

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Avaliação “in vitro” do potencial amebicida de extratos brutos e triterpenos
obtidos a partir de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), sobre *Entamoeba
histolytica***

Thaisa Helena Silva Fonseca

Belo Horizonte – MG

2012

Thaís Helena Silva Fonseca

Avaliação “in vitro” do potencial amebicida de extratos brutos e triterpenos obtidos a partir de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), sobre *Entamoeba histolytica*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Gomes
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Haendel Gonçalves N.O. Busatti
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2012

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser explorado, do que é belo e moralmente correto.”

(Albert Einstein)

Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro da Pró-Reitoria de Extensão e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Ao meu pai Osvaldo,
minha mãe Geruza,
meu irmão Ricardo,
e ao meu noivo João Felipe,
pela vida, companheirismo e imenso amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa de sua coordenadora Professora Érica Martins Braga, pela oportunidade concedida, confiança, formação e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar em minha vida pessoas tão amáveis e generosas;

À minha orientadora Maria Aparecida Gomes pela valiosa oportunidade, orientação, amizade e por tornar possível a realização deste sonho;

Ao meu co-orientador Haendel Gonçalves Nogueira Oliveira Busatti pela disponibilidade, carinho, amizade e ensinamentos;

À Edna, Joãozinho e Prof. Edward, pelo convívio enriquecedor, conselhos oportunos e suporte técnico;

As estagiárias e grandes amigas Michelle Chacon e Carla Ribeiro pela dedicação, apoio e alegre convivência. Vocês tornam o meu dia a dia muito mais feliz;

Aos amigos do Laboratório de Amebíase Luciana Ventura, Joice, Frederico, Jéssica, Dirce, Nicole, Mayana e Ariane, pelo companheirismo;

Aos colegas do NEPLAM, em especial ao amigo Fernando, pela paciência, confiança e parceria;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Fisiologia – UFMG pela colaboração;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara e Sibebe, pela atenção em todos os momentos;

Aos amigos da turma de mestrado (“turma do pepino”), pela agradável rotina, troca de experiências e afeto;

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos;

À todos que passaram por mim durante o mestrado, colaborando, mesmo que indiretamente, para meu crescimento pessoal e profissional;

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Quadros.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Histórico.....	17
Morfologia e Biologia.....	18
Ciclo biológico.....	21
Transmissão e Fatores de Risco.....	23
Epidemiologia.....	24
Manifestações clínicas.....	27
Amebíase intestinal.....	28
Colites não disentéricas.....	28
Colite amebiana aguda.....	28
Colite fulminante e megacólon tóxico.....	29
Amebomas.....	29
Amebíase extra-intestinal.....	29
Amebíase hepática.....	29
Amebíase pleuropulmonar.....	30
Diagnóstico.....	30
Tratamento.....	33
Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....	35
Familia Celastraceae.....	37
<i>Maytenus gonoclada</i>	40
Justificativa.....	42
Objetivos.....	44

Objetivo geral.....	44
Objetivos específicos.....	44
Materiais e Métodos.....	45
Cepa de <i>E. histolytica</i> e manutenção do parasito.....	45
Coleta e identificação do material vegetal.....	45
Extratos brutos de galhos e raízes de <i>Maytenus gonoclada</i>	45
Isolamento de triterpenos de <i>M. gonoclada</i>	50
Padronização do inóculo.....	52
Teste preliminar.....	53
Determinação da IC ₅₀	53
Padronização da técnica	53
Avaliação da citotoxicidade.....	54
Células mononucleares do sangue periférico humano.....	54
Avaliação da viabilidade e proliferação celular.....	55
Análise estatística.....	56
Resultados.....	58
Inóculo de <i>E. histolytica</i> “in vitro”.....	58
Atividade dos extratos brutos e triterpenos sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i> “in vitro”.....	59
IC ₅₀ do MTZ e tingenona.....	60
Ensaio de citotoxicidade.....	71
Discussão.....	72
Conclusão.....	78
Referências.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de cistos de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> corado com tricrômio.....	20
Figura 2 - Foto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> corado com iodo (A) e tricrômio (B).....	21
Figura 3 - Ciclo biológico.....	23
Figura 4 - Incidência de amebíase intestinal no México entre 2003-2008.....	25
Figura 5 - Zonas endêmicas de amebíase no mundo.....	27
Figura 6 - Distribuição geográfica da família Celastraceae.....	38
Figura 7 - Fotos de <i>Maytenus gonoclada</i> e <i>Maytenus salicifolia</i>	41
Figura 8 - Esquema do preparo dos extratos de galhos de <i>M. gonoclada</i>	47
Figura 9 - Fotos de cascas e cernes de raízes de <i>M. gonoclada</i>	47
Figura 10 - Esquema do preparo dos extratos de cascas de raízes de <i>M. gonoclada</i>	48
Figura 11 - Esquema do preparo dos extratos de cernes de raízes de <i>M. gonoclada</i>	49
Figura 12 - Foto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (40.000/mL) (10X).....	57
Figura 13 - Foto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (60.000/mL) (10X).....	58
Figura 14 - Gráfico de Dispersão MTZ 24 h (Inibição x Concentração).....	59
Figura 15 - Gráfico de Dispersão MTZ 24 h (Inibição x Ln [Concentração]).....	60
Figura 16 - Gráfico de Dispersão MTZ 48 h (Inibição x Concentração).....	62
Figura 17 - Gráfico de Dispersão MTZ 48 h (Inibição x Ln[Concentração]).....	63
Figura 18 - Gráfico de Dispersão Tingenona 24 h (Inibição x Concentração).....	65
Figura 19 - Gráfico de Dispersão tingenona 24 h (Inibição x Ln[Concentração]).....	65
Figura 20 - Gráfico de Dispersão tingenona 48 h (Inibição x Concentração).....	67
Figura 21 - Gráfico de Dispersão tingenona 48 h (Inibição x Ln[Concentração]).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelo de regressão final (MTZ - 24 h).....	61
Tabela 2 - Intervalo da IC ₅₀ (MTZ - 24 h).....	63
Tabela 3 - Modelo de regressão final (MTZ - 48 h).....	64
Tabela 4 - Intervalo da IC ₅₀ (MTZ - 48 h).....	65
Tabela 5 - Modelo de regressão final (Tingenona - 24 h).....	67
Tabela 6 - Intervalo da IC ₅₀ (Tingenona - 24 h).....	68
Tabela 7 - Modelo de regressão final (Tingenona - 48 h).....	70
Tabela 8: Intervalo da IC ₅₀ (Tingenona - 48 h).....	71
Tabela 9 - Citotoxicidade do MTZ e da tingenona sobre PBMC.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro I - Espécies do gênero <i>Maytenus</i> utilizadas na medicina popular.....	39
Quadro II - Extratos brutos obtidos de <i>Maytenus gonoclada</i>	49
Quadro III - Estrutura química e massa molar de triterpenos isolados de <i>M. gonoclada</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA - Abscesso Hepático Amebiano

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Adenosina Trifosfato

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HEMOMINAS - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

IC₅₀ – Concentração capaz de reduzir em 50% o crescimento dos trofozoítos

Ln – Logaritmo natural ou neperiano

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MTZ - Metronidazol

PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PHA – Fitohemaglutinina

WHO – World Health Organization

μM - Micromolar

RESUMO

A amebíase é uma doença humana causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, um parasito patogênico e invasivo que causa morte de cerca de 100 mil indivíduos por ano em todo mundo. Algumas espécies do gênero *Maytenus* têm sido utilizadas na medicina popular brasileira para tratamento da diarreia. Estas plantas são promissoras fontes de triterpenos bioativos de interesse medicinal. Doze extratos brutos e quatro triterpenos, previamente conhecidos, isolados a partir de galhos e raízes de *Maytenus gonoclada*, foram investigados “in vitro” em relação ao potencial amebicida em diferentes intervalos de tempo. Extratos brutos, lupeol, 3 β -30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno e 3-oxo-11 α -hidroxilup-20 (29)-eno não exibiram atividade contra *E. histolytica*, contudo, o triterpeno tingenona foi ativo. A citotoxicidade da tingenona foi avaliada utilizando células mononucleares do sangue periférico humano. A IC₅₀ encontrada foi de 8,9 μ M. Neste caso a dose citotóxica está muito próxima da dose amebicida, inviabilizando o prosseguimento dos estudos com a substância “in natura”. A citotoxicidade da tingenona sobre células humanas poderia constituir restrição para seu emprego em tratamentos antiparasitários. Contudo a facilidade de obtenção e grandes quantidades, sinaliza sua utilização para modificações na estrutura da molécula visando obter derivados com potente atividade e menor toxicidade.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*; *Maytenus gonoclada*; Tingenona

ABSTRACT

Amebiasis is a human disease caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*, a parasite that causes invasive pathogenic and death of about 100.000 individuals per year worldwide. Some species of the genus *Maytenus* have been used in Brazilian folk medicine to treat diarrhea. These plants are promising sources of bioactive triterpenes of medicinal interest. Twelve extracts and four triterpenes, previously known, isolated from the branches and roots of *Maytenus gonoclada* were investigated "in vitro" against potential amoebicide at different time intervals. Crude extracts, lupeol, 3 β -30-dihydroxy-lup-20 (29)-ene and 3-oxo-11 α -hydroxylup-20 (29)-ene exhibited no activity against *E. histolytica*, however, the triterpene tingenone was active. The cytotoxicity was evaluated using the tingenone mononuclear cells human peripheral blood. The IC₅₀ of 8.9 μ M was found. In this case the cytotoxic dose is very close to the dose amoebicide, precluding further studies with substance "in nature". The cytotoxicity of tingenone on human cells could be restricted to its use in parasite treatments. However the ease of obtaining large amounts and, pointing their use for changes in the structure of the molecule to obtain derivatives with potent activity and lower toxicity.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; *Maytenus gonoclada*; Tingenone

1.INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Infecções intestinais foram relatadas, desde a Grécia Antiga, pelo filósofo e médico Hipócrates (460-377 a.C), o qual fez a primeira referência a uma “doença mortífera” que acometia indivíduos portadores de febre e disenteria (Tanyuksel & Petri 2003).

