/article/view/5493/5493>. Acesso em: 02 jul. 2017.

- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytother Res**, v.15, n. 3, p.183-205, 2001.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v. 1. 1926. 747p.
- CORREA, S.A.P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of six artemisinin derivatives against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, 2019.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. v. 34, 2 ed. New York: Columbia University Press, 1981.1262p.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T., LEWIS, N. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONEAS, R. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 2000. cap. 24, p. 1250 -1268.
- CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 63-66, 2003.
- DALLA ROSA, K.R. **Moringa oleifera: a perfect tree for home gardens**. Hawaii: NFTA, Agroforestry Species Highlights, 1993. 2p.
- DALL'AGNOL, R. *et al.* Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.
- DAMASCENO-SÁ, J.C.; SILVA, J.C. Evolução e aspectos do sistema digestório em Hemiptera. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 32-40, 2007.
- DANGI, S.Y., JOLLY, C.I., NARAYANA, S. Antihypertensive activity of the total alkaloids from the leaves of *Moringa oleifera*. **Pharm Biol**, v. 40, p. 144-148, 2002.
- DANGUY, A. *et al.* Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anat**, v. 161, n. 1-4, p. 206-218, 1998.
- DE BARY, A. **Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen, und Bakterien**. Leipzig: Engelmann, 1884. 590p.
- DE SOUZA, F.P.C. *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n.4, p. 300-7, 2011.
- DE, P. *et al.* Cinnamic derivatives in tuberculosis. In: CARDONA, P.-J. (Ed.) **Understanding Tuberculosis-New Approaches to Fighting against Drug Resistance**, InTech Publishing: Rijeka, Croatia, 2012; cap. 15. paginas
- DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.
- DESPRÈS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; E MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence of recent introduction of

Schistosoma mansoni into America. **Mol Bioquem Parasitol** v.60, n. 2, p. 221-229, 1993.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2 ed, London: John Wiley & Sons, 2002, 517p.

DI STASI, L.C. Amoebicidal compounds from medicinal plants. **Parasitologia**, v. 37, p. 29-39, 1995.

DOENHOFF, M. J. *et al.* Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans R Soc Trop Méd**, v. 96, p. 465-469, 2002.

DOENHOFF, M. J.; KIMANI, G.; CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. **Parasitol Today**, v. 16, p. 364-366, 2000.

DOENHOFF, M.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Chem Biol**, v. 21, p. 659-667, 2008.

DORSEY, C. H. *et al.* Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v. 33, p. 279-323, 2002.

DUDLEY, R.; JARROLL, E. L.; AHMED, N. Experimental Parasitology Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 338-343, 2009.

EL-MASSRY, K.F. *et al.* Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. **J Chromatogr A**, v. 720, n. 1-2, p. 251-261, 1996.

ENGELS, D. *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop**, v. 82, n. 2, p. 139-146, 2002.

FAGUNDES, R.P.; FEILSTRECKER, S.; MARIATH, J.E.A.; OLIVEIRA, J.M.S. Aspectos da fecundação e embriogênese inicial em *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 873-875, 2007.

FAIZI, S. *et al.* Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. **Planta Med**, v. 64, n. 3, p. 225-228, 1998.

FAIZI, S. *et al.* Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard iol glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. **J Nat Prod**, v.57, n. 9, p.1256-1261, 1994.

FAIZI, S. *et al.* Novel hypotensive agents, niazimin A, niazimin B, niazicin A and niazicin B from *Moringa oleifera*: Isolation of first naturally occurring carbamates. **J Chem Soc Perkin Trans I**, n. 20, p. 3035-3640, 1994.

- FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.
- FENWICH, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, p. 577-582, 2006.
- FERREIRA, R.S. *et al.* “Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*”. **Lett Appl Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 186-192, 2011.
- FERRERO, A.A. *et al.* Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. **Fitoterapia**, v.78, n. 4, p. 311-314, 2007.
- FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.
- FIRMO, W. C. A. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 12, n. 2, p. 119–131, 2011.
- FISCHER, E. Synthesis of depsides, lichen-substances and tannins. **J Am Chem Soc**, v. 36, p. 1170-1201, 1914.
- FITCHES, E. *et al.* *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **J Insect Physiol**, v. 47, n. 7, p. 777-787, 2001.
- FLEIG, M.; KLEIN, R.M. Anacardiáceas. In: REITZ P (Ed). **Flora ilustrada catarinense**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1989. 64p.
- FOSTER, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 430-449, 2017.
- FRASSINETTI, S. *et al.* Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 70, n. 1, p. 35-41, 2015.
- FREIRE, M.G.M. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol Biochem**, v. 40, p. 61-68, 2002.
- FREITAS, J.H.E.S. *et al.* Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein Pept Lett**, v. 23, n. 7, p. 645 – 649, 2016b.
- FREITAS, J.H.E.S. *et al.* Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p.133-141, 2016a.

- FUKUDA, E. K. *et al.* Fungal cell wall polysaccharides: Purification and characterization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117–134, 2009.
- FUNK, P.E.; THOMPSON. Identification of a lectin that induces cell death in developing chicken B cells. **Cell Immunol**, v.186, n.1, p. 75-81, 1998.
- GAMA, M.A.S. *et al.* **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**, Recife: EDUFRPE, 2016. 308 p.
- GASPARINI, E.; PORTELLA, R. **Manual de parasitoses intestinais**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2004. 189 p.
- GHAZOUANI, N. *et al.* Essential Oil Composition and anti *Acanthamoeba* Studies of *Teucrium ramosissimum*. **Experim Parasitol**, 2017.
- GHEBREMICHAEL, K.A. *et al.* A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Res**, v. 39, n. 11, p. 2338-2344, 2005.
- GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 6, n. 1, p. 43–56, 2011.
- GOLDMAN, E. GREEN, L.H. **Practical Handbook of Microbiology**. 3 ed. CRC Press, 2015. 1055p.
- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 3280p.
- GOLDSTEIN, I.J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, v.285, n. 5760, p. 66-69, 1980.
- GOMES, F.O.S. *et al.* Isolation and Antimicrobial Activity of Lectin from *Schinus terebinthifolius* Leaves. **J Biotechnol**, v. 150, p. 453-453, 2010.
- GOMES, F.S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J Appl Microbiol**, v.114, n. 3, p. 672-679, 2013.
- GOMES, F.S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J Appl Microbiol**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.
- GOMES, F.S. *et al.* Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. **Adv Res**, v. 2, p. 250-265, 2014.
- GONZÁLEZ, G.E. *et al.* Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Int J Cardiol**, v. 176, n. 3, p. 1423-1425, 2014.
- GORDTS, S.C. *et al.* NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 6, p. 1674-1685, 2015.

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego: Academic Press. 1992. 342p.

GRABE, K; HAAS, W. Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. **Parasitol Res**, v. 93, p. 111-113, 2004.

GRAHAM, D.C. *et al.* Survival of strains of soft rot coliform bacteria on microbeads exposed in the laboratory and in the open air. **J Appl Bacteriol**, v. 46, p. 367-376, 1979.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 413-433, 2004.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p.1106-1118, 2006.

GUARALDO, A.M.A. *et al.* Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d'orbigny, 1835). **Rev Saude publ**, v. 15, p. 436-438, 1981.

GUARRO, J.; RAJENDRAN, C. Comments on recent human infections caused by ascomycetes. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 349-350, 1998.

GUEVARA A.P. *et al.* An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutat Res**, v. 440, n. 2, p. 181-188, 1999.

GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUPTA, R. *et al.* Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 20, n.3, p.456-464, 2005.

GUZMAN, J.D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

HAAS, W. *et al.* *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. **Exp Parasitol**, v. 120, n. 1, 94-97, 2008.

