



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

JACKSON RODRIGUES MENDONÇA

EFEITO *in vitro* DO SUCO COMERCIAL CLARIFICADO
LIOFILIZADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) SOBRE A
ESPÉCIE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E A CÉLULA
HOSPEDEIRA

Orientador(a): Profa Dra Edilene Oliveira da Silva

Belém-Pará
2017

JACKSON RODRIGUES MENDONÇA

EFEITO *in vitro* DO SUCO COMERCIAL CLARIFICADO
LIOFILIZADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) SOBRE A
ESPÉCIE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E A CÉLULA
HOSPEDEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Profa **Dra. Edilene Oliveira da Silva**

BELÉM-PARÁ

2017

JACKSON RODRIGUES MENDONÇA

**EFEITO *in vitro* DO SUCO COMERCIAL CLARIFICADO
LIOFILIZADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) SOBRE A
ESPÉCIE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E A CÉLULA
HOSPEDEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva - ICB - UFPA

Avaliador 1: Prof. Dr. Francisco Acácio Alves - ICB - UFPA

Avaliador 2: Profa. Dra. Auxiliadora Pantoja Ferreira - ICB - UFPA

Avaliador 3: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento - ICB - UFPA

BELÉM-PARÁ

2017

“Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

*À Deus por me iluminar e por me
guiar nesta caminhada...
Aos meus pais que lutaram me
deram forças e torcem pela minha vitória...*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que me foram concedidas nestes quatro anos, pois sei que até mesmo as barreiras que foram colocadas em meu caminho foram formas de me fazer crescer e amadurecer para me tornar a pessoa que hoje sou.

Agradeço ao meu pai por toda a luta pelo qual ele passou para conseguir me colocar numa universidade, por todos os dias e noites pelo qual ele teve que passar trabalhando para poder me dar o melhor presente pelo qual ele poderia me dar, que é o conhecimento, e que mesmo que ele não esteja aqui hoje, para ver a minha vitória, sei que ele está torcendo muito pelo meu sucesso.

Agradeço a minha mãe por todo o suporte e o apoio que ela me deu durante todos esses anos, pois parte da pessoa que sou é por causa de seus ensinamentos, conversas, conselhos e que, se até hoje eu ainda estou nessa luta é por causa do seu apoio, e para ter condições de poder lhe dar uma vida melhor, uma vida pelo qual você merece.

À Prof^a Edilene, pela a orientação e pela oportunidade de poder estagiar e aprender em seu laboratório.

Agradeço à todos do laboratório de Protozoologia, em especial a Vanessa e a Letícia, pelos momentos de descontração e de muitas risadas, pelas brincadeiras do dia-a-dia e ao Bruno pelos conselhos, ensinamentos e pela atenção, em me ajudar a finalizar o meu trabalho.

Aos meus familiares, que me deram apoio nos momentos difíceis durante esses quatro anos de luta, em especial as minhas avós, a minha tia Téia e aos meus primos Rogério e Marina, por serem essas pessoas tão especiais na minha vida e da minha mãe e estarem sempre dispostos a nos ajudar, sem sequer esperar algo em troca.

Aos meus amigos Luidison, Mizael e Karla por todos os momentos de descontração, risadas, besteiras e por serem essas pessoas tão especiais na minha vida, e por toda a força pelo qual vocês me dão desde o ensino médio.

A casa dos estudantes, por terem me acolhido na casa de vocês, e por terem me permitido conhecer cada um de vocês e ver quão especiais

vocês são, assim como, pelo aprendizado que é conviver com várias pessoas, de personalidades e características diferentes e aprender a respeitar a particularidade de cada pessoa... me fez crescer e amadurecer muito.

à Laís, Rebecca, Vanessa, Higo, Ana, Aline, Camily, e a todos os meus amigos que me acompanham nesses quatro anos de muita luta, choro, calor, mas também de muitas alegrias, risadas, cachaças, vadiões (kkkkkk)... por todos os momentos felizes de muita descontração e pelos momentos tristes que necessitam de reflexão mas que de qualquer forma nos fazem crescer.

E Por fim agradecer a todos aqueles que me ajudaram, apoiaram e me deram forças nesses quatro anos e que contribuíram de alguma forma para a realização de mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO**LISTA DE TABELAS E FIGURAS****LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS****RESUMO****ABSTRACT**

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. AS LEISHMANIOSES	2
1.2. CICLO DE TRANSMISSÃO	2
1.3. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	4
1.4. TRATAMENTO	6
1.5. <i>Euterpe oleracea</i> mart.	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. OBJETIVO GERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	12
3.2. OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DA <i>EUTERPE OLERACEA</i>	12
3.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM <i>E. OLERACEA</i> LIOFILIZADA	13
3.3.1. Método de Thiazolyl Blue	13
3.3.2. Método do Alamar Blue®	13
3.4. ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA	14
4. RESULTADOS	15
4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM <i>E. OLERACEA</i> LIOFILIZADA	15
4.2. ANÁLISE DO VOLUME CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM <i>E. OLERACEA</i> LIOFILIZADA	16
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA COM O SUCO CLARIFICADO LIOFILIZADO DE <i>EUTERPE OLERACEA</i>	17
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Ciclo Evolutivo do protozoário <i>Leishmania spp.</i> de transmissão da leishmaniose diferenciando o estágio infectante que ocorre no vetor e o estágio intracelular que ocorre no hospedeiro vertebrado, neste caso o homem.....	3
Figura 2: Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania spp.</i>	4
Figura 3: Representação da <i>Euterpe oleracea Mart.</i>	10
Figura 4: Análise da viabilidade celular utilizando o método do MTT como marcador.....	16
Figura 5: Análise da viabilidade celular utilizando como marcador Alamar Blue®.....	17
Figura 6: Análise do volume celular de macrófagos tratados com <i>E. oleracea</i> liofilizada através do marcador Alamar Blue®.....	18
Figura 7: Efeito de <i>E.oleracea</i> liofilizada sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> , nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL após 72 horas do tratamento.....	19

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µg/mL – Microgramas por mililitros

µL – Microlitros

µm – Micrometros

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsufóxido

GP63 – Glicoproteína 63

IL – Interleucina

INF-γ – Interferon –γ

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LPG – Lipofosfoglicano

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

mg/mL – Miligramas por mililitros

MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

O₂⁻ – Íon superóxido

OH⁻ – Radical hidroxila

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro bovino fetal

TNF-α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral

RESUMO

As leishmanioses são doenças que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo. O tratamento atual para essa doença apresenta várias limitações. O desenvolvimento de tratamentos provenientes de plantas e extratos naturais vem ganhando notoriedade devido à possibilidade da obtenção de drogas com menor efeito tóxico para os pacientes e mais viáveis economicamente. Desta forma, produtos naturais obtidos de plantas, como *Euterpe oleracea* Martius, ganham destaque na pesquisa científica. *E. oleracea* apresenta em sua composição compostos que podem apresentar efeito protetor contra a infecção por *leishmania*, podendo ser objeto de estudo para avaliar o seu possível efeito leishmanicida. Assim, o objetivo geral do estudo é analisar o possível efeito leishmanicida do suco comercial clarificado de *Euterpe oleracea* liofilizado sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* e sua célula hospedeira. Os resultados demonstraram que *E. oleracea* não apresenta efeito tóxico para os macrófagos e que este composto natural é capaz de reduzir a viabilidade dos parasitos em meios de cultura. Portanto, *E. oleracea* pode ser uma nova alternativa para tratamento das leishmanioses, porém mais testes devem ser realizados para avaliar o seu efeito principalmente sobre as formas intracelulares do parasito.