A primeira observação de amebas nas fezes foi feita por Lambl (1860), em um caso de diarreia infantil e, posteriormente, por Cunningham (1871), que as identificou nas fezes de um indivíduo com cólera na Índia (Silva 1997). Em 1875, o pesquisador Friedrich Aleksandrovich Lösch (1840-1903) observou um grande número de microrganismos nas fezes de um camponês russo que sofria de disenteria crônica. Lösch, então, infectou cães com as fezes deste paciente e após a necropsia dos animais, visualizou-se um numeroso e intenso processo ulcerativo na mucosa do cólon com a presença de muitas amebas. Estas amebas foram então denominadas de *Amoeba coli* (Ackers 2002).

Segundo Imperato (1981), a descrição patológica da invasão do intestino e do fígado por amebas foi realizada por Councilman & Lafleur em 1891. Estes foram os primeiros pesquisadores a utilizarem as expressões “abscesso amebiano do fígado”, “disenteria amebiana” e a sugerir a denominação *Amoeba dysenteriae* para o parasito.

Quincke & Roos (1893) descreveram detalhadamente o trofozoíto e evidenciaram a presença de cistos nas fezes, descrevendo-os como estruturas arredondadas, com parede bem definida. Em 1903, Fritz Schaudinn (1871-1906) demonstrou a existência de dois tipos de ameba infectando o homem, uma patogênica e outra não, denominando a forma não patogênica de *Entamoeba coli* e a patogênica de *Entamoeba histolytica*, devido a sua grande habilidade de lisar tecidos (Martínez-Baez 1989).

Várias teorias tentaram explicar o comportamento patogênico da *E. histolytica*. De acordo com a teoria unicista proposta por Dobell (1919), a *E. histolytica* constitui uma espécie produtora de cistos tetranucleados, não patogênica, que poderia se tornar virulenta de acordo com as influências da flora bacteriana intestinal ou fatores ambientais desconhecidos (Clark 1998).

A teoria dualista proposta por Brumpt (1877-1951), em 1925, definiu a existência de duas espécies de amebas morfologicamente idênticas, porém biologicamente diferentes, habitando o intestino humano: uma patogênica capaz de produzir doença, e outra não patogênica que viveria no intestino como comensal (Clark 1998). Esta teoria não foi muito aceita pela comunidade científica da época, devido à inexistência de métodos para distinguir as espécies.

A teoria neodualista proposta por Hoare (1961) afirmou que a *E. histolytica* apresenta um potencial patogênico variado, com cepas apresentando diferentes graus de virulência, sendo responsáveis por casos assintomáticos ou formas graves da doença (Silva 2006).

Após o século XX, a teoria dualista começou a ganhar adeptos, devido a observações feitas por Sargeant e colaboradores ao ressaltarem diferenças no perfil isoenzimático de isolados patogênicos e não patogênicos, correlacionando-os com a forma clínica e parâmetros biológicos de *E. histolytica* (Tanyuksel & Petri 2003). Em 1993, considerando evidências bioquímicas, imunológicas e genéticas, Clark e Diamond confirmaram a existência das duas espécies morfologicamente idênticas proposta por Brumpt (1925), sugerindo o nome de *Entamoeba dispar* para a espécie não patogênica (Pinilla *et al.* 2008).

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a apoiar a teoria dualista, confirmando a existência da *E. dispar*. Os pesquisadores presentes em um seminário sobre amebíase, realizado no México, concluíram que o critério de tamanho utilizado para a descrição taxonômica clássica da *E. histolytica* não serve para distingui-la da *E. dispar* e, além disso, quando o diagnóstico for feito por microscopia óptica, deve ser registrado como *E. histolytica/E. dispar* (Ackers 2002).

1.2 Morfologia e biologia

De acordo com o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade Internacional de Protozoologia, o protozoário *E. histolytica* pertence ao Reino Protista, Filo Sarcocystophora, Classe Lobosea, Ordem Amoebida, Família Endamoebidae e Gênero *Entamoeba* (Martínez-Girón *et al.*, 2008)

Em seu ciclo de vida, a *E. histolytica* apresenta quatro estágios evolutivos, conhecidos como: trofozoítos, pré-cistos, cistos e metacistos. Os cistos e trofozoítos são fases bem definidas do parasito, entretanto, os pré-cistos e metacistos são fases intermediárias. O pré-cisto é ligeiramente arredondado, menor que os trofozoítos e possuem corpos cromatóides em forma de bastonete no citoplasma. O metacisto trata-se de uma forma multinucleada liberada pelo cisto no intestino delgado, que após várias divisões nucleares e citoplasmáticas originará trofozoítos metacísticos (Neves *et al*, 2011).

O cisto corresponde a um estágio evolutivo com metabolismo reduzido. É considerada a forma de resistência do parasito, devido a sua capacidade de sobreviver fora do hospedeiro por semanas resistindo à acidificação, cloração, dissecação, bem como outros estresses ambientais. Entretanto, em ambiente externo, quando submetidos a temperaturas inferiores a 5 °C ou superiores a 40 °C são rapidamente destruídos (Huston *et al*, 1999; Samie *et al*. 2012). Os cistos são observados em fezes sólidas ou pastosas do hospedeiro, são esféricos, ovóides ou irregulares com parede refratária bastante rígida, composta por quitina. Medem de 10 a 15 µm de diâmetro, contém de 1 a 4 núcleos revestidos com grânulos de cromatina, cariossoma pequeno e central (Figura 1). O citoplasma dos cistos possui vacúolos contendo glicogênio e membrana nuclear ligeiramente visível. Os corpos cromatóides, compostos de ácido ribonucléico, são visualizados, em forma de bastão ou charuto, no citoplasma (Stanley 2003).

Ao contrário dos cistos, os trofozoítos de *E. histolytica* são móveis e variam o tamanho entre 10 a 40 µm de diâmetro, podendo chegar a 60 µm nas formas teciduais. Geralmente, possuem apenas um núcleo, medindo de 4 a 7 µm, com cariossoma central, membrana nuclear delgada e cromatina uniforme sob a forma de finos grânulos na periferia da carioteca. O citoplasma contém vacúolos e é diferenciado em ectoplasma (claro e hialino) e endoplasma (granuloso) (Figura 2) (Neves *et al*, 2011).

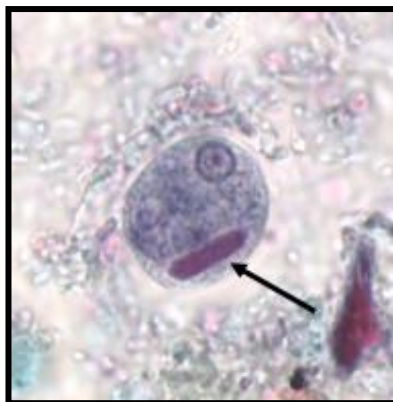


Figura 1. Foto de cistos de *E. histolytica/E. dispar* corado com tricrômio. Corpo cromatóide em forma de bastão (seta)

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Os trofozoítos alimentam-se por meio da fagocitose de bactérias e restos de matéria orgânica em decomposição ou por pinocitose de nutrientes líquidos, tendo como ambiente natural o intestino grosso. São essencialmente organismos anaeróbios, entretanto, são capazes de crescer em atmosferas com até 5% de oxigênio. Trofozoítos são facilmente destruídos no ambiente externo, degenerando em poucos minutos (Tanyuksel & Petri 2003).

Segundo Silva (1997), o extremo pleomorfismo dos trofozoítos de *E. histolytica* fica bastante evidente quando examinado pela microscopia eletrônica de varredura. As superfícies dos trofozoítos são geralmente irregulares, sendo observadas proeminências alternadas com pregas e sulcos ligeiramente profundos. Estudos sobre a ultraestrutura dos trofozoítos mostram que a *E. histolytica* não apresenta retículo endoplasmático, complexo de Golgi, centríolos, microtúbulos e mitocôndria. Em relação à locomoção, esta ocorre através de pseudópodes grossos ou lobópodes e a energia para a constante movimentação provém da conversão anaeróbica da glicose e piruvato em etanol (Stanley 2003).