HAAS, W.; HAEBERLEIN, S. Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. **Parasitol Res**, v. 105, n. 4, p. 1061-1066, 2009.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HAMZA, T. A.; AZMACH, N. H. The miraculous moringa trees: From nutritional and medicinal point of views in tropical regions. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 5, n. 4, p. 151-162, 2017.

HAN, Z.G. *et al.* Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 10, p. 211-240, 2009.

HANSEN, D.S.; GOTTSCHAUF, A.; KOLMOS, H.J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: A case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **J Hosp Infect**, v. 38, n. 2, p. 119-132, 1998.

HAYUNGA, E.G.; SUMMER, M.P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **J Parasitol**, v. 72, n. 2, p. 283-291, 1986.

HEBEDA, R.E., STYRLUND, C.R., TEAGUE, W.M., 1988. Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. **Starch**, v. 40, p. 33-36, 1988.

HEGEDUS, D.D. *et al.* Peritrophic matrix synthesis, architecture and function: new insights. **Annu Rev Entomol**, v. 54, p. 285-302, 2009.

HELDT, H.W.; PIECHULLA, B. **Plant Biochemistry**. 3.ed. California: Elsevier Academic Press, 2005. 630p.

HERNANDEZ-HERRERO, J.A.; FRUTOS, M.J. Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices. **Food Chem**, v. 173, p. 495-500, 2015.

HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Curr Opin Plant Biol**, v. 2, n. 4, p. 320-326, 1999.

HOLT, J.C. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed, Baltimore. Williams & Wilkins. 1994. 787p.

HOUNSOME, N. *et al.* Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 48-65, 2008.

HYUN, M.W. *et al.* Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, 257-65, 2011.

IMBERT-BOUYER, S. *et al.* A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 207-211, 2004.

INCANDELA, L. *et al.* Treatment of diabetic microangiopathy and edema with HR (Paroven, Venoruton; 0-(β -hydroxyethyl)-rutosides): A prospective, placebo-controlled, randomized study. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 7, p. 11-15, 2002.

ISIDRO, R. *et al.* Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Rev Fac Agron**, v. 27, p. 77-89, 2001.

JAVED, H. *et al.* Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 17, p. 340-352, 2012.

JENKE-KODAMA, H.; MULLER, R.; DITTMANN, E. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. **Prog Drug Res**, v.65, n. 119, p. 121-140, 2008.

JIN, L. *et al.* A Designed Tryptophan- and Lysine/Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with Therapeutic Potential for Clinical Antibiotic-Resistant *Candida albicans* Vaginitis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1791–1799, 2016.

JOHANN, S. *et al.* Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 2–7, 2010.

JONES, D. Biology of Brazilian pepper. In: CHAIRMAN, D. C. **Brazilian pepper management plan for Florida**. Florida: Florida Exotic Pest Plant Council, 1997. Páginas

JORGE, L.I.F.; MARKMANN, B.E.O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Rev Ciên Farm**, v. 17, p. 139-45, 1996.

JUDD, W.S. *et al.* **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 576p.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J Immunol Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.

KAWAGISHI, H.I. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisiosii*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J.F. *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr Polym**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KHACHATOURIANS, G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association**, v. 159, n. 9, p. 1129–1136, 1998.

KHAN, N. A. **Acanthamoeba**. 2. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2015.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 564–595, 2006.

KHAN, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microb Pathog**, v. 34, p. 277–285, 2003.

KHUNKITTI, W. *et al.* Effects of biocides on *Acanthamoeba castellanii* as measured by flow cytometry and plaque assay. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, p. 227–233, 1998.

KIM, H. Y. *et al.* Protective effects of rutin through regulation of vascular endothelial growth factor in allergic rhinitis. **Am J of Rhinol Allergy**, v. 29, p. 87-94, 2015.

KIM, Y. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1052-1055, 2007.

KING, C.H.; DICKMAN, K.; TISCH, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p.1561-1569, 2005.

KO, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **CSH Perspect Med**, v. 5, p. 1–22, 2015.