Palavras chave: Leishmanioses, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, açai, *Euterpe Oleracea*, macrófagos

Abstract

Leishmaniasis are diseases that affects thousands of people around the world. Severity of the disease and psychological involvement make this pathology important for the development of research. The current treatment for this disease has several limitations. The development of substances to the treatment, obtained from plants and natural extracts has been highlighting due to the possibility of obtaining drugs with free toxic effect for patients and more economically viable. In this way, natural products obtained from plants such *Euterpe Oleracea* Martius are important for scientific research. *E. oleracea* has many compounds that can present protective effect against *leishmania* infection and can be object of study. Thus, we analyzed the possible leishmanicidal effect of clarified commercial juice of *Euterpe Oleracea* lyophilized on *Leishmania (Viannia) braziliensis* and host cell. The results showed that this natural compound does not present a toxic effect on macrophages and is able to reduce the viability of the parasites. Therefore, *E. oleracea* could be a new alternative in the treatment of leishmaniasis, however more tests should be performed to evaluate its effect mainly on intracellular stage of the parasite.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Acai, *Euterpe Oleracea*, Macrophages.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses afetam mais de 20 milhões de pessoas no mundo, sendo transmitida através da picada do vetor flebotomíneo fêmea, que inocula as formas promastigotas metacíclicas, que são infectantes para o homem (WHO, 2010; Brasil, 2010). O parasito *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: as formas promastigotas, que estão no intestino dos insetos, e que são infectantes para o hospedeiro vertebrado e as formas amastigotas que são formas que estão presentes no interior dos macrófagos e são infectantes para o vetor (De Souza, 2008).

A patologia ocasionada pelas diferentes espécies de *Leishmania* apresenta três formas clínicas principais: a cutânea, mucocutânea e visceral. Outro fator que influencia na forma clínica é o sistema imunológico e sua resposta inflamatória, que também estão associados ao grau de severidade da doença (David & Craft, 2009; Brasil, 2010).

O controle dessa doença tem sido difícil, devido à ausência de vacinas, limitações em relação aos principais tratamentos farmacológicos, como o seu alto custo, elevada toxicidade e a resistência apresentada por algumas cepas de *Leishmania* aos antimoniais pentavalentes (WHO, 2010; Goto & Lindoso, 2010).

As drogas de primeira escolha para as leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, porém estes apresentam muitos efeitos adversos para os pacientes. As anfotericinas representam drogas de segunda escolha, porém elas também apresentam efeitos tóxicos e em alguns casos não se tem a resposta esperada no paciente (Patel & Sethi, 2009).

Na ausência de tratamentos que oferecem baixo custo, que tenham curta duração e que sejam menos invasivos, se faz necessário a busca por novos meios, que apresentam menor toxicidade para os pacientes e que sejam mais viáveis economicamente.

1.1. AS LEISHMANIOSES

Segundo a organização mundial da saúde (OMS) dos 51.092 novos casos de leishmaniose tegumentar registrados nas Américas, 40% desses casos foram notificados no Brasil, além do grande número de casos, a severidade da doença e o envolvimento psicológico, fazem dessa patologia um importante foco de pesquisa (WHO, 2009).

O Brasil é o terceiro país no mundo com o maior número de casos novos de leishmanioses registrados, com uma média de aproximadamente 21.000 casos por ano, no período de 2009-2013, superado apenas pela Síria e pelo Afeganistão (Brasil, 2010).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa e de caráter polimórfico que atinge pele e mucosas, é uma patologia que afeta outros mamíferos além do homem, caracterizando esta doença como uma infecção zoonótica (WHO, 2009; Alcolea *et al*, 2010).

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear e possui duas formas evolutivas: a forma promastigota, com corpo celular e flagelos alongados, presença do cinetoplasto, característico de sua ordem *Kinetoplastida* sendo encontrada no tubo digestivo do vetor; e a forma amastigota, com corpo celular arredondado, flagelo internalizado e cinetoplasto, encontrada no citoplasma da célula hospedeira (De Souza, 2008).

A LTA é dividida em diversas manifestações clínicas, sendo a leishmaniose cutânea localizada a mais frequente e a leishmaniose cutânea difusa e mucocutânea as mais agravantes. No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* envolvidas na transmissão das leishmanioses são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (David & Craft, 2009; Brasil, 2010).

1.2. CICLO DE TRANSMISSÃO

O protozoário apresenta dois hospedeiros, invertebrado, que são insetos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, e o hospedeiro vertebrado,

representado por um número variado de mamíferos, entre eles o homem (Maurer *et al*, 2009).

O ciclo de vida do parasito (Figura 1) inicia quando o vetor inocula as formas metacíclicas do parasito no mamífero (Kamwavi, 2006). Após a invasão do parasito, ocorre a sua internalização por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente os macrófagos. Ao estabelecer a infecção através de mecanismos de evasão à resposta microbicida, o parasito diferencia-se em formas amastigotas (Kling & Körner, 2013).

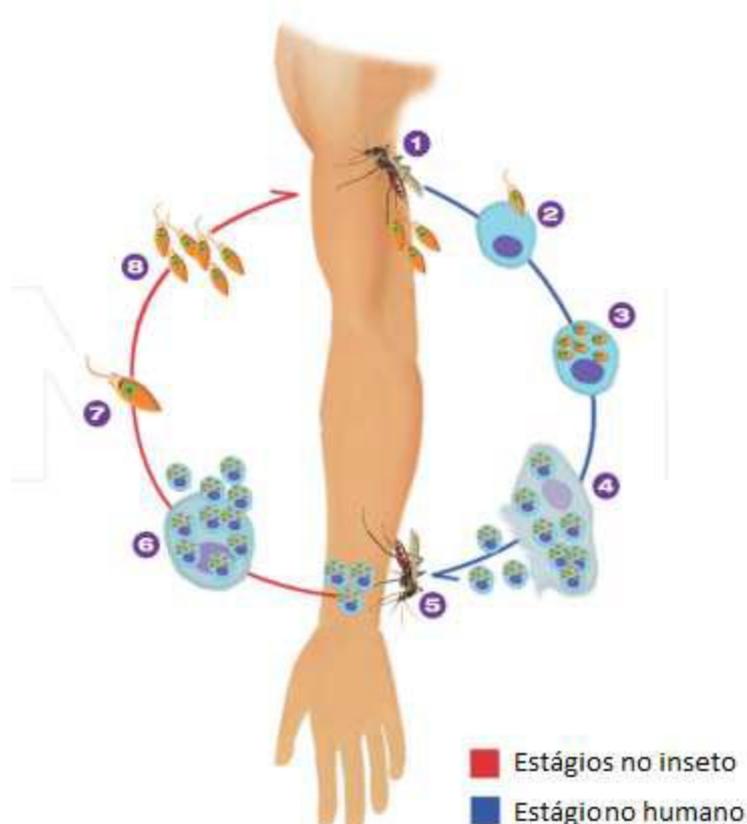


Figura 1: Ciclo Evolutivo do protozoário *Leishmania spp.* 1- insetos inoculam promastigotas durante o repasto sanguíneo, 2- promastigotas infectam macrófagos e outros tipos de células mononucleares fagocíticas, 3- promastigotas transformam-se em amastigotas; 4- amastigotas se multiplicam. 5- insetos são infectados por ingestão de macrófagos infectados com amastigotas durante o repasto sanguíneo; 6- células parasitadas; 7- em flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas, no intestino; 8- promastigotas dividem-se e migram para as proboscides Adaptado de: Vermelho *et al*, .

As formas amastigotas (Figura 2B) localizam-se no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, onde se multiplicam por divisão binária, até provocarem o rompimento das células, infectando assim, outros fagócitos ou podendo infectar outro vetor durante repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. (Bailey & Lockwood, 2007). No trato digestivo do inseto, ocorre a diferenciação para a forma promastigota (Figura 2A) e em seguida inicia-se a metaciclogênese. Neste processo, o parasito sofre várias alterações, entre elas o alongamento da estrutura da molécula lipofosfoglicano (LPG) e do seu flagelo e por fim originando a forma infectante, promastigota metacíclica. Posteriormente, o inseto vetor irá realizar repasto sanguíneo, prosseguindo assim com ciclo evolutivo (Kaye & Scott, 2011).