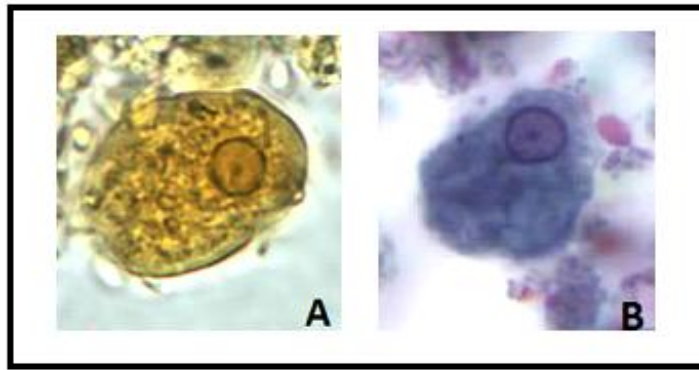


Figura 2. Foto de trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* corado com iodo (A) e tricrômio (B).

Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx

1.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida do parasito é considerado relativamente simples, sendo classificado como monoxênico, ou seja, se processa em um único hospedeiro: o homem (Figura 3).

A infecção normalmente se inicia pela ingestão de cistos maduros (forma infectante) presentes em água ou alimentos. Após a ingestão, a parede cística fornece proteção contra o baixo pH do estômago e as enzimas gastrointestinais, favorecendo a passagem das formas infectantes pelo estômago do indivíduo (Zlobl 2001). Chegando ao intestino delgado, na porção terminal do íleo, ocorre o desencistamento e liberação do metacisto através de uma fenda na parede cística (Neves *et al*, 2011). Os fatores que induzem o desencistamento ainda não estão totalmente esclarecidos, provavelmente sais inorgânicos, meio alcalino, baixa tensão de oxigênio e apropriadas condições osmóticas do ambiente intestinal influenciam neste processo (Ravdin 1988).

Após sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, o metacisto origina quatro e, posteriormente, oito trofozoítos, chamados trofozoítos metacísticos. Estes trofozoítos são levados pelo bolo alimentar até o intestino grosso, colonizam o local e se alimentam de bactérias e restos celulares (Zlobl 2001; Haque *et al*, 2003; Wisner 2010). Segundo Haque e colaboradores (2003), durante o processo de desencistamento no lúmen intestinal, os

trofozoítos produzidos se aderem às mucinas do cólon e, assim, colonizam o intestino grosso do indivíduo.

A *E. histolytica*, geralmente, persiste por meses ou anos no intestino como comensais, no entanto, ocasionalmente alguns trofozoítos invadem a submucosa intestinal, multiplicam-se ativamente no interior das úlceras, atravessam a circulação porta e atingem órgãos como fígado, pulmão, rim, pele ou cérebro, causando a amebíase extra-intestinal (Eichinger 2001).

Todavia, sobre certas circunstâncias, alguns trofozoítos se desprendem da parede intestinal, sofrem desidratação e eliminam substâncias nutritivas presentes no citoplasma, transformando-se em pré-cistos (Neves *et al*, 2011). Os fatores responsáveis pela indução do encistamento também não são totalmente conhecidos, no entanto, sugere-se que a agregação de trofozoítos na camada de mucina possa desencadear tal processo (Wiser 2010). Além disso, segundo Zlobl (2001), se as condições do lúmen se tornarem adversas a sobrevivência dos trofozoítos, estes podem encistar. Os pré-cistos formados secretam uma parede cística rica em quitina, formam os corpos cromatóides e se transformam em cistos mononucleados. Após duas divisões nucleares, há a formação de cistos (tetranucleados) que chegam, então, ao ambiente através das fezes normais ou formadas, completando o ciclo (Tanyuksel & Petri 2003).

Os cistos tetranucleados tornam-se infectantes imediatamente após sua excreção com as fezes e permanecerão viáveis por semanas dependendo das condições ambientais (Wiser 2010). O intervalo entre a ingestão de cistos deste parasito e o aparecimento dos primeiros sintomas varia de poucos dias a meses ou anos, tornando-se difícil definir o período de incubação da doença (Neves *et al*, 2011).

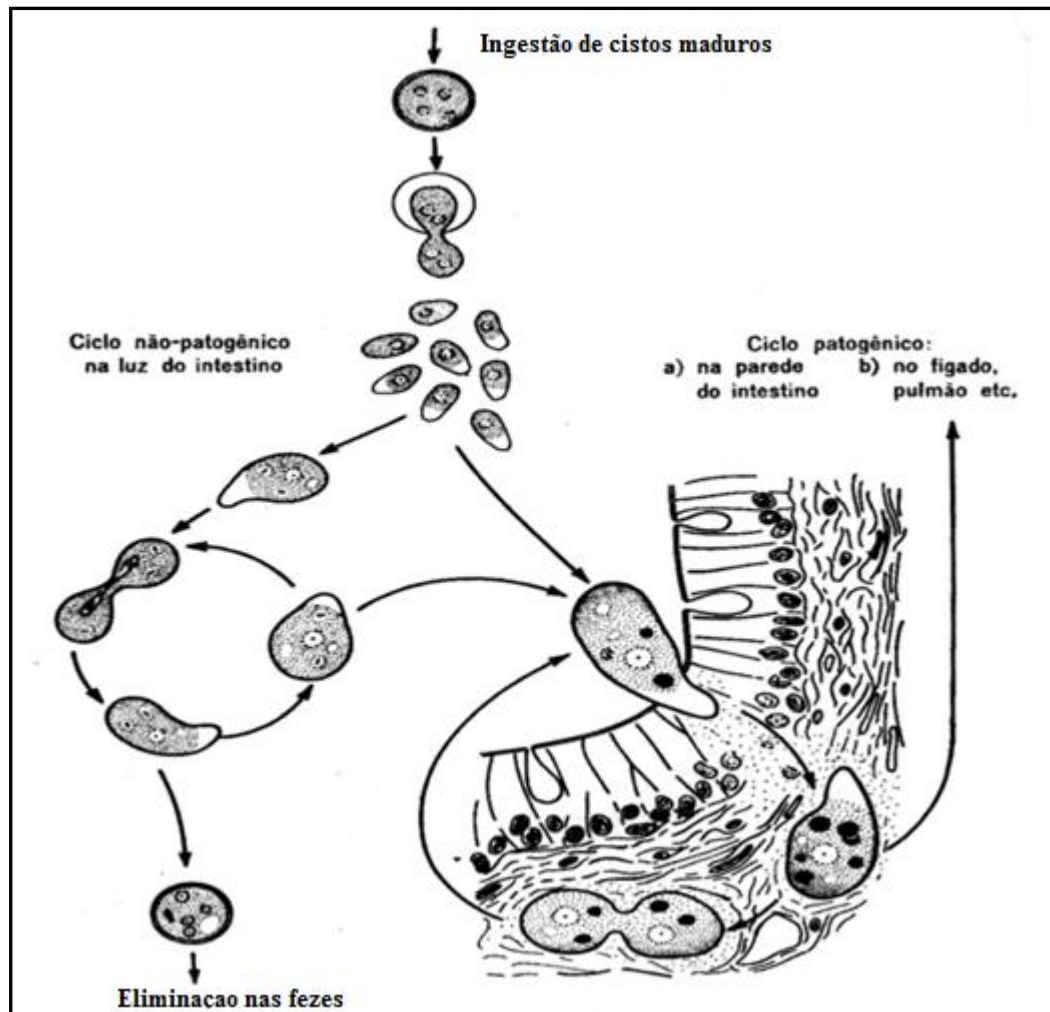


Figura 3. Ciclo biológico

Fonte: Adaptado de Rey, 2010

1.4 Transmissão e fatores de risco

De acordo com documentos publicados em 1997 pela OMS, a amebíase é uma infecção causada pelo protozoário *E. histolytica* com ou sem manifestações clínicas (Ximénez *et al*, 2011). A doença é transmitida, principalmente, pela ingestão de cistos tetranucleados presentes na água ou alimentos contaminados com fezes humanas, consequência das precárias condições sanitárias e higiênicas do ambiente. A infecção também ocorre através de contato pessoa-pessoa (mãos sujas ou objetos contaminados por cistos), como observado em grupos familiares, no qual um único membro infectado é considerado importante fator de risco na transmissão da doença para os demais indivíduos

(Braga *et al*, 2001). É importante ressaltar que os “portadores assintomáticos”, manipuladores de alimentos são os principais disseminadores dessa protozoose (Neves *et al*, 2011).