KOH, K.H.; THAM, F.-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 44, n. 2, p. 144-148, 2011.

KUBO, I. *et al.* Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorgan Med Chem**, v. 11, p. 573-580, 2003.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K.I. Antifungal activity of octyl gallate: Structural criteria and mode of action. **Bioorgan Med Chem**, v. 11, p. 347-350, 2001.

KUMARI, P. *et al.* Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. **Int J Miner Process**, v. 78, p. 131-139, 2006.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311–320, 2004.

KUNZ, W. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends Parasitology**, v. 17, p. 227-231, 2001.

KWON, S.W. *et al.* Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequence. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 4, p. 1061-1067, 1997.

KWON, S.W. *et al.* Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* species using the 16s-23s rRNA intergenic spacer regions. **Plant Pathol J**, v. 16, n. 2, p. 98- 104. 2000.

LA CASA, C. *et al.* Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 45-53, 2000.

LALAS, S.; TSAKINS, J. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety “Periyakulam 1”. **J Food Compost Anal**, v. 15, n. 1, p. 65- 77, 2002.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LAN, R.; REEVES, P.R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 5, p. 996-1005, 2009.

LAPEYRE, C. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of pharmacological properties of cinnamic derivatives as antiatherogenic agents. **J Med Chem**, v. 48, n. 26, p. 8115-8124, 2005.

LEE, E. R.; KANG, G. H.; CHO, S. G. Effect of flavonoids on human health: Old subjects but new challenges. **Recent Pat Biotechnol**, v. 1, p. 139-150, 2007.

LEE, Y. J.; JEUNE, K. H. The effect of rutin on antioxidant and antiinflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Appl Microsc**, v. 43, p. 54-64, 2013.

LEITE, J.F.M. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3277-3290, 2012.

LIANG, C.Z. *et al.* Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. **Cancer Biother Radio**, v. 27, p. 701-710, 2012.

LIEBL. W.; KLOOS, W.E.; LUDWIG, W. Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. **Microbiology**, v. 148, p. 2479-87, 2002.

LIMA, M.R.F. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 105, n. 1-2, p. 137-147, 2006.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Curr Opin Plant Biol**, v. 6, n. 4, p. 343-350, 2003.

LLOYD, H.A. *et al.* Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301-1302, 1977.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 386p.

LORENZI, H.; MATOS F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 347 p.

LOVERDE, P. T.; CHEN, L. Schistosome female reproductive development. **Parasitology Today**, v. 7, p. 303- 308, 1991.

MACCONNACHI, A. Shistosmiasis. **J R Coll Physicians Edinb**, v. 42, p. 47-49, 2012.

MACEDO, M.L.R. *et al.* Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp Biochem Physiology A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACEDO, M.L.R. *et al.* Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 56, n. 2, p. 84-96, 2004.

MACZULAK, A.E. **Encyclopedia of microbiology**. New York: Facts On File, 2011. PAGINAS

MADIGAN, M.T. *et al.* Microbiologia de Brock [recurso eletrônico] / Michael T. Madigan [et al.]; [tradução: Alice Freitas Versiani [et al.]; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca] – 14. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAJOWICZ, S.E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **J Agricult Sci**, v. 128, n. 3, p. 311-322, 1997.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.

MARTÍN, L. *et al.* Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **FEMS Microbiol Lett**, 125, n. 2-3, p. 287-292, 1995.

MARTÍN-NAVARRO, C.M, *et al.* The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. **JMM**, v. 57, p. 1399–1404, 2008.

MCKERROW, J. H.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 5, p. 193-195, 2002.

MEDEIROS, K.C.P. *et al.* Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.23-28, 2007.

MELO JUNIOR, E.J.M *et al.*, Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. **Revista ABO Nacional**, v. 8, p. 220-6, 2000.

METLEN, K.L.; ASCHEHOUG, E.T.; CALLAWAY, R.M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant Cell Environ**, v. 32, n. 6, p. 641-653, 2009.