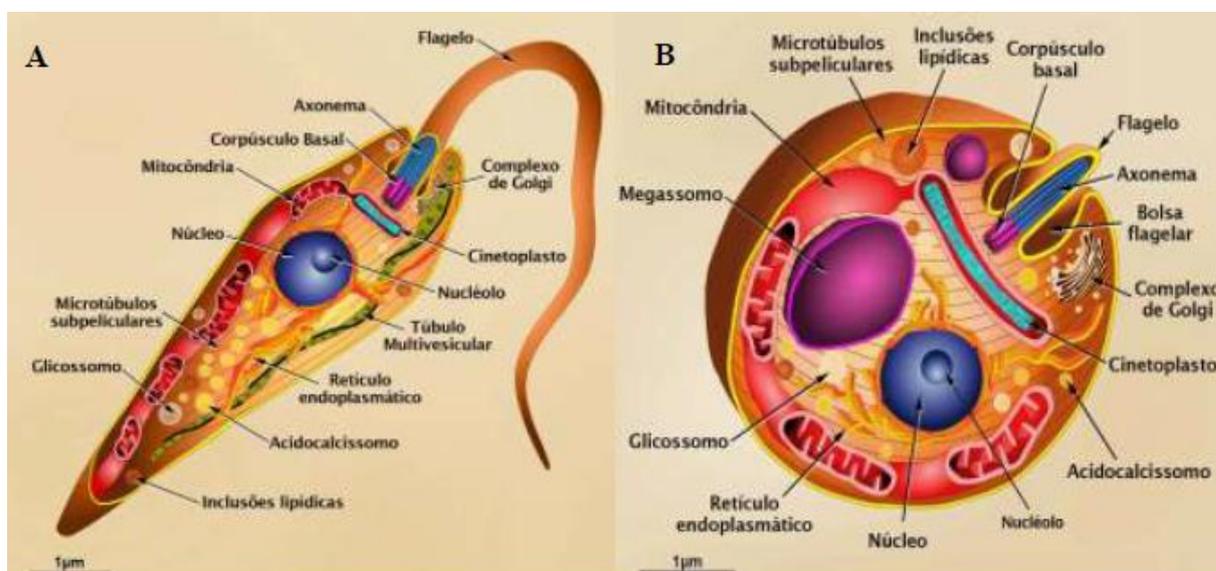


Figura 2: Formas evolutivas do parasito *Leishmania sp.* A) Promastigota. B) Amastigota. Esquema exemplificando e mostrando as principais organelas citoplasmáticas presentes em cada uma das formas evolutivas. Fonte: Paulo Henrique Crepaldi (Teixeira *et al.*, 2013).

1.3. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

O parasito *Leishmania* ao invadir o organismo do hospedeiro vertebrado realiza o processo de invasão de fagócitos, principalmente macrófagos, para assim realizar sua diferenciação em amastigota e posteriormente iniciar seu processo de multiplicação por divisão binária (Walker *et al.*, 2014). Os macrófagos, os neutrófilos e as células dendríticas são as

células fagocíticas do organismo e estão relacionadas com a inflamação, infecção, autoimunidade, câncer e transplante de órgãos (Chow *et al*, 2011; Underhill & Goodridge, 2012).

Os macrófagos desempenham uma função importante na defesa do organismo contra patógenos e são fagócitos que têm como principal função destruir e eliminar os microorganismos, sofrendo alterações morfológicas características de ativação celular, sendo acompanhada pelo rearranjo do citoesqueleto em resposta a um patógeno (Abbas, 2012).

Durante o contato dos macrófagos com os microorganismos, ocorre a ativação destas células e indução da liberação de citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , que são importantes para o estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra patógenos intracelulares (Duque & Descoteaux, 2014).

Um dos mecanismos de defesa ativado pelos macrófagos é o chamado “burst oxidativo”, onde é observado a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), produção de óxido nítrico (NO) e ativação da fagocitose que auxiliam as células no combate ao parasito (Apel & Hirt, 2004; Alfadda & Sallam, 2012).

Os O_2^- são formados a partir da ação da enzima NADPH oxidase, sendo esta enzima capaz de reduzir o oxigênio (O_2) em O_2^- e posteriormente é convertido em H_2O_2 , a partir da ação da superóxido dismutase (SOD) (Robinson *et al*, 2004; Alfadda & Sallam, 2012). Além das ERO, durante o combate aos parasitos, o NO também é produzido pelos macrófagos, proveniente da ação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é produzida após a ativação dos macrófagos, principalmente por LPS e por INF- γ (Hortelano *et al*, 2003).

Outro mecanismo de defesa é a fagocitose, que é uma forma de endocitose, no qual os fagócitos englobam e internalizam microorganismos ou células mortas, formando o fagossomo, sendo este um mecanismo muito importante para a defesa do organismo contra agentes causadores de doenças (Mosser & Edwards, 2008; Chow *et al*, 2011).

A fagocitose é um dos meios que os patógenos conseguem adentrar a célula-alvo, porém, existem vários mecanismos intracelulares que as células utilizam para conseguir destruir o agente patogênico. As diferentes espécies de

Leishmanias possuem mecanismos específicos para sobreviver no interior do vacúolo parasitóforo do macrófago e assim se estabelecer no meio intracelular (Alcolea *et al*, 2010; Gluenz *et al*, 2010).

Durante interação *Leishmania*-macrófago, várias modificações são observadas na membrana celular dos macrófagos que são importantes para o início do processo de fagocitose. As diferentes espécies de *Leishmania* possuem duas moléculas de fundamental importância para sua evasão e instalação na célula: a glicoproteína gp63, e a LPG, que interagem com receptores do complemento presentes na membrana dos macrófagos (CR1 e CR3) (Bates, 2007; Corrales *et al*, 2010).

Após a internalização das formas promastigotas, elas são diferenciadas em amastigotas e estas ficam internalizadas em fagossomos que se fundem com os lisossomos, formando os fagolisossomos (Gluenz, 2010). Algumas das moléculas presente na forma promastigota, permanecem na forma amastigota e são fundamentais para a sobrevivência do parasito. A gp63, por exemplo, promove a degradação das enzimas lisossomais, por apresentar atividade exacerbada em meio ácido. A LPG promove o retardamento da fusão entre o fagossomo com os lisossomos, favorecendo assim o período necessário para que ocorra a diferenciação de promastigota em amastigota. As formas amastigotas de *Leishmania spp.* possuem atividade aumentada em pH ácido, fazendo com que estas sobrevivam no interior dos fagolisossomos (Landfear & Ignatushchenko, 2001; Field & Carrington, 2009).

1.4. TRATAMENTO

Atualmente os tratamentos das leishmanioses pouco diferem entre si, apesar da variedade de espécies existentes e das diferentes manifestações clínicas, os medicamentos utilizados são basicamente os mesmos. A grande diferença nos tratamentos encontra-se nas doses utilizadas entre as espécies do novo e do velho mundo (David & Craft, 2009; Handler *et al*, 2015).

As drogas de primeira escolha no tratamento para todas as formas clínicas das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), que são administrados por via oral ou parenteral (Reinthinger *et*

al, 2007; Goto & Lindoso, 2010).

Algumas espécies de *Leishmania* apresentam resistência ao tratamento com os antimoniais pentavalentes devido a utilização indevida e às altas doses destes medicamentos (Ashutosh *et al.*, 2007). Outro ponto negativo no tratamento com os antimoniais pentavalente são os efeitos adversos que eles provocam nos pacientes, como: pancreatite, mialgia, reações dérmicas locais, náuseas, vômitos e são contra-indicados para cardiopatas, nefropatas, hepatopatas e para gestantes, por serem abortivos, além de apresentarem um alto custo (Pinheiro, 2004; Patel & Sethi, 2009).