Existem, ainda, transmissões através do contato sexual oral-anal e por meio de vetores mecânicos, como moscas e baratas, que transportam cistos viáveis e contaminam alimentos (Pai *et al*, 2003). Os trofozoítos não estão envolvidos na transmissão da amebíase, pois, são destruídos quando expostos a enzimas e ao ácido clorídrico do trato gastrointestinal (Reed & Ravdin 1995).

As avaliações de indicadores ambientais, demográficos, socioeconômicos e de saúde são de suma importância para o estudo de diversos problemas de saúde na infância. Através de tais avaliações, torna-se possível identificar os fatores de risco para a morbidade infantil e, em particular, para infecções causadas por *E. histolytica*.

Define-se como fator de risco uma característica ou elemento, endógeno ou exógeno, que se associa à maior probabilidade de desenvolvimento de uma enfermidade (Rover *et al*, 2010). No caso da amebíase, inúmeros são os fatores de risco que favorecem a transmissão da doença: insalubridade, pobreza, condições de superlotação, higiene pessoal precária, exposição fecal em creches, viagem a países em desenvolvimentos, carência de água potável intradomiciliar, relacionamentos homossexuais, desnutrição, gravidez, estado de supressão do sistema imunológico e alcoolismo (Zlobl 2001; Martínez-Girón *et al*, 2008).

1.5 Epidemiologia

Por estar amplamente difundida em todo o mundo, estudos epidemiológicos comprovam que a infecção por *E. histolytica* é endêmica em países em desenvolvimentos de clima temperado e tropical, sendo mais comumente encontrada em locais de baixo nível socioeconômico e condições higiênico-sanitárias inadequadas (Tanyuksel & Petri 2003; Pritt & Clark 2008). Segundo Cunha e colaboradores (1991), a prevalência desta protozoose é bastante variável. Estima-se que a prevalência média da amebíase no mundo seja de aproximadamente 10%, chegando a 80% em países em desenvolvimento e áreas tropicais (Ghoshal & Lakshmi 2002; Ximénez *et al*, 2009).

Em relação às infecções causadas por protozoários, a amebíase constitui a doença humana mais agressiva, perdendo apenas para a malária. De acordo com estimativas atuais, a amebíase infecta aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando em 40.000-100.000 mortes anuais, principalmente em países tropicais e subtropicais (Stanley 2003; Abid *et al*, 2008; Leos-Rivas *et al*, 2011).

A amebíase constitui sério problema de saúde pública em países como México, Índia, Bangladesh, leste e sul da África, Vietnã e em toda a América do Sul (Zlobl 2001). Nas Américas, o México é considerado o país com maior número de casos de amebíase, sendo o local onde ocorrem as formas mais graves da doença (Brandt & Tamayo 1970).

No México, embora as doenças diarréicas estejam diminuindo, e essa circunstância favoreça a redução do número de casos e incidência da amebíase, tal doença continua sendo considerada uma das vinte maiores causas de morbidade no país (Figura 4) (Ximénez *et al*, 2011). A população mais frequentemente afetada possui menos de 15 anos, com notável aumento em crianças de 5 a 9 anos de idade (Ximénez *et al*, 2009).

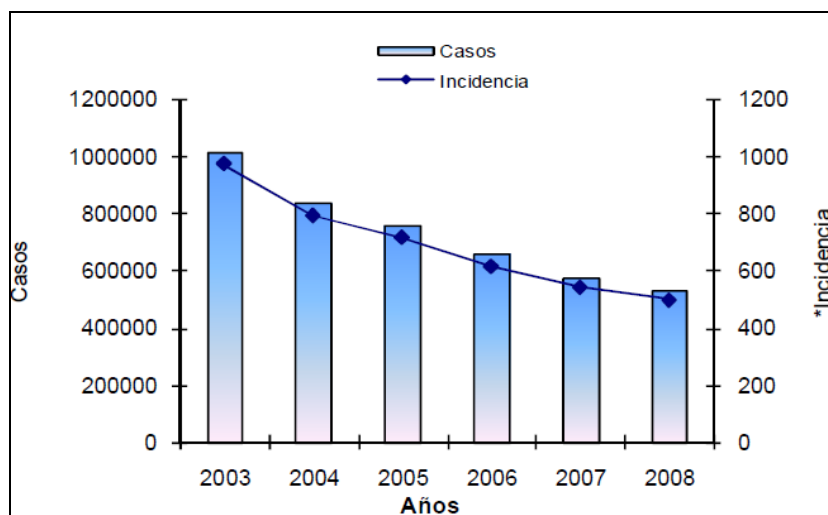


Figura 4 – Casos de incidência de amebíase intestinal no México entre 2003-2008.

Fonte: Secretaria de Salud, 2009

A Ásia é o continente com maior número de pessoas infectadas apresentando 300 milhões de infectados e até 50 mil mortes anuais (WHO 1997). Por razões ainda não esclarecidas, as taxas de incidência de abscesso hepático amebiano no Vietnã são extremamente elevadas, com valores relatados de aproximadamente 21 casos por 100.000

habitantes (Ximénez *et al*, 2009). Na África, a diarreia é responsável por até 75% de todas as doenças da infância (Ximénez *et al*, 2011). O continente apresenta 85 milhões de infectados com alta incidência de amebíase invasiva, e até 30 mil mortes anuais (Guerrant 1986).

No Brasil, a amebíase também constitui um sério problema de saúde pública. Segundo Cunha e colaboradores (1991), a prevalência desta protozoose é bastante variável, nas diferentes regiões do país, assim como sua patogenicidade e virulência. Os índices mais elevados da infecção foram observados em Belém - PA, com cerca de 29% dos indivíduos possuindo o parasito *E. histolytica* (Póvoa *et al*, 2000).

Na Região Amazônica, as precárias condições sociais e econômicas bem como a falta de saneamento básico na maioria das localidades despertou o interesse de vários grupos de pesquisa acerca da prevalência de diversas enteroparasitoses. Segundo Feitosa (1986), a alta frequência de colite disentérica e abscesso hepático amebiano na região Amazônica está relacionada as diferentes cepas de *E. histolytica* presentes no local.

As formas de colite disentérica são pouco frequentes no Brasil, havendo predominância da forma de colite não disentérica. No entanto, considerando a alta porcentagem de assintomáticos infectados com *E. histolytica* no Brasil (Gomes *et al*, 1999) torna-se importante que as distribuições reais da *E. dispar* e da *E. histolytica* sejam determinadas.

Apesar da maioria dos casos de amebíase estarem relacionados a países em desenvolvimento, a doença também é encontrada em países desenvolvidos. Um exemplo desse fato pode ser observado em alguns países industrializados da América do Norte e da Europa, nos quais a amebíase afeta grupos definidos da população, tais como: homens homossexuais, turistas que viajam para áreas endêmicas, doentes mentais institucionalizados e imunodeprimidos HIV positivos (Tanyuksel & Petri 2003).

Nos Estados Unidos, dados relatados sobre a epidemiologia do abscesso hepático amebiano entre 1979-1994 apontaram para a importância dos movimentos migratórios sobre as taxas de morbidade associada à amebíase no período em análise (Ximénez *et al*, 2009). Em 1993, 2.970 casos de amebíase foram relatados nos EUA. Destes casos, 33% eram imigrantes vindos do México, América Central e Sul e 17% vinham da Ásia e Ilhas do Pacífico (Stanley 2003).

As zonas consideradas endêmicas para amebíase no mundo podem ser visualizadas na Figura 5.



Figura 5 – Zonas endêmicas de amebíase no mundo (em verde).
Fonte: http://www.muskadia.com/sante/cartes/amibiases_map.htm

1.6 Manifestações clínicas

Na amebíase observa-se uma grande variedade de síndromes clínicas que refletem o potencial que a *E. histolytica* tem de se tornar invasiva e causar doença progressiva (Wiser 2010). Dados publicados sobre a frequência da infecção indicam que dos 10% indivíduos infectados pelo parasito, apenas 1% desenvolve a forma invasiva da doença com manifestações clínicas. Dessa forma, torna-se importante salientar que 90% das infecções têm curso assintomático e são, frequentemente, autolimitadas (Zlobl 2001; Ximénez *et al*, 2011).

Sabe-se que o potencial patogênico das cepas de *E. histolytica* e o quadro imunológico do indivíduo contribuem diretamente para a gravidade da doença. Um exemplo desse fato pode ser observado durante a colite amebiana e a amebíase hepática, nas quais, diferenças patológicas ocorrem devido à variação de virulência do parasito nos dois órgãos ou as diferentes repostas imunes do hospedeiro no intestino e fígado (Stanley 2001).

Alguns quadros clínicos da doença são descritos a seguir.

1.6.1 Amebíase intestinal

O parasito vive comumente no intestino grosso, sendo capaz de causar alterações na mucosa, caracterizando a forma clínica denominada de amebíase intestinal. Formas graves de amebíase invasiva são observadas em crianças (menores de 5 anos), mulheres grávidas, idosos e em indivíduos que estão sendo tratados com imunossupressores ou que possuam imunodeficiências. Essas formas graves de amebíase são: ameboma, colite fulminante, e megacólon tóxico (Ximénez *et al*, 2011).