- MIRANDA, M.A. *et al.* Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitol Res**, p. 111:257–262, 2012.
- MORGAN, J. A. T. *et al.* *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, p. S211-S228, 2001.
- MORITA, M. *et al.* Cloning of oxetanocin A biosynthetic and resistance genes that reside on a plasmid of *Bacillus megaterium* strain NK84-0128. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 63, n. 3, p. 563-566, 1999.
- MOURA, K.S. *et al.* Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 180, n. 7, p. 1361–1371, 2016.
- MOURA, M.C. *et al.* Multi-efeito da lectina da *Moringa oleifera* solúvel em água contra *Serratia marcescens* e *Bacillus* sp.: propriedades antibacterianas, antibiofilme e anti-adesivas. **J Appl Microbiol**, v.123, n. 4, p. 861-874, 2017.
- MOURA, M.C. *et al.* Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **J Appl Microbiol**, v. 119, p. 666-676, 2015.
- NAGAO, T. *et al.* Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. **J Bacteriol**, v. 174, n. 15, p. 5013-5020, 1992.
- NAPOLÊÃO, T.H. *et al.* Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.
- NELSON, D.L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman, 2013. 1340p.
- NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia humana**. 11ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 494p.
- NEVES, D.P. *et al.* **Parasitose Dinâmica**. 3. ed, São Paulo:Atheneu, 2009.
- NEVES, D.P. **Parasitologia humana** – 13. ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2016.
- NEVES, P.R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- NOCCHI, S. R. *et al.* Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against *Herpes simplex* Virus Type 1. **Planta Medica**, v. 83, n. 6, p. 509–518, 2017.
- NOVAES, M.R.C.G.; SOUZA, J.P.; ARAÚJO, H.C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova**, v. 22, n.1, p. 5-10, 1999.

NUNES, E. dos S. *et al.* Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 159, n.1, p. 57-63, 2011.

O'CONNOR, S.E. Engineering of Secondary Metabolism. **Annu Rev Genet**, v. 49, p. 71-94, 2015.

OJEWOLE, J.A.O. Analgesic, anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Rhus chirindensis* (Baker F.) [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in mice and rats. **J Etnopharmacol**, v. 113, n. 2, p. 338-345, 2007.

OJEWOLE, J.A.O. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. (family Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. **J Etnopharmacol**, v. 85, n. 2, p. 217-220, 2003.

OKUDA, T. *et al.* Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Res**, v. 35, n. 2, p. 405-410, 2001.

OLIVEIRA, C. *et al.* Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e antibacteriana de extratos preparados a partir de diferentes tecidos de *Schinus terebinthifolius* Raddi que ocorrem no litoral da Bahia, Brasil. **Pharmacogn Mag**, v. 11, n. 43, p. 607-614, 2015.

OLIVEIRA, C.B.S. de. *et al.* Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 6, p. 589-594, 2011.

OLIVEIRA, C.F.R. *et al.* A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pest Biochem Physio**, v. 142, p. 67-76, 2017.

OLIVEIRA, C.F.R. *et al.* Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochem**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu; 1998. 420p.

OLIVEIRA, J.T.A. *et al.* Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **J Sci Food Agric**, v. 79, n. 6, p. 815-820, 1999.

OLIVEIRA, M.S. *et al.* Chemical composition and antifungal and anticâncer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. **Rev. Fitos** v. 12, p. 135-146, 2018.

OROZCO, E. *et al.* Multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. **Parasitol Int**, v.11, n. 12, p.473-475, 1995.

PAES, J.B. *et al.* Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Amb**, v. 9, p. 135-144, 2002.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: VILAS, A.M. (Org.) **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, Formatex Research Center, 2010, pp. 396-406.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M.-T. (Ed.). **Bioprocess Sciences and Technology**, New York: Nova Publishers Inc., 2011, pp. 271-296.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 545-522, 2006.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (amaruto bean). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 36, n. 2, p.113-118, 1992.