Em casos que os pacientes são refratários ao tratamento ou não se obtém o resultado esperado, as anfotericinas e as pentamidinas são as drogas de segunda escolha na clínica (WHO, 2009; Brasil, 2010). A anfotericina B é um medicamento que possui alta afinidade pelo ergosterol, que está ricamente presente na membrana dos parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* sendo a droga de maior escolha entre as anfotericinas (Polonio & Efferth, 2008).

Outra droga bastante utilizada no tratamento das leishmanioses é a miltefosina e os análogos de lipofosfolípídeos, que demonstraram bastante eficácia no tratamento oral (Costa Filho *et al*, 2008). A miltefosina interfere na fluidez da membrana celular da espécie *Leishmania amazonensis* e no metabolismo dos fosfolípídeos (Costa Filho *et al*, 2008). Além disso, apresentou eficácia durante testes *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* (Santa-Rita *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de tratamentos provenientes de plantas e extratos naturais vem tendo bastante notoriedade devido à possibilidade de se ter drogas com menor efeito tóxico para os pacientes, assim como, a fácil obtenção desses produtos pode diminuir o valor aquisitivo destes medicamentos (Braga *et al*, 2007; Bailey & Lockwood, 2007).

As plantas produzem dois tipos de metabólitos, os metabólitos necessários á sua sobrevivência, como aminoácidos ou a glicose, que são considerados metabólitos primários, e os metabólitos secundários, como terpenos, quinolonas, chalconas, flavonoides, alcaloides, que atualmente tem sido alvo de muitos estudos, para avaliação de seus efeitos (Vizzoto *et al*, 2010).

Três extratos provenientes do pepino do mar *Holothuria leucospilota* foram testados *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*, e o extrato do fluido coelômico apresentou boa atividade leishmanicida com baixos valores de IC₅₀ nos períodos de 48 e 72 horas (Khademvatan *et al*, 2016).

Os extratos das plantas *Vernonia polyanthes* e *Lantana camara*, apresentaram eficácia contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com IC₅₀ de 4 µg/mL e de 14 µg/mL e em suas composições foi observado em ambos os extratos a presença de compostos flavonoides e alcalóides (Braga *et al.*, 2007).

Esses estudos demonstram que produtos naturais podem ser novas alternativas para o tratamento das leishmanioses e nesse contexto uma planta que é rica em flavonoides e que vem ganhando destaque na pesquisa científica é *Euterpe Oleracea* Martius principalmente por ser amplamente encontrada na floresta Amazônica e estudos mostram que este produto natural não apresenta efeito tóxico para células de mamíferos (Santos *et al*, 2008; Corrêa *et al*, 2010).

1.5. *Euterpe oleracea* Mart.

A *E. oleracea* é uma planta popularmente conhecida como açazeiro, sendo proveniente da região amazônica e seu fruto é amplamente cultivado por toda a extensão amazônica e comercializado por todo o Brasil (Matta *et al*, 2010). O açaí é comercializado na forma de polpa, doces, sucos, produtos de beleza, hidratantes, produtos de pele (Oliveira *et al*, 2007). Os estados do Pará, Amazonas, Acre, Rondônia e Maranhão são os estados com a maior produção e consumo desta fruta (Menezes *et al*, 2008).



Figura 3: Adaptado de Oliveira *et al*, 2002. Representação da *Euterpe oleracea* Mart.: A) Diferente influorecências da *Euterpe oleracea*: verde, espada e roxo. B) *Euterpe oleracea* Jovem. C) Cestos utilizados na comercialização de frutos do açazeiro.

O açazeiro é utilizado de maneira completa, sendo o seu fruto comercializado na forma de sucos e polpa, o seu caule é utilizado para extração de celulose e de palmito, suas raízes são utilizadas como vermífugos e antidiarreicos e suas influorecências podem ser utilizadas para fins artesanais e para produção de vassouras (Oliveira *et al*, 2007).

O açaí ganhou destaque nos últimos anos, devido às descobertas dos seus benefícios a saúde, associados principalmente a sua composição fitoquímica, tendo em sua constituição principalmente, compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas que proporcionam alguns efeitos benéficos a saúde, principalmente o seu efeito antioxidante (Santos *et al*, 2008; Corrêa *et al*, 2010).

O efeito antioxidante do açaí está principalmente ligado à inativação do O_2^- e OH^- (Jensen *et al*, 2008). A polpa ou o extrato do açaí possuem vários compostos com efeitos antioxidantes, porém os compostos fitoquímicos predominantes são as antocianinas e os compostos flavonóides (Kang *et al*, 2011; Gordon *et al*, 2012). As antocianinas já demonstraram em alguns estudos alguns efeitos antineoplásicos, antimicrobianos, potencial anti-inflamatório, além de prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas (Galvano *et al*, 2004). No extrato da *E. oleracea* é possível encontrar as antocianinas: cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, perlagonidina-3-glucosídeo dentre outras (Gallori *et al*, 2004; Gordon *et al*, 2012).

A composição lipídica presente no fruto da *E. oleracea* e consequentemente nos extratos e na polpa do fruto, pode estar relacionada com a redução do processo inflamatório (Kanget *et al*, 2011; Kanget *et al*, 2012) e da nocicepção, sendo o seu efeito proporcionado pela inibição da ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1, COX-2) (Favacho *et al*, 2011;).

O uso dos processos de separação no processamento do açaí pode permitir a obtenção de produtos diferenciados, agregando valor ao produto, como por exemplo, o açaí clarificado. O processo de clarificação é realizado à temperatura ambiente, permitindo assim, a manutenção das características sensoriais do fruto, resultando num produto límpido, isento de turbidez, e com características de cor, sabor e aroma similares aos da polpa de açaí original (Oliveira *et al*, 2007; Matta *et al*, 2010).

O suco clarificado da *E. oleracea* foi capaz de promover a modulação das convulsões sem promover alteração na atividade locomotora de camundongos Swiss, através da redução do tempo de latência do primeiro espasmo mioclônico, da primeira convulsão tônico-clônica e do tempo total em convulsão, além das alterações eletrocorticais provocadas pelo pentilenotetrazol terem sido prevenidas pelo suco clarificado da *Euterpe oleracea* (Souza-Monteiro *et al*, 2015). Outros efeitos conhecidos da *E. oleracea* estão relacionados com seu efeito antineoplásico por reduzir a proliferação de células leucêmicas HL-60 (Del Pozo-Insfran *et al*, 2006), além de apresentar efeitos protetores nas dislipidemias, na síndrome metabólica e na diabetes tipo II (Souza *et al*, 2010; Dembinska-Kiec *et al*, 2008).

Resultados recentes obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (laboratório de protozoologia e biologia estrutural) demonstraram que *E. oleracea* apresentou atividade leishmanicida contra duas espécies causadoras de leishmaniose tegumentar (*L. amazonensis*) e visceral Americana (*L. infantum chagasi*) e não causou redução da viabilidade da célula hospedeira, esses dados subsidia estudos sobre o efeito de *E. oleracea* sobre outra espécie de *Leishmania* que é comumente encontrada no Brasil, a espécie, *L. (V.) braziliensis*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o possível efeito leishmanicida do suco comercial clarificado de *Euterpe Oleracea* liofilizado sobre *L. (V.) braziliensis* e sua célula hospedeira.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a viabilidade de macrófagos (linhagem J774) após o tratamento com diferentes concentrações do suco clarificado liofilizado de *Euterpe oleracea*;

2. Analisar alterações no tamanho celular de macrófagos (linhagem J774) tratados com o suco clarificado liofilizado de *Euterpe oleracea*;

3. Verificar a ação do suco clarificado liofilizado de *Euterpe oleracea* sobre a forma promastigota de *Leishmania (L.) braziliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) 10% em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27°C.