1.6.1.1 Colite não disentérica

É a forma mais frequente de amebíase e acomete pessoas de todas as idades. Trata-se de uma síndrome com sintomatologia inespecífica, que inclui dor abdominal espasmódica e distúrbios intestinais frequentes, alternando entre episódios de diarreia e constipação (Zlobl 2001). Os sintomas típicos também incluem: diarreia (3 a 5 evacuações), cólicas, flatulência, náusea e anorexia (Wiser 2010). A maioria das amebas provenientes deste quadro clínico são identificadas como *E. dispar* (Sargeant 1982). Esta forma da doença é controversa, sendo difícil distingui-la da síndrome do intestino irritável, muito comum em pacientes de países endêmicos para a amebíase (Ximénez *et al*, 2009).

1.6.1.2 Colite amebiana aguda

Em geral, possui início gradual com dor abdominal, tenesmo, vômitos, flatulência e fezes líquidas (4 a 6 evacuações/dia) contendo sangue e muco. O histórico de sintomas dura de 1 a 4 semanas, sendo que alguns pacientes desenvolvem febre e desidratação (especialmente crianças), conforme a gravidade da doença aumenta. A aparência característica de úlceras hemorrágicas puntiformes, com mucosa ao redor relativamente normal à endoscopia do reto ou sigmoide auxilia no diagnóstico. A mortalidade é inferior a 1%, no entanto, ela aumenta para até 40% se ocorrer perfuração intestinal (Zlobl 2001; Motta & Da Silva 2002).

1.6.1.3 Colite fulminante e megacólon tóxico

Colite fulminante é uma complicação rara da disenteria amebiana, a qual ocorre em apenas 6% a 11% dos pacientes com infecção sintomática. Apresenta-se com um rápido início de diarreia sanguinolenta intensa, dor abdominal grave e febre alta. A invasão amebiana da parede do cólon leva a uma necrose massiva de amplos segmentos ou de todo o cólon (Chen *et al*, 2004) . Megacólon tóxico ocorre em apenas 0,5% dos casos. O cólon se dilata, perdendo a capacidade de executar os movimentos peristálticos de forma apropriada. A distensão abdominal é grave e os pacientes apresentam: contagem alta de glóbulos brancos, febre alta e dor abdominal. O reconhecimento precoce e intervenção cirúrgica são importantes neste caso, uma vez que pacientes com megacólon tóxico, geralmente, não têm resposta apenas com terapia antiameba (Haque *et al*, 2003).

1.6.1.4 Amebomas

Trata-se de uma manifestação incomum, facilmente confundida com carcinomas ou tumores. Os amebomas apresentam-se como massas abdominais dolorosas que ocorrem com maior frequência no ceco e cólon ascendente do indivíduo infectado. O paciente apresenta dor, massa abdominal palpável e disenteria com sangue. O prognóstico é grave, especialmente com a presença de perfuração intestinal (Zlobl 2001; Ximénez *et al*, 2009).

1.6.2 Amebíase extra-intestinal

Em alguns indivíduos, o parasito invade a submucosa intestinal e atinge a circulação sanguínea, disseminando-se para outros órgãos como fígado, pulmão, coração, encéfalo, pele entre outros, caracterizando o quadro de amebíase extra-intestinal.

1.6.2.1 Amebíase hepática

É a forma invasiva mais frequente e responsável pelo maior número de mortes, sendo observada principalmente em adultos jovens e adultos em fase reprodutiva (20-50 anos). Pode surgir meses ou anos após a fase intestinal da infecção e é caracterizada por: febre,

hepatomegalia, dor no quadrante superior direito, anorexia e, ocasionalmente, peritonite (Wiser 2010). São comuns calafrios, anemia, perda de peso, diarreia e icterícia – sendo este último indicativo de múltiplos abscessos e/ou grande comprometimento hepático (Haque *et al*, 2003; Cordeiro & De Macedo 2007). Os achados laboratoriais sugestivos de abscesso hepático amebiano são a presença de leucocitose, neutrofilia, aumento da velocidade de sedimentação globular e altos níveis de fosfatase alcalina (Ximénez *et al*, 2011).

1.6.2.2 Amebíase pleuropulmonar

A invasão do trato respiratório costuma ser secundária ao abscesso hepático, ocorrendo em 7% a 20% dos pacientes com abscesso hepático. Os sintomas clínicos mais frequentes incluem tosse, dor torácica, dispneia, taquicardia e febre. Casos mais graves levam à formação de fístulas hepatobronquiais com manifestações como a formação de catarro marrom contendo material necrótico e trofozoítos. (Cordeiro & De Macedo 2007; Wiser 2010). O quadro de amebíase pleuropulmonar pode ser confundida com pneumonia bacteriana ou doença neoplásica, levando a diagnósticos errôneos (Hara *et al*, 2004).

Outros órgãos também podem ser acometidos pela amebíase, porém são considerados raros: sistema urinário, genital (podendo apresentar fístulas retovaginais), região perianal, pele e até ossos (Cordeiro & De Macedo 2007).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da amebíase é considerado difícil devido à natureza não específica dos sintomas, os quais são facilmente confundidos com disenterias bacterianas (*Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli*), bastante comuns em países tropicais e subtropicais (Tanyuksel & Petri 2003).

Tradicionalmente, a amebíase intestinal é diagnosticada pela realização da pesquisa do parasito nas fezes através da identificação de cistos ou trofozoítos (Stauffer & Ravdin 2003). Durante a realização do diagnóstico parasitológico de fezes, os organismos surgem de forma intermitente. Devido a este fato, recomenda-se a apresentação de três amostras de fezes, em dias alternados, durante um período de 10 dias (Pritt & Clark 2008). Além disso, é

importante evitar a presença de substâncias como antibióticos, laxantes e antidiarreicos, pois esses danificam a estrutura do parasito, dificultando consequentemente sua identificação (Proctor 1991).

A microscopia tem sido utilizada há anos como método diagnóstico da amebíase. Porém, a execução dessa metodologia depende diretamente da habilidade dos técnicos que realizam a análise, já que diversos fatores podem afetar os resultados, tais como: atraso no processamento do material, analista mal treinado, dificuldade na diferenciação de trofozoítos não móveis de células epiteliais e preservação inadequada da amostra (Ruiz Palacios 1997; Cordeiro & De Macedo 2007). Além disso, com a descoberta do complexo *E. histolytica* / *E. dispar*, outra limitação é a impossibilidade do diagnóstico diferencial por esse tipo de análise, uma vez que ambas as espécies não podem ser distinguidas apenas por sua morfologia (Motta & Silva 2002; Stanley 2003; Cordeiro & De Macedo 2007). Devido à baixa sensibilidade (60%) e as elevadas taxas de falso-positivos atribuídos à microscopia para o diagnóstico da amebíase, tornou-se necessário à aplicação de métodos alternativos na tentativa de obter um diagnóstico mais seguro e confiável para a doença (Zlobl 2001).

A cultura de *E. histolytica* / *E. dispar* é realizada a partir de amostras fecais, amostras de biópsia retal, ou aspirados de abscesso hepático. Entretanto, tal processo necessita entre 1 a 4 semanas para ser executado e requer equipamentos sofisticados, tornando-o inviável como procedimento de rotina, especialmente, nos países em desenvolvimento. A análise do perfil isoenzimático dos parasitos cultivados é capaz de fazer a distinção entre os zimodemas patogênicos e não patogênicos. Porém, este processo de análise é trabalhoso, caro e, muitas vezes, produz resultados falso-negativos para várias amostras de fezes, anteriormente positivas na microscopia (Samie *et al*, 2012).

A detecção de anticorpos é uma ferramenta que auxilia o diagnóstico da infecção. Vários métodos para a detecção de anticorpos têm sido utilizados atualmente, tais como: ensaio imunoenzimático (ELISA), hemaglutinação indireta, imunodifusão, teste de difusão em gel, imunofluorescência indireta (RIFI), imunoelektroforese e fixação do complemento (Samie *et al*, 2012).

O teste de ELISA trata-se de um dos métodos mais utilizados em todo o mundo. No caso da amebíase, tal metodologia é utilizada para demonstrar a presença de anticorpos antiamebianos no soro, sendo sua utilização mais recomendada em pacientes com suspeita

de abscesso hepático e indivíduos assintomáticos infectados pela *E. histolytica* (Tanyuksel & Petri 2003). A pesquisa de anticorpos possui uma sensibilidade de 90% para o abscesso hepático amebiano e de 70% para a colite amebiana. Essa diferença ocorre diante do grande aumento de anticorpos na amebíase invasiva extraintestinal ao contrário dos níveis de anticorpos existente nas formas não invasivas (Petri & Singh 1999; Sánchez-Guillén *et al.* 2002).