PALADA, M.C. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): a versatile tree crop with horticultural potential in the Subtropical United States. **HortScience**, v. 31, n. 5, p. 794-797, 1996.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. **Ocul Surf**, v. 8, n. 2, p. 70-79, 2010.

PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 7-16, 2001. Suppl.

PARREIRA, R.L.T. *et al.* Evaluation of Lignans from *Piper cubeba* against *Schistosoma mansoni* Adult Worms: A Combined Experimental and Theoretical Study. **Chem Biodiversity**, v. 16, p. 1-12, 2019.

PAUDYAL, N. *et al.* Antibiotic Resistance in *Salmonella Enteritidis* Isolates Recovered from Chicken, Chicken Breast, and Humans Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2014. **Foodborne Pathog Dis**, 2018
 PECES, R. *et al.* Bacteremia recidivante por *Micrococcus luteus* em paciente em hemodiálise com cateter Perm-Cath. **Nephrol Dial Transplant**, v.12, n.11, p. 2428-2429, 1997.

PEREIRA, A.S.A. *et al.* Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. **Parasitol Res**, v.112, n. 3, p.1087-1096, 2013.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. São Paulo: ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. 26p.

PÉROMBELOM, M.C.M. Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control. **Netherland J Plant Pathol**, v. 98, p. 135-146, 1992.

PÉROMBELON, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathol**, v. 51, p. 1-12, 2002.

PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot erwinias. **Annu Rev Phytopathol**, v. 18, p. 361-387, 1980.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, v. 2, p. 347-352, 1995.

PFALLER, M.A. Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect**, v. 30, p. 329-38, 1995.

PIOLI, M. *et al.* Influência de fatores de risco na mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias. **Saúde e Pesquisa**, v. 9, n. 3, p. 491–498, 2016.

PITELLA, J. E. H. Neuroschistosomiasis. **Brain Pathology**, v. 7, p. 649-662, 1997.

PITTMAN, S. Cinnamon: It's not just for making cinnamon rolls. **Ethnobot Leaflet**, v. 2000, 2011.

PONTUAL, E.V. *et al.* A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural Product Research**, v. 32, n. 24, p. 2940-2944, 2018.

PRABHU, K. *et al.* Larvicidal and repellent potencial of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 1, n. 2, p. 124-129, 2011.

PRASANNA, V.K.; VENKATESH, Y.P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. **Int Immunopharmacol**, v. 26, n. 2, p.304-313, 2015.

PROCÓPIO, T.F. *et al.* *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-19, 2015.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebozoa). **Protistologica**, v. 13, pp. 557–598, 1977.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **J Eukaryot Microbiol**, v. 60, n. 6, p. 1251–1265, 2013.

RAMOS, D.B.M. *et al.* Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. **Chinese J Biol**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

RAMOS, D.B.M. *et al.* Antinociceptive activity of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, n. March, p. 112952, 2020.

RAMOS, D.B.M. *et al.* Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, n. January, p. 148–157, 2019.

RAUX, E. *et al.* Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobl operon. **Biochem J**, v. 335, p. 159-166, 1998.

RIBAS, M.O. *et al.* Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. odonto ciênc**, v. 21, n. 53, p. 245–252, 2006.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 24, p.551-577, 1995.

ROLIM, L.A. *et al.* Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **J Food Sci**, v. 76, n. 2, p. 53-58, 2011.

ROLIM, L.A.D.M.M. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade.** Recife, PE, 2007. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

ROMANO, Giovanni. Imagens da juventude na era moderna. In: LEVI, G.; SCHMIDT, J. (Org.). **História dos jovens 2**. São Paulo: Companhia das Letras, 1996. p. 7-16.

ROVEDA, L. M. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). In **Anonymous Anais do X Simpósio Brasil-Japão**, 2010.

SÁ, R.A. *et al.* Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Bioteecnologi Cien Desenvol**, v. 13, p. 28-37, 2000.