3.2. OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DA *Euterpe oleracea*

Plantas de *E. oleracea* (Arecaceae) foram coletadas no estado do Pará, Brasil, identificadas por comparação com um voucher (#268513) e depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA, Brazil). As amostras de *E. oleracea* foram preparadas por um processo patenteado pela companhia AmazonDreams (Belém, Pará, Brazil) e Universidade federal do Pará. Suco clarificado do açaí foi preparado como descrito por Souza-Monteiro *et al.* (2015), onde os frutos do açaí foram submetidos a vários processos de centrifugação e filtração, com o objetivo de remover lipídios e proteínas da solução final, e assim obtendo um suco rico em compostos fenólicos. Após esse processo, o suco do açaí foi filtrado em membrana de 0,22 µm e submetido ao processo de liofilização, processo esse que consiste em um sistema hermeticamente fechado e acionando o sistema de congelamento onde toda massa atingiu - 40°C. Em seguida, o sistema de frio foi interrompido e o de vácuo foi acionado para que parte da água livre da polpa fosse sublimada (Menezes *et al.*, 2008). Para os testes suco comercial de *E. oleracea* liofilizado foi diluído em meio de cultura DMEM (Gibco®) ou RPMI *Medium*1640 (Gibco®). A solução estoque foi preparada na concentração de 1 mg/mL, onde as concentrações utilizadas neste estudo foram obtidas a partir desta solução. As concentrações utilizadas nesta pesquisa foram de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml de *E. oleracea* liofilizada e diluída no meio RPMI.

3.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM *E. OLERACEA* LIOFILIZADA

3.3.1. Método de Thiazolyl Blue

O MTT, um sal tetrazolium solúvel em água, é convertido pelas desidrogenases mitocondriais em cristais azuis de formazan insolúveis em água. O produto formazan é impermeável às membranas celulares, acumulando-se em células viáveis, sendo posteriormente diluído em DMSO (FOTAKIS *et al.*, 2006).

Macrófagos da linhagem (J774) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10 % de soro bovino fetal em placas de 96 poços e submetidos ao tratamento com a *E. oleracea* nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL. As células foram incubadas por 72 horas com *E. oleracea* diluída de acordo com item 3.2, meio RPMI e SBF 10%. Após 72 horas o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS pH 7.2. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS pH7.2 sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Após o término da incubação foi adicionado 200 µL DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e incubado em agitação por 10 minutos. Posteriormente, a leitura da solução resultante foi realizada em leitor de ELISA (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) em comprimento de onda de 570 nm (FOTAKIS *et al.*, 2006). Como controle negativo da reação, células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS pH 7.2.

3.3.2. Método do Alamar Blue®

O ensaio Alamar Blue® é um teste que é realizado através de um indicador de crescimento fluorimétrico/colorimétrico baseado na detecção da atividade metabólica. Especificamente, o sistema utiliza um indicador de oxidação e redução (REDOX) que fluoresce e muda de cor em resposta ao metabolismo celular (Lancaster & Fields, 1996).

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placas de 24

poços e submetidos ao tratamento com a *E. oleracea* nas concentrações de 20, 50 e 100 µg/mL. Após 72 horas de tratamento, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas em PBS pH 7.2, em seguida foi adicionado 300 µL de Alamar Blue®-RPMI1640 (O Alamar blue® foi diluído em RPMI numa proporção de 1:10) e incubado durante 4 Horas. Após esse período, foram realizadas duas lavagens em PBS pH 7.2 e posteriormente as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCantoll. Os dados foram obtidos utilizando o *software* WinMDI versão 2.9.

Além disso, foi realizada a análise do volume celular após o tratamento, onde a avaliação é feita através de um histograma, em que os grupos tratados são comparados com o grupo controle, considerando macrófagos com morfologia de células residentes sem alteração no volume celular. Em casos de deslocamento do pico para a direita é indicativo de aumento celular, enquanto que, em casos de deslocamento para esquerda é indício de redução do volume celular.

3.4. ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

Para análise da atividade antipromastigota foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, em fase exponencial de crescimento (4º dia de cultivo).. As promastigotas foram tratadas com 10, 20 e 50 µg/mL de *E. oleracea* por 72 horas. Após tratamento foi feita análise de viabilidade dos parasitos pelo método do MTT. A formas promastigotas foram centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI, posteriormente foram contadas em câmara de Neubauer e em seguida adicionadas aos poços de culturas em uma concentração de 10^6 parasitos por mL, contendo meio RPMI e 10% de SFB. Em todos os experimentos foram utilizados controle sem adição de droga e controle positivo (Anfotericina B na concentração de 0,5 µg/mL). Todos os testes foram realizados em triplicata. O IC_{50} para a forma promastigota foi determinado utilizando o programa SigmaPlot (version 12).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM *E. oleracea* LIOFILIZADA

A análise da viabilidade celular demonstrou que após tratamento com *E. oleracea* liofilizada, a viabilidade dos macrófagos não foi alterada, foram utilizados o MTT e o Alamar Blue® como marcadores para analisar a viabilidade dos macrófagos.

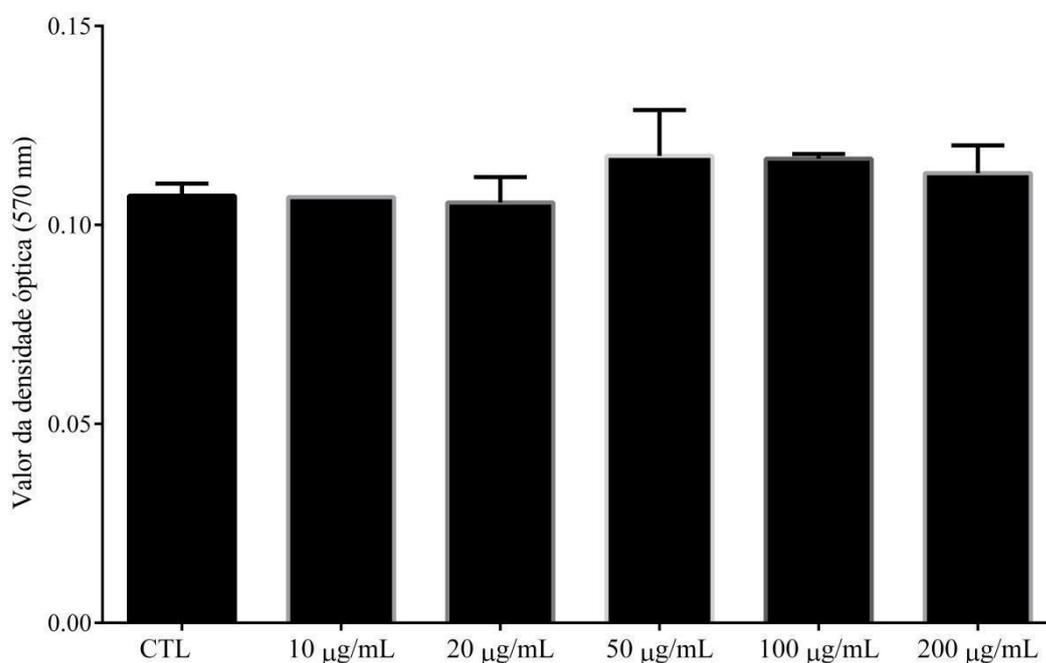


Figura 4: Análise da viabilidade celular utilizando o método do MTT como marcador. É possível observar que não houve redução na viabilidade dos grupos tratados, em relação ao grupo controle (CTL). Os resultados mostram a média \pm desvio padrão, onde foi utilizado ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, com $P < 0,05$.

No teste do MTT foram utilizadas as concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e a concentração mais alta de 200 µg/mL onde nenhuma das concentrações promoveu efeito citotóxico nos macrófagos (Figura 4).

Na marcação com Alamar blue® foi possível observar que também não ocorreu redução da viabilidade dos macrófagos após tratamento com 20, 50 e 100 µg/mL de *E. oleracea* liofilizada por 72 horas quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 5).