Para a pesquisa de antígenos fecais (coproantígenos), os testes se utilizam de anticorpos monoclonais ou policlonais específicos a fim de detectar antígenos de *E. histolytica*. Estes testes são considerados rápidos, sensíveis e amplamente utilizados para se confirmar achados microscópicos (Pritt & Clark 2008; Stanley 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o método de maior especificidade (100%) e sensibilidade (94%) para a identificação de infecções por *Entamoeba sp* (Stauffer & Ravdin 2003; Herbingler *et al.*, 2011). Trata-se de uma técnica que permite a amplificação de regiões específicas do DNA de *E. histolytica* e *E. dispar*, sendo assim, considerado o instrumento de escolha para o diagnóstico diferencial dessas espécies (Cordeiro & De Macedo 2007). Entretanto, o tempo consumido para a execução do teste, sua relativa complexidade, a necessidade de equipamentos sofisticados e o custo elevado são algumas das desvantagens ao se utilizar tal técnica, principalmente, em países em desenvolvimento (Koneman *et al.*, 2008).

Técnicas de imagem não invasivas (ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética) são consideradas excelentes auxiliares para o diagnóstico da doença extraintestinal (Zlobl 2001; Wisner 2010). No caso do abscesso hepático amebiano, o diagnóstico definitivo é confirmado por testes sorológicos positivos para anticorpos contra *E. histolytica* e pela demonstração da lesão hepática através de técnicas de imagem (Tanyuksel & Petri 2003).

A ultrassonografia apresenta precisão de 95%, revelando lesões bem definidas com bordas arredondadas, sendo considerada uma técnica mais barata e acessível do que a tomografia computadorizada (Ximénez *et al.*, 2009). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética caracterizam melhor o abscesso hepático e permitem a detecção de lesões menores, porém, são menos específicas do que a ultrassonografia (Pritt & Clark 2008).

1.8 Tratamento

Os protozoários *E. histolytica* e *E. dispar* são morfologicamente idênticos, porém, bioquimicamente e geneticamente diferentes (Solaymani-Mohammadi *et al*, 2006). De acordo com as recomendações da OMS, procedimentos que permitam a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* necessitam ser adotados, uma vez que o tratamento da amebíase é administrado somente nos casos em que a *E. histolytica* seja confirmada (Pritt & Clark 2008). Não há evidências de que pacientes infectados com *E. dispar* estejam em risco de saúde ou que coloquem em risco a sociedade, portanto, não necessitam de terapia medicamentosa (Zlobl 2001).

Em 1912, a emetina foi o primeiro composto a demonstrar atividade amebicida, entretanto, atualmente, é pouco utilizada devido a sua elevada toxicidade (Upcroft & Upcroft 2001).

Na década de 50, a introdução de fármacos nitroheterocíclicos representou uma nova Era no tratamento de infecções por bactérias e protozoários. Como consequência desse fato, foi sintetizado o metronidazol (1- β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol), um agente antimicrobiano utilizado na clínica médica há mais de 45 anos (Löfmark *et al*, 2010) devido a sua baixa toxicidade, elevada eficácia e curto período de tratamento (Leão 1997).

O metronidazol (MTZ) é o amebicida mais utilizado em todo o mundo. Atualmente, pertence à lista dos 100 medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos e um dos 10 mais utilizados durante a gravidez (Bendesky *et al*, 2002). Em mulheres grávidas, o diagnóstico precoce e o tratamento são importantes, já que a amebíase durante a gravidez coloca a paciente em maior risco de aborto e parto prematuro (Zlobl 2001).

Os medicamentos recomendados para o tratamento da amebíase variam de acordo com as manifestações clínicas dos pacientes. Assim, os fármacos amebicidas são classificados em dois grupos: amebicidas luminais e amebicidas teciduais.

Os indivíduos assintomáticos infectados por *E. histolytica* devem ser tratados com amebicidas luminais (paromomicina, etofamida, teclosan, furoato de diloxanida, ou iodoquinol) na tentativa de erradicar a infecção. Estes medicamentos eliminam as amebas

luminais, prevenindo a invasão de tecidos subsequentes e a propagação da infecção através de cistos (Stanley 2003).

A doença invasiva intestinal e extraintestinal são tratadas com amebicidas teciduais (MTZ, tinidazol, secnidazol, dentre outros). Tais amebicidas são bem absorvidos pela corrente sanguínea e não atingem elevadas concentrações no lúmen intestinal. Devido a esse fato, o tratamento é acompanhado da administração de um agente luminal a fim de erradicar qualquer potencial reservatório intestinal (Pritt & Clark 2008; Wiser 2010).

Comumente, o tratamento utilizando MTZ varia entre adultos e crianças. No caso de adultos, o medicamento é administrado nas dosagens de 250 a 500 mg (via oral ou intravenosa) de 8 em 8 h, durante 5 a 7 dias (amebíase intestinal) ou 7 a 10 dias (amebíase hepática). Em crianças, a dosagem diminui para 35 a 50 mg/kg/dia (via oral), 3 vezes ao dia. No caso de colite amebiana fulminante, é prudente adicionar antibióticos de amplo espectro para o tratamento de bactérias intestinais que possam se espalhar pelo peritônio do indivíduo. A intervenção cirúrgica é ocasionalmente necessária em casos de abdôme agudo, hemorragia gastrointestinal ou megacólon tóxico (Haque *et al*, 2003).

O controle de cura na amebíase intestinal deverá ser realizado no 7º, 14º, 21º dia após o término do tratamento, através de métodos como: Hoffman, Faust e Hematoxilina férrica (Leão 1997).

Abscesso hepático amebiano também é tratado via quimioterapia, sendo o processo cirúrgico raramente indicado. O tratamento de escolha requer um nitroimidazol administrado via oral ou, quando não tolerado, por via intravenosa (Ruiz-Palacios 1997).

É importante ressaltar que, apesar dos escassos relatos clínicos de resistência aos fármacos de escolha para o tratamento da amebíase, o uso inadequado a curto prazo e as superdosagens, normalmente prescritas como profilaxia à doença, podem favorecer o surgimento de resistência do microrganismo contra tais fármacos (Upcroft & Upcroft 2001). Relatórios sobre falhas no tratamento indicam que tal resistência deverá se tornar clinicamente importante em um futuro próximo. Além disso, clones resistentes são constantemente gerados em laboratório, sugerindo que a *E. histolytica* poderá, naturalmente, desenvolver resistência aos fármacos (Bansal *et al*, 2006).

Além disso, apesar dos nitroimidazóis serem considerados os fármacos de escolha para o tratamento da amebíase, diversos efeitos colaterais indesejáveis podem ser atribuídos

ao seu uso, tais como: náuseas, vômitos, dor de cabeça, insônia, tontura, gosto metálico, sonolência, erupção cutânea e boca seca. Os efeitos secundários mais graves são raros, mas incluem eosinofilia, leucopenia, palpitações, confusão, e neuropatia periférica (Haque *et al*, 2003; Cudmore *et al*, 2004).

1.9 Plantas medicinais e fitoterápicos

Segundo a OMS, planta medicinal trata-se de todo vegetal que possui, em uma ou mais partes, substâncias que são utilizadas com finalidades terapêuticas ou que sejam precursoras de fármacos semisintéticos. Desde os tempos imemoriais, o homem busca, na natureza, recursos que aprimorem sua condição de vida para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria da saúde (Rodrigues *et al*, 2006).

A referência mais antiga da utilização de plantas medicinais data de mais de 60 mil anos, sendo as primeiras descobertas feitas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã. Na China (3000 a.C.), já existiam farmacopéias que compilavam ervas e suas indicações terapêuticas. A utilização das plantas medicinais faz parte da história da humanidade, tendo grande importância nos aspectos medicinais e culturais (De Rezende & Cocco 2002).

No Brasil, a adoção da terapia de cura à base de plantas, surgiu da articulação dos conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros, na época em que o país era colônia de Portugal (De Rezende & Cocco 2002). Atualmente, a medicina popular do país tornou-se reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração em geração (Lorenzi & Matos 2002). Hoje em dia, a preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável no mundo, trouxeram novas perspectivas para os estudos das plantas medicinais, despertando um interesse global na fitoterapia (Lorenzi & Matos 2008).

De acordo com a literatura, fitoterápico corresponde a todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se, exclusivamente, matérias primas vegetais com a finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário (Veiga Junior *et al*, 2005; Oliveira *et al*, 2007a).

A OMS reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante às populações dos países desenvolvidos e, principalmente, dos países em desenvolvimento (De Rezende & Cocco 2002). Tendo em vista que a maioria da população mundial ocupa países menos desenvolvidos economicamente, nos quais encontram dificuldades em oferecer atendimento à saúde devido ao aumento populacional e a escassez de recursos, destaca-se a importância da fitoterapia (Oliveira *et al*, 2007a). Segundo dados da OMS, estima-se que 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependam diretamente das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Gonçalves *et al*, 2005).