SANTANA, G.M.S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTOS, A.C.A. *et al.* Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS, A.F.S. *et al.* Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Res**, v. 39, n. 6, p. 975–980, 2005.

SANTOS, A.F.S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochem**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, N.D.L. *et al.* Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitol Res**, v. 113, p. 1837–1842, 2014.

SANTOS, N.D.L. *et al.* Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. *et al* (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Editora da UFSC, Porto Alegre, 2004, p. 403-434.

SCARPATE, E.C.B.; COSSATIS, J.J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Amb Rev**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non opportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 1001–1027, 2004.

SHARMA, P. *et al.* Biodiversity and therapeutic potential of medicinal plants. **Environmental Concerns and Sustainable Development: Volume 2: Biodiversity, Soil and Waste Management**, p. 27–44, 2019.

SHARMA, S. *et al.* Rutin: Therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opin Investig Drug**, v. 22, n. 8, p. 1063-1079, 2013.

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 22, p. 6586-6591, 2002.

SHIOTA, H. *et al.* Clinical evaluation of carbocyclic oxetanocin G eyedrops in the treatment of herpes simplex corneal ulcers. **Br J Ophthalmol**, v. 80, n. 5, p. 413–415, 1996.

SHIOTA, H. *et al.* Clinical evaluation of carbocyclic oxetanocin G eyedrops in the treatment of herpes simplex corneal ulcers. **Br J Ophthalmol**, v. 80, n. 5, 413-415, 1996.

SHIVAKUMAR, A.G. *et al.* **Expression of heterologous proteins in *Bacillus megaterium* utilizing sporulation promoters of *Bacillus subtilis***. US5726042 A (Patent).1998.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasite Vector**, v. 5, p. 6-19, 2012.

SILVA, A.R.; KERR, W.E. **Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil**. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999, 95 p.

SILVA, F. DE O. *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Res Vet Sci**, v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014.

SILVA, J.R.M.; NEVES, R.H.; GOMES, D.C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In:

SILVA, L.B.L. *et al.* Avaliação clínica preliminar de diferentes formulações de uso vaginal à base de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Revista Brasileira de Medicina**, v.61, p.381-384, 2003.

SILVA, L.L.S. *et al.* Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Chemosphere**, v. 185, p. 178-182, 2017.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4401>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SIMPSON, A. J. G. *et al.* The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation *in vivo*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 8, p. 191–205, 1983.

SOUHAIEL, N. *et al.* *Ammoides pusilla* (Apiaceae) essential oil: Activity against *Acanthamoeba castellanii*. **Exp Parasitol**, 2017.

SOUZA, C. P. *et al.* Influence of temperature on development of *Schistosoma mansoni* female cercariae in *Biomphalaria glabrata*. **Rev Inst Med Trop SP**, v. 37, p. 319-324, 1995.

SOUZA, J.D. *et al.* A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 8, 749-767, 2012.

SREELATHA, S., JEYACHITRA, A., PADMA, P.R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 6, p. 1270–1275, 2011.

SRIRAM, R. *et al.* Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 4045-4048, 2008.

- SRIRAM, R. *et al.* Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 4045-4048, 2008.
- STANLEY JR., S.L. Progress towards an amoebiasis vaccine. **Parasitol Today**, v. 12, n. 1, p. 7-114, 1996.
- STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv Parasitol**, v. 12, p. 115-182, 1974.
- SUGA, K. *et al.* Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 613, p. 808-815, 1990.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed, Porto Alegre: Artmed. 2009. 820p.
- TAKASAKI, Y. Novel Maltose-producing Amylase from *Bacillus megaterium* G-2. **Agric Biol Chem**, 53, n. 2, 341-347, 1989.
- TAWATA, S. *et al.* Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 60, n. 5, 909-910, 1996.
- TEIXEIRA, C.M.L.L., KIRSTEN, F.V., TEIXEIRA, P.C.N. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. **J Appl Phycol**, v. 24, n. 3, p. 557-563, 2012.
- TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10 ed, Porto Alegre: Artmed, 2012. 964p.
- TOTH, I.K.; AVROVA, A.O.; HYMAN, L.J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16s-23s intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 9, p. 4070-4076, 2001.
- TRABELSI, H. *et al.* Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathol Biol**, v. 60, n. 6, p. 399-405, 2012.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. F. **Microbiologia**. 4 ed, São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.
- TSENG, C.K.H. *et al.* A ring-enlarged oxetanocin A analog as an inhibitor HIV infectivity. **J Med Chem**, v. 34, n. 1, p. 343-349, 1991,
- VARELA-BARCA, F.N.T.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) stem bark. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.48, p.672-681, 2007.