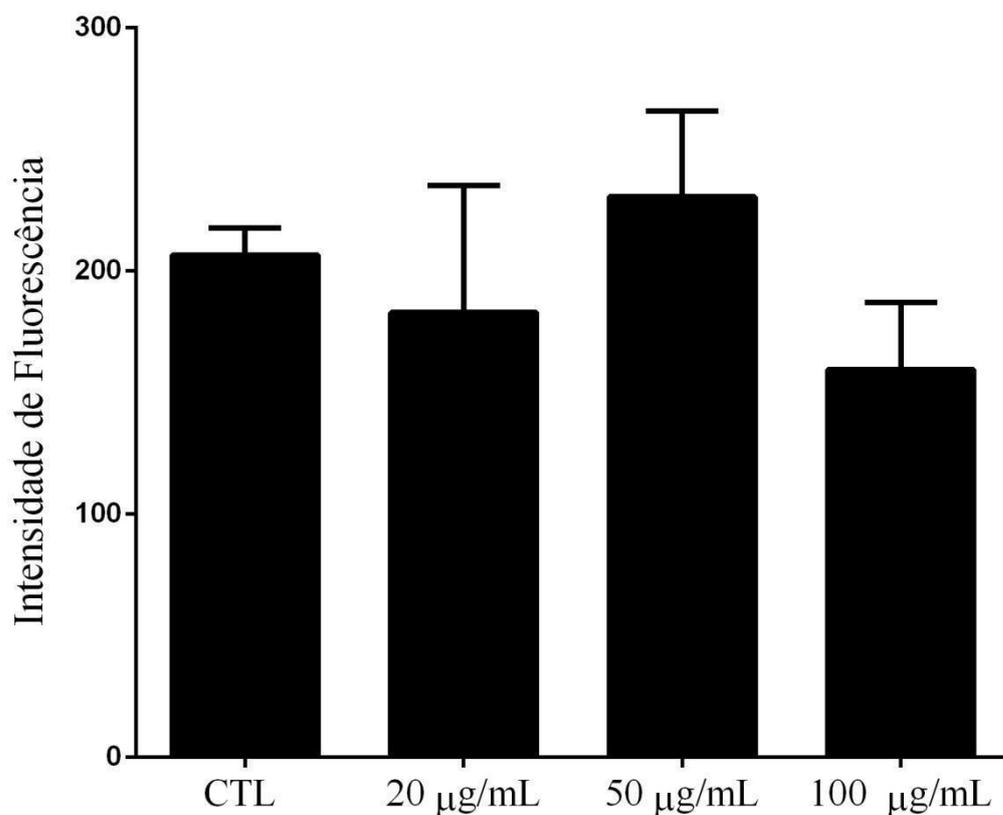


Figura 5: Análise da viabilidade celular utilizando como marcador Alamar Blue®, onde não foi possível observar diferença na viabilidade dos grupos tratados, em relação ao grupo controle. Os resultados mostram a média \pm desvio padrão, onde foi utilizado ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, com $P < 0,05$.

4.2. ANÁLISE DO VOLUME CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM *E. oleracea* LIOFILIZADA

A avaliação do resultado do volume celular foi feito através de um histograma, o controle sem tratamento é representado pelo pico de cor preta, sendo considerada a referência, ou seja, macrófagos com morfologia de células residentes sem alteração no volume celular. Quando o pico se desloca

para direita é indicativo de aumento do volume celular, enquanto que, quando o pico se desloca para esquerda é indício de redução do volume celular. No presente estudo foi observado que não ocorreu deslocamentos dos picos correspondentes às células tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de *E. oleracea* liofilizada quando comparado ao grupo controle (Figura 6).

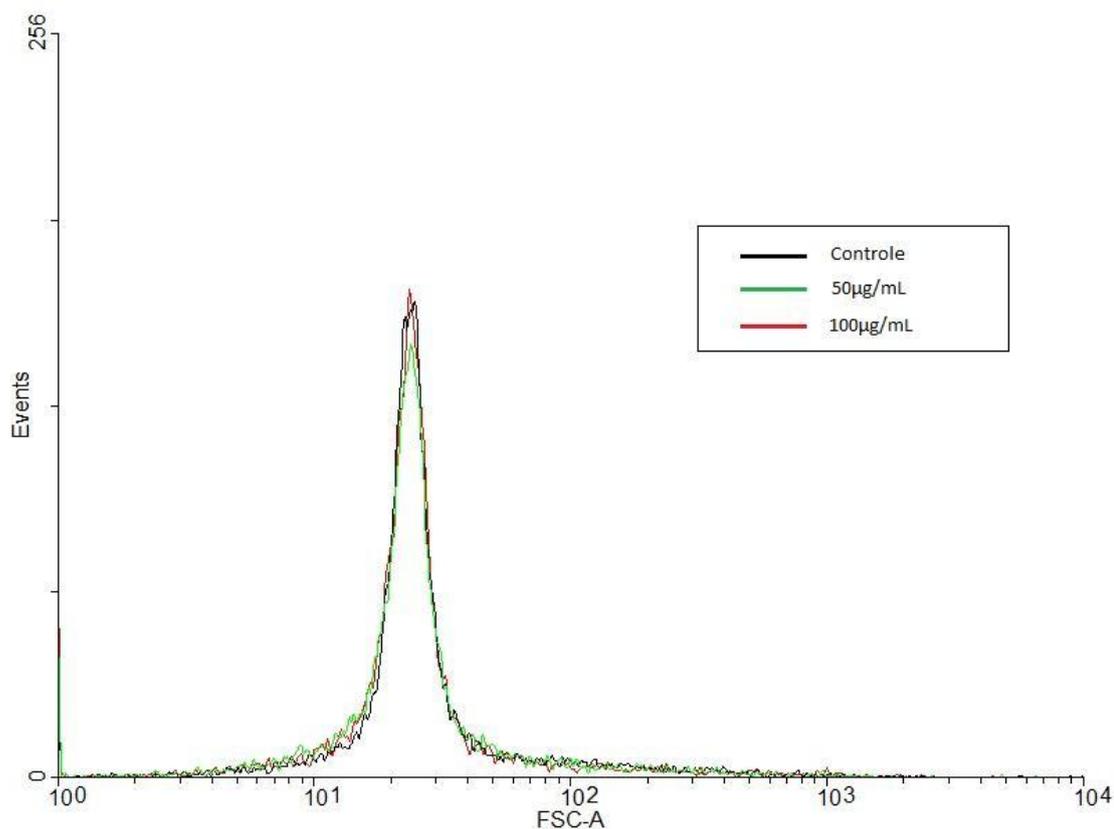


Figura 6: Análise do volume celular de macrófagos tratados com *E. oleracea* liofilizada através do marcador Alamar Blue®, sendo em preto o grupo controle, em verde a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e em vermelho a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA COM O SUCO CLARIFICADO LIOFILIZADO DE *Euterpe oleracea*

O efeito de *E. Oleracea* sobre as formas promastigotas foi observado após 72 horas de tratamento, onde demonstra que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de promastigotas em relação ao grupo controle (Figura 7).

A anfotericina B, usada como droga de referência, foi utilizada como controle positivo. Foi observado que a droga promoveu uma diminuição considerável na viabilidade dos parasitos em relação ao controle.