Pesquisas envolvendo plantas medicinais demonstraram que, em sua maioria, tal matéria-prima é capaz de originar medicamentos em menor tempo, com custos inferiores e mais acessíveis à população (Barraca 1999). Neste contexto, o uso de plantas medicinais, para o tratamento das mais diversas enfermidades, tem incentivado países como a China a consumir de 30 a 50% dos medicamentos de origem vegetal. Na Europa e América do Norte, 50% da população declararam já ter feito o uso de fitoterápicos (Oliveira *et al*, 2007a). A Alemanha ganha destaque neste cenário, pois é, atualmente, o país onde se consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa, sendo as plantas medicinais utilizadas por 90% da população para tratar resfriados, gripes, doenças do trato digestivo, dores de cabeça, insônia, úlceras estomacais, nervosismo, bronquite, doenças de pele, fadiga e exaustão (Veiga Junior *et al*, 2005).

Na Índia, cerca de 20 mil espécies de plantas medicinais foram registradas recentemente. Estima-se que sejam consumidas 2 mil toneladas de plantas/ano e que, aproximadamente, 25 mil formulações efetivas à base de plantas sejam utilizadas na medicina popular e conhecidas pelas comunidades rurais da Índia (Verma & Singh 2008).

Em nosso país, o interesse maior pelos fitoterápicos, parte de uma grande parcela da população que não tem acesso aos medicamentos industrializados e, que, vislumbram nas plantas medicinais alternativas de tratamento. As estimativas nacionais apontam que 82% da população brasileira utiliza-se de produtos à base de ervas, sendo o setor fitoterápico detentor de duzentas empresas, movimentando 1 bilhão de reais e empregando mais de 100 mil pessoas no país (Oliveira *et al*, 2007a).

É importante ressaltar que, a toxicidade de plantas medicinais representa um sério problema de saúde pública. Ao longo dos anos, o uso de plantas demonstrou que algumas delas apresentam substâncias potencialmente perigosas e, por esta razão, devem ser utilizadas cuidadosamente. As pesquisas realizadas para avaliar o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais. Devido a este fato, a OMS recomenda que produtos à base de plantas devam ser padronizados, em relação à segurança, antes de serem comercializados (Veiga Junior *et al*, 2005; Choudhary & Sekhon 2011).

1.9.1 Família Celastraceae

Dentro do vasto universo das plantas medicinais, encontra-se a família Celastraceae, localizada, em sua maioria, nas regiões tropicais e subtropicais, com alguns representantes em clima temperado (Nuñez Rivas 2004; Al-Ajmi 2007).

O estudo das espécies da família Celastraceae faz parte do projeto desenvolvido no Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais (NEPLAM) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que tem por objetivo caracterizar quimicamente e farmacologicamente plantas dessa e de outras famílias.

Na família Celastraceae inclui-se, aproximadamente, 1.300 espécies em 88 gêneros, caracterizados por serem plantas de porte variável, apresentando-se como árvores ou arbustos, de caule ou tronco retorcido, com folhas simples, opostas e dentadas, flores não vistosas e pequenas (terâmicas ou pentâmicas), frutos encapsulados e sementes com arilo branco ou laranja (Nuñez Rivas 2004). A distribuição geográfica dessa família é ilustrada na figura abaixo (Figura 7).

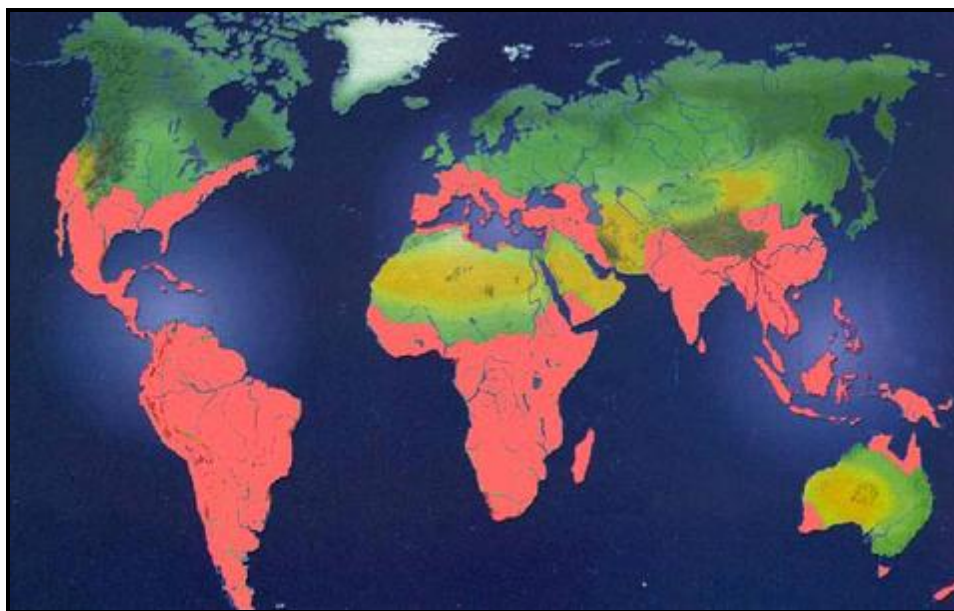


Figura 6 - Distribuição geográfica da família Celastraceae (rosa).
Fonte: Núñez Rivas 2004.

No Brasil a família Celastraceae é representada por três gêneros: *Maytenus*, *Austroplenckia* e *Franhofera*. O gênero *Maytenus*, considerado o maior e o mais estudado, apresenta cerca de 80 espécies distribuídas pela região tropical e subtropical do território brasileiro (Joffily & Vieira 2005). Na América do Sul, o grande número de usos medicinais tem sido atribuído a várias espécies de *Maytenus*, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de doenças gástricas (Niero *et al*, 2011) No Quadro I, estão inseridas algumas das utilidades de plantas do gênero *Maytenus* relacionadas à medicina tradicional.

Quadro I – Espécies do gênero *Maytenus* utilizadas na medicina popular

Espécies	Utilização na Medicina Tradicional
<i>M. ilicifolia</i>	Diurético Antitumoral Cicatrização de feridas Antisséptico Antiasmático Analgésico Anti-inflamatório
<i>M. truncata</i>	Antiulcerogênica Anti-inflamatório
<i>M. robusta</i>	Antiulcerogênica
<i>M. rigida</i>	Anti-infeccioso Analgésico
<i>M. salicifolia</i>	Antialérgico Alívio de coceiras

Fonte: Adaptado de Niero *et al*, 2011

Além das inúmeras atividades biológicas que possui, muitos grupos de pesquisa estudam a família Celastraceae devido a sua ampla distribuição botânica, natureza química e complexidade de seus metabólitos (Rodríguez Pérez 2000). Com os avanços das pesquisas foram encontrados diversos metabólitos secundários biologicamente ativos, relacionados a esta família, dentre os quais se destacam: alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, triterpenos pentacíclicos e triterpenos quinonametídeos.

Os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos são metabólitos secundários derivados de sesquiterpenos poliéster, de ocorrência restrita a família Celastraceae (Núñez *et al*, 2004; Santos *et al*, 2012). Estes alcaloides têm despertado o interesse de pesquisadores devido às diversas atividades biológicas que apresentam, tais como: ação inseticida, imunossupressora, antitumoral, citotóxica e anti-HIV (Wei *et al*, 2009).

Os triterpenos pentacíclicos são as substâncias encontradas em maior abundância nas plantas da família Celastraceae sendo reconhecidos, juntamente com os alcaloides piridínicos sesquiterpênicos, como marcadores quimiotaxonômicos dessa família (Santos *et al*, 2012). Os esqueletos triterpênicos são baseados em uma estrutura de 30 carbonos, compreendendo cinco anéis de seis membros cada (por exemplo, friedelanos) ou quatro anéis de seis membros e o último de cinco (por exemplo, lupanos) (Patocka 2003).

Triterpenos quinonametídeos são metabólitos secundários restritos a espécies da família Celastraceae (Corsino *et al*, 2000). Os triterpenos quinonametídeos, pristimerina e maitenina, exibem um amplo espectro de atividades biológicas, destacando-se atividades antioxidante (Carvalho *et al*, 2005), antibiótica (Moujir *et al*, 1990) e antiproliferativa (Costa *et al*, 2008). Neste contexto destaca-se a tingenona, substância isolada de raízes de várias espécies da família Celastraceae, que atualmente é utilizada como agente anti-inflamatório, antioxidante, citotóxico e inseticida existindo, também, relatos sobre seu promissor potencial clínico como agente terapêutico e quimiopreventivo para o câncer (Gomes *et al*, 2011). A descoberta da atividade antitumoral exercida pela tingenona contribuiu expressivamente para o aumento do interesse pela família Celastraceae (Ravelo *et al*, 2004).

1.9.2 *Maytenus gonoclada*

A espécie *Maytenus gonoclada* (Figura 7), conhecida popularmente como “Tiuzinho”, é encontrada em regiões de cerrado e campos rupestres do Sudeste e Nordeste brasileiro, principalmente nos Estados da Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Silva *et al*, 2011). Tal espécie é caracterizada como arbusto ou árvore pequena medindo até quatro metros de altura, composta por ramos nitidamente quadrangulares, folhas oval-elípticas, com ápice e base em formato cônico (Oliveira *et al*, 2007b).