- VIERA, G.H.F. *et al.* Efeito antibacteriano (*in vitro*) de *Moringa oleifera* (moringa) e *Annona muricata* (graviola) frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positiva. **Rev Inst Med Trop**, v. 52, n. 3, p. 129-132, 2010.
- VIHINEN, M., MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzyme. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 24, n. 4, p. 329-418, 1989.
- VISVESVARA, G. S. Infections with free-living amebae. **Handb Clin Neurol**, v.114, p. 153-168, 2013.
- WEARNE, K.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I. J. Isolation of banana lectin practical scale procedure from ripe banana fruit. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 43, n. 3, p. 285-292, 2012.
- WHITFIELD, P. J. *et al.* Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. **Parasitology**, v. 126, p. 135-140, 2003.
- WHO. World Health Organization. **Elimination of schistosomiasis in low transmission areas**: Report of the WHO informal consultation. Salvador, Bahia, 18-19 Aug. 2008. Geneva, 2009.
- WHO. World Health Organization. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. **Wkly Epidemiol Rec**, v.92, n. 49, p.749-760, 2017.
- WIESNER, J. *et al.* Structure–activity relationships of novel anti-malarial agents. Part 2: Cinnamic acid derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 423-424 2001.
- WILLEY, J.M.; SHERWOOD, L.; WOOLVERTON, C.J. **Prescott's Microbiology**. 9 ed, New York: McGraw-Hill, 2014. 1014p.
- WIMALARATNE, P.D.C. *et al.* Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L. **J Chem Ecol**, v. 22, n. 1, p. 49-59, 1996.
- XIE, M. *et al.* Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosens Bioelectron**, v. 24, n. 5, p. 1311-1317, 2009.
- XU, Z. *et al.* Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1-15, 2009.
- YAMASHITA, K.; OHKURA, T. Determination of Glycan Motifs Using Serial Lectin Affinity Chromatography. **Methods Mol Biol**, v. 1200, p. 79-92, 2014.
- YERA, H.; CORNET, M.; BOURGES, J. L. *Acanthamoeba*. In: LIU, D. (Ed), **Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens**, CRC Press Taylor & Francis Group, 2013. cap. 2, p.15-23.
- YOSHINO, T.P.; BOYLE, J.P.; HUMPHRIES, J.E. Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. **Parasitology**, v. 123, p. 143-157, 2001.

ZHANG, C. *et al.* *Momordica Charantia* lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma. **Invest New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2015.

ZHU-SALZMAN, K. *et al.* Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Proc Nat Acad Sci EUA A**, v. 95, n. 25, p. 15123-15128, 1998.

ZHU-SALZMAN, K., SALZMAN, R.A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **J Econ Entomol**, v. 94, n. 5, p. 1280-1284, 2001.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 04/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Patricia Maria Guedes Paiva**

Departamento de Bioquímica

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.047560/2016-15**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação de atividade antihelmíntica de metabólitos secundários e lectinas de origem vegetal contra schistosoma mansoni**”, registrada com o nº **23076.047560/2016-15** sob a responsabilidade de Prof.ª **Patricia Maria Guedes Paiva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2017 a 31/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo/ Swiss
Nº de animais	15
Peso/Idade	28+ 2g 30 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Bioterio do LIKA

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691