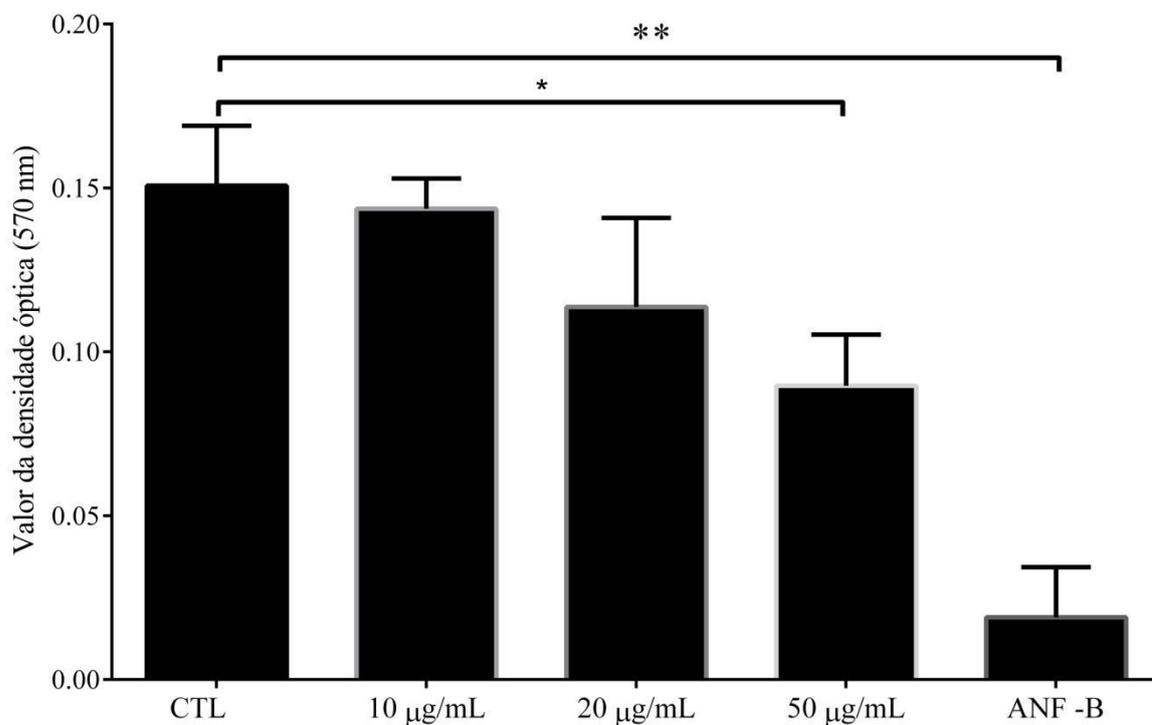


Figura 7: Efeito de *E.oleracea* liofilizada sobre as formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL após 72 horas do tratamento. Os resultados mostram a média \pm desvio padrão, onde foi utilizado ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * indica um valor de $P < 0,05$, ** indica um valor de $P < 0,01$.

Os Valores do MTT demonstraram uma porcentagem de redução de parasitos viáveis de: 0% para diluição de 10 µg/mL, de 9,6% para a diluição de 20 µg/mL e uma redução de 28,6% para a concentração de 50 µg/mL ($IC_{50} = 78,22$ µg/mL).

5. DISCUSSÃO

Atualmente os tratamentos para as leishmanioses são muito invasivos e tóxicos, além disso, muitos pacientes demonstram-se refratários ao tratamento e o surgimento de cepas resistentes torna a terapia limitada (Patel & Sethi, 2009). Em decorrência desta problemática sobre o tratamento é necessário a busca por novos medicamentos que possam atuar seletivamente no parasito *Leishmania* ou que possam promover a ativação da célula hospedeira sem causar dano a mesma. Neste contexto, os produtos naturais vêm ganhando destaque principalmente pela sua fácil obtenção e por serem encontrados em grande quantidade na floresta Amazônica (Braga *et al.*, 2007; Khademvatan *et al.*, 2016). Dentre esses produtos naturais, a *E. oleracea* vem sendo bastante estudada e recentemente foi demonstrado inúmeras funções biológicas deste composto (Barbosa *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016), o que a torna atrativa para realização de estudos para a busca de novos medicamentos.

Este estudo mostra pela primeira vez a ação do suco comercial clarificado do açaí liofilizado sobre o protozoário *L. (V.) braziliensis* e sua célula hospedeira. A análise da viabilidade celular é muito importante para estudos de possíveis fármacos contra *Leishmania* ou outros patógenos, visto que, as drogas que apresentam pouco ou nenhum efeito tóxico para célula são mais atrativas para tratamentos, principalmente em casos de doenças que necessitam de um longo período. Portanto, em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos o ensaio de viabilidade celular acaba sendo o primeiro passo do estudo.

A análise de viabilidade celular pelo método MTT e pela marcação com Alamar Blue® mostrou que não ocorreu redução da viabilidade dos macrófagos da linhagem J774. Da Silva (2016) mostrou que o suco comercial clarificado de *E. oleracea* (EO) nas diluições 1:12,5, 1:25 e 1:50 não promoveu redução da viabilidade de macrófagos peritoneais de murinos tratados por 72 horas, corroborando com os resultados observados no presente estudo. Os resultados obtidos pelos ensaios de viabilidade celular sugerem que *E. oleracea* pode ser uma alternativa promissora e segura para o desenvolvimento de um novo agente leishmanicida, uma vez que não foi observado efeito

citotóxico. Desta forma, o presente estudo pode ser continuado para avaliar a ação do composto sobre modulação da resposta celular dos macrófagos e o protozoário *Leishmania*.

A análise com o marcador Alamar Blue® também permite avaliar alterações morfológicas, principalmente o aumento do tamanho celular. O aumento da área celular é observado quando o macrófago está passando por um processo de ativação celular induzida por citocinas pró-inflamatórias, que é característico de um perfil imunológico M1, enquanto que células residentes e de perfil M2 apresentam tamanho celular menor quando comparado aos macrófagos M1 (Abbas, 2012). Neste estudo, os resultados demonstraram que a *E. oleracea* liofilizada não promoveu alteração no tamanho celular de macrófagos J774. Da Silva (2016) observou em seu estudo que a *Euterpe oleracea* não induziu aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, INF- γ e TNF- α) e nem do tamanho celular de macrófagos peritoneais, porém induziu aumento da citocina IL-10, citocina anti-inflamatória secretada por macrófagos do tipo M2. Com base nos resultados da marcação com Alamar Blue® é possível inferir que *E. oleracea* provavelmente esteja promovendo uma ativação do tipo M2 em macrófagos J774, porém são necessários ensaios adicionais para comprovar essa hipótese, principalmente a dosagem de citocinas.

Na literatura é conhecido que *E. oleracea* apresenta em sua composição flavonóides que possuem efeitos anti-inflamatórios (González-Gallego *et al*, 2007; García-Lafuente *et al*, 2009). A volutina, um flavonóide encontrado no açaí, demonstrou diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6 (Xie *et al*, 2012). É interessante comentar que a ação leishmanicida de inúmeras plantas está associada com a presença de flavonóides em sua composição (Ramírez-Macías *et al*, 2012). Como *E. Oleracea* é constituído por uma grande quantidade de flavonóide e apresenta ação leishmanicida contra as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. infantum chagasi* (Da Silva, 2016), se torna interessante avaliar a ação suco clarificado de *E. oleracea* liofilizada sobre promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Na literatura foi demonstrado que alguns sucos de frutas apresentam atividade leishmanicida. O suco de fruta de *Morinda citrifolia* Linn. induziu alterações ultraestruturais de promastigotas de *L. infantum* tais como:

vacuolização citoplasmática, inclusão lipídica, aumento da atividade de exocitose, indução da via autofágica e perda de integridade celular levando a morte do parasito (Almeida-souza *et al*, 2016).

A atividade antipromastigota demonstrou que *E. oleracea* liofilizada promoveu pouca redução na viabilidade da *L. (V.) braziliensis*, aproximadamente 30% ($IC_{50} = 78,22 \mu\text{g/mL}$), entretanto, por ser um estudo inicial, é necessário avaliar a ação deste produto natural contra as formas amastigotas, que é a forma evolutiva encontrada nas lesões.

Este trabalho demonstrou pela primeira vez a ação do suco comercial clarificado liofilizado do açaí, um produto natural encontrado com grande abundância na região Amazônica, sobre macrófagos J774 e promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Logo, é possível sugerir que esse composto apresenta características favoráveis para o desenvolvimento de um novo agente leishmanicida, porém ensaios adicionais devem ser realizados, principalmente contras as formas amastigotas para confirmar seu potencial terapêutico contra o protozoário *Leishmania*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos mostraram que o suco comercial clarificado liofilizado de *E. oleracea*:

1. Não é citotóxico para macrófagos da linhagem J774
2. Não foi capaz de alterar o tamanho celular dos macrófagos;
3. Reduziu a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LIGTHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Biologia Celular e Molecular**, 7^o Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2012.
- ALCOLEA, P. J.; ANA, A.; GÓMEZ, M. J. *et al.* Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **MC Genomics**, **14**: 11-31, 2010.
- ALFADDA A. A.; SALLAM R. M. Reactive oxygen species in health and disease, **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **2012**: 1-14, 2012.
- ALMEIDA-SOUZA, F; TANIWAKI, N. N.; AMARAL A. C., *et al.* Ultrastructural Changes and Death of *Leishmania infantum* Promastigotes Induced by *Morinda citrifolia* Linn. Fruit (Noni) Juice Treatment. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.** 1-9, 2016.
- APEL K.; HIRT H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, **Annu. Rev. Plant Biol**, **55**: 373–399, 2004.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol. Feb**, **56**:143-53, 2007.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, **25**: 203-221, 2007.
- BARBOSA, P. O.; SILCA, C. T.; SOUZA, M. O. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition** **32**: 674–680, 2016.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol**, **37**: 1097-1106, 2007
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol**, **111**: 396-402, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Editora MS, 2^a Ed., 2010.

- CHOW, A.; BROWN B. D.; MERAD, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age **Nature Reviews**, **11**: 788-798, 2011.
- CORRALES, R. M.; SERENO, D.; MATHIEU-DAUDÉ, F. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, **58**: 27-38, 2010.
- CORRÊA, C. B.; CABRAL, L. M. C.; DELIZA, R.; MATTA, V. M. Obtenção de suco misto de açaí a partir da fração retida no processo de microfiltração. **Alim. Nutr**, **21**: 377-383, 2010.
- COSTA FILHO, A. V.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, **41**: 424-427, 2008.
- DA SILVA, B. J. M. **Ação leishmanicida in vitro de produtos naturais encontrados na região amazônica**. Qualificação de tese de Doutorado. Belém. Universidade Federal do Pará, 2016. 112p.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, **22(6)**: 491-502, 2009.
- DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Curr Pharm**, **14**: 822-838, 2008.
- DEL POZO-INSFRAN, S.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T.; Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **J. Agric. Food Chem.**, **54 (4)**, 1222 -1229, 2006
- DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKANEN, O.; KIEC-WILC, B.; MYKKANEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **British Journal of Nutrition**, **99**: 109-117 2008.
- DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, **5**: 1-12 2014
- FAVACHO, H. S. A.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Revista Brasileira de Farmacologia**, **21(1)**: 105-114, 2011.

- FIELD, M. C, CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat. Rev. Microbiol**, **7**: 775-786, 2009.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. in vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol. Lett.**, **160**: 171-177, 2006.
- GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; *et al.* Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai palm) **Chromatographia**, **59**: 739-743, 2004.
- GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; *et al.* Cyanidins: metabolism and biological properties, **Journal of Nutritional Biochemistry**, **15**: 2–11, 2004.
- GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; *et al.* Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease, **Inflammation Research**, **58 (9)**: 537–552, 2009.
- GLUENZ, E.; GINGER, M.L.; MCKEAN, P.G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Curr. Opin. Microbiol**, **13**: 473-479, 2010.
- GONZALEZ-GALLEGO, J. SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids, **Nutricion Hospitalaria**, **22 (3)**: 287–293, 2007.
- GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry** **133**: 256–263, 2012.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, **8**: 419-33, 2010.
- HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Clinical perspectives. **J. AM. ACAD. DERMATOL**: 897-908, 2015.
- HORTELANO, S.; TRAVÉS, P. G.; ZEINI, M.; *et al.* Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages:

- contribution to the physiological function of activated macrophages: **J. Immunol**, **171**: 6059-6064, 2003.
- JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M. *et al.* *In Vitro* and *in Vivo* Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study **J. Agric. Food Chem**, **56**: 8326–8333, 2008.
- KANG, H.; KWON, S. R.; CHOI, H. Y. Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* L. Var *franchetii* extract and its chloroform fraction on LPS or LPS/IFN- γ stimulated inflammatory response in peritoneal macrophages. **J. Ethnopharmacol**, **24**: 95-101, 2011.
- KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C. *et al.* Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry** **133**: 671–677 2012.
- KAMWAVI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: Friends or foes?. **Trends Parasit.** **22 (9)**: 439-445, 2006.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, **9**: 604-15, 2011.
- KHADEM VATAN, S.; ESKANDARI, S.; SAKI, J; *et al.* Cytotoxic Activity of *Holothuria leucospilota* Extract against *Leishmania infantum* *In Vitro*. **Advances in Pharmacological Sciences**, **2016**: 1-6, 2016.
- KLING, J. C.; KÖRNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, **43**: 417–425, 2013.
- LANCASTER, M. V.; FIELDS, R. D. antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. **U.S. Patent No. 5**, 501, 959, 1996.
- LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, **115**: 1-17, 2001.
- MATTA, V. M.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; DONÂNGELO, C. M. Açai Clarificado por Microfiltração. **Embrapa Agroindústria de Alimentos Comunicado Técnico**, **165**: 1-4, 2010.

- MAURER, M.; DONDI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Med Microbiol Immunol**, 198: 137-146, 2009.
- MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta amazônica**, **38 (2)**: 311-316, 2008.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol**, 8: 958-969, 2008.
- OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C. H. Cultivo do Açaizeiro para Produção de Frutos. **Embrapa Amazônia Oriental, Circular Técnica**, **26**. 2002.
- OLIVEIRA, M. S.; NETO, J. T. F.; PENA, R. S. Açaí: Técnicas de cultivo e processamento. **Semana da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria / VII Flor Pará**, 104 p., 2007.
- PARIS, C.; PHILIPPE, M. L.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48: 852-859, 2004.
- PATEL, S.; SETHI, A. Imported tropical diseases. **Dermatol Ther**, **22(6)**: 538-49, 2009.
- PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, **80 (16)**:7-8, 2004.
- POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **Int. J. Mol. Med**, **22 (3)**: 277-86, 2008.
- RAMÍREZ-MACÍAS I.; MARÍN C.; DÍAZ J. G.; *et al.* Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*. **Scientific World Journal**, **2012**. 2012.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, **7**: 581-96, 2007.
- ROBINSON, J. M.; SEGUCHI, H.; BADWEY, J. A. Active oxygen and nitrogen species in biology: from cytotoxic agents or signaling intermediates. **Histochem Cell Biology**, **122**: 173-275, 2004.
- SANTA-RITA, R. M. HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA H. S.; DE CASTRO S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine

- and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob. Chemother**, **54**: 704–710, 2004.
- SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; *et al.* Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J. Ethnopharmacol**, **120**: 204-208, 2008.
- SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E. *et al.* Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition** **26** 804–810, 2010.
- SOUZA-MONTEIRO, J. R.; SANTANA-COELHO, D.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; *et al.* Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochemistry International** **90**: 20-27. 2015.
- TEIXEIRA, D. E. *et al.* Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1º Ed. Rio de Janeiro. **Fundação CECIERJ**, Consórcio CEDERJ, 2013.
- UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nature Reviews**, **12**: 492-502, 2012.
- VERMELHO, A. B.; SUPURAN, C. T.; CARDOSO, V. *et al.* leishmaniasis: possible new strategies for treatment, leishmaniasis - **trends in epidemiology, diagnosis and treatment**, 2014. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/leishmaniasis-possible-newstrategies-for-treatment>.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, **316**: 1-16, 2010.
- WHO. **Control of the leishmaniasis**. **949**. Geneva, 22–26 March 2010. Acessado pela última vez no dia 02/02/2017.
- WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell. Mol. Life Sci.**, **71**: 1245–1263, 2014.
- XIE, C.; KANG, J.; LI, Z. The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **23**: 1184–1191, 2012.