M. gonoclada é considerada bastante semelhante à espécie *Maytenus salicifolia* (Figura 7), o que as distingue são os ramos mais quadrangulares e as folhas mais rijas (Carvalho-Okano 1992). Popularmente conhecida como “Cafezinho”, o chá das folhas de *M. salicifolia* é comumente utilizado para o tratamento de úlceras estomacais, cura de alergias e coceiras (Valladão *et al*, 2009; Magalhães *et al*, 2010).

Das folhas de *M. gonoclada* estudou-se fitoquimicamente os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico, obtendo inúmeras substâncias isoladas, sendo os triterpenos pentacíclicos encontrados em grande quantidade. A estes metabólitos secundários são atribuídas importantes atividades farmacológicas, como: antitumoral, anti-inflamatória, anti-HIV, antiulcerogênica, antidisentérica e antireumática (Oliveira *et al*, 2007b). Recentemente, o estudo de galhos de *M. gonoclada* atribuiu ao extrato hexânico atividades biológicas contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Tenebrio molitor* (praga que atinge grãos armazenados) (Silva *et al*, 2011) e *Giardia lamblia* (Silva *et al*, 2012).



Figura 7 – Fotos de *Maytenus gonoclada* Martius (esquerda) e *Maytenus salicifolia* Reissek (direita)
Fonte: Silva 2010

2. JUSTIFICATIVA

Amebíase, causada por *Entamoeba histolytica*, é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade e um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Acomete cerca de 500 milhões de pessoas, sendo 50 milhões de casos clínicos envolvidos com disenterias ou abscesso hepático amebiano (AHA) e cerca de 100 mil mortes anuais (Stanley 2003; Bansal *et al*, 2006).

Até a década de 50 o tratamento da amebíase era feito com a emetina, substância extremamente tóxica, quando então surgiu o MTZ, tornando-se a escolha terapêutica para o tratamento de infecções por *E. histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (Busatti *et al*, 2007). Apesar dos escassos relatos de resistência ao fármaco descritos na literatura, muitos são os questionamentos quanto à indução de resistência ao MTZ em *E. histolytica* (Upcroft & Upcroft 2001).

A exposição inadequada à curto prazo e a administração de níveis subletais do MTZ têm sido normalmente prescritos como profilaxia da amebíase. Tais medidas, contribuem precisamente para a indução da resistência ao medicamento (Upcroft & Upcroft 2001). Vale ressaltar que o MTZ gera efeitos colaterais indesejáveis ao paciente, tais como náuseas, gosto metálico, cefaléia, insônia e tonturas. Estes efeitos colaterais levam muitos indivíduos a desistência ou a não adesão ao tratamento (Cudmore *et al*, 2004).

As peculiaridades acima mencionadas sinalizam a importância da pesquisa de novos fármacos amebicidas que apresentem como características principais segurança, boa atividade, poucos ou nenhum efeito colateral ao paciente, além de constituir tratamento alternativo para casos resistentes a profilaxia usual. Sendo assim, observou-se, nos últimos anos, a intensa procura por substâncias bioativas e com valor agregado pelos cientistas brasileiros, visto que o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, contando com cerca de 13% da biota global (Queiroz *et al*, 2006).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas práticas da humanidade, sendo observada em diversas culturas. Como exemplo deste fato, diversas plantas da família Celastraceae têm sido utilizadas em diferentes regiões da África (Khalid *et al*, 2007), América Latina (Itokawa *et al*, 1993) e China (Luo *et al*, 2005), sendo muitas espécies conhecidas por sua utilização na

medicina tradicional e na agricultura (Nuñez Rivas 2004). O gênero *Maytenus*, considerado o maior e o mais estudado desta família, apresenta cerca de 80 espécies distribuídas pela região tropical e subtropical do território brasileiro (Joffily & Vieira 2005). Tal gênero destaca-se pela diversidade de atividades biológicas que apresenta, tais como: ação anti-inflamatória (Sosa *et al*, 2007), antileucêmica (Schneberg *et al*, 2001), antibacteriana (Lindsey *et al*, 2006), analgésica e antiulcerogênica (Fonseca *et al*, 2007), antidiarréica e inseticida (Niero *et al*, 2011).

Historicamente, empresas farmacêuticas utilizam extratos de plantas para a produção de formulações terapêuticas, entretanto, com o advento dos antibióticos em meados do século XX, as formulações de compostos purificados tornaram-se mais comuns (Mishra & Tiwari 2011). Os fármacos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, sendo utilizados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários e antineoplásicos (Brandão *et al*, 2010). Apesar deste fato, a incidência de infecções parasitárias tem aumentado globalmente (Mishra & Tiwari 2011).

Diante do exposto, vale destacar que inúmeras plantas brasileiras nunca foram estudadas e pesquisas nesta área são de grande relevância para o isolamento e descobrimento de novas moléculas com atividade terapêutica, contribuindo para o surgimento de fitoterápicos genuinamente nacionais. Tendo em vista a grande aplicabilidade medicinal de espécies do gênero *Maytenus*, torna-se importante a realização de estudos detalhados visando verificar a possível atividade inibitória de compostos provenientes da planta *Maytenus gonoclada* frente ao protozoário *E. histolytica*, bem como seu potencial citotóxico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar, através de ensaios “in vitro”, o potencial amebicida de extratos brutos e triterpenos obtidos a partir de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae).

3.2. Objetivos específicos:

- Obtenção dos extratos brutos e triterpenos de galhos, cascas e cernes de raízes de *M. gonoclada*;
- Padronizar o inóculo ideal de *E. histolytica* para a realização dos ensaios “in vitro”;
- Realizar “screening” dos extratos brutos e triterpenos, obtidos de galhos, cascas e cernes de raízes de *M. gonoclada*, sobre *E. histolytica*;
- Determinar a IC₅₀ (concentração da substância necessária para reduzir em 50% o crescimento dos trofozoítos) do MTZ, dos extratos brutos e triterpenos, ativos contra *E. histolytica*;
- Avaliar o potencial citotóxico, dos extratos brutos e triterpenos, ativos contra *E. histolytica*, sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepa de *E. histolytica* e manutenção do parasito

Durante todo o ensaio experimental foi utilizada a cepa EGG de *E. histolytica*, originária de Manaus - Brasil, isolada em Agosto de 1988 de paciente do sexo masculino, 35 anos, portador de colite disentérica e abscesso hepático. Desde então, a cepa vem sendo mantida no Laboratório de Amebíases nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em cultivo axênico.

Os trofozoítos são cultivados em tubos de vidro estéreis (Pyrex[®]) contendo 13 mL de meio YI-S (Diamond *et al.* 1995) e, posteriormente, incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. As culturas são observadas periodicamente em microscópio invertido (Olympus IX51), avaliando seu crescimento, mobilidade e aderência. Os tubos com bom crescimento de trofozoítos são mantidos em banho de gelo por 20 minutos e homogeneizados para facilitar o desprendimento dos mesmos. Após o desprendimento dos parasitos, uma alíquota da suspensão é transferida para um novo tubo contendo meio de cultura fresco. Após o repique, os tubos são mantidos novamente em estufa bacteriológica a 37°C. Repiques entre 48 e 72 h têm garantido a utilização dos parasitos em fase exponencial de crescimento.

4.2 Coleta e identificação do material vegetal

Galhos de *Maytenus gonoclada* Martius (Celastraceae) foram coletados na Serra da Piedade, em Caeté, Minas Gerais, Brasil, em 18 de outubro de 2004 e as raízes em 29 de janeiro de 2010 no mesmo local pelo Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O material vegetal foi identificado pela Prof^{ta}. Dra. Rita Maria Carvalho-Okano do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a exsicata do *specimen* (Nº. HBCB 60280) encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

4.3 Extratos brutos de galhos e raízes de *Maytenus gonoclada*

A metodologia utilizada no preparo dos extratos foi estabelecida em trabalhos anteriores desenvolvidos no Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais (NEPLAM), Instituto de Ciências Exatas (ICEX) (Duarte 2000; Miranda 2007; Silva 2011), sob a coordenação da Prof^a. Lucenir Duarte.

Após secagem à temperatura ambiente, os galhos foram triturados em moinho de martelos e submetidos à extração exaustiva com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, puros e sequencialmente em aparelho Soxhlet. A filtração e remoção do solvente, por destilação à pressão reduzida em evaporador rotatório, conduziram aos extratos hexânico, clorofórmico, acetato em etila e etanólico (Figura 8).

As raízes de *M. gonoclada*, após secagem à temperatura ambiente, foram separadas em cerne e casca (Figura 9). Essa separação foi assim realizada em função da existência de diferentes tipos de metabólitos encontrados nessas partes da planta. Em geral, as cascas possuem uma maior variedade de substâncias do que no cerne (Duarte, 2000; Silva 2011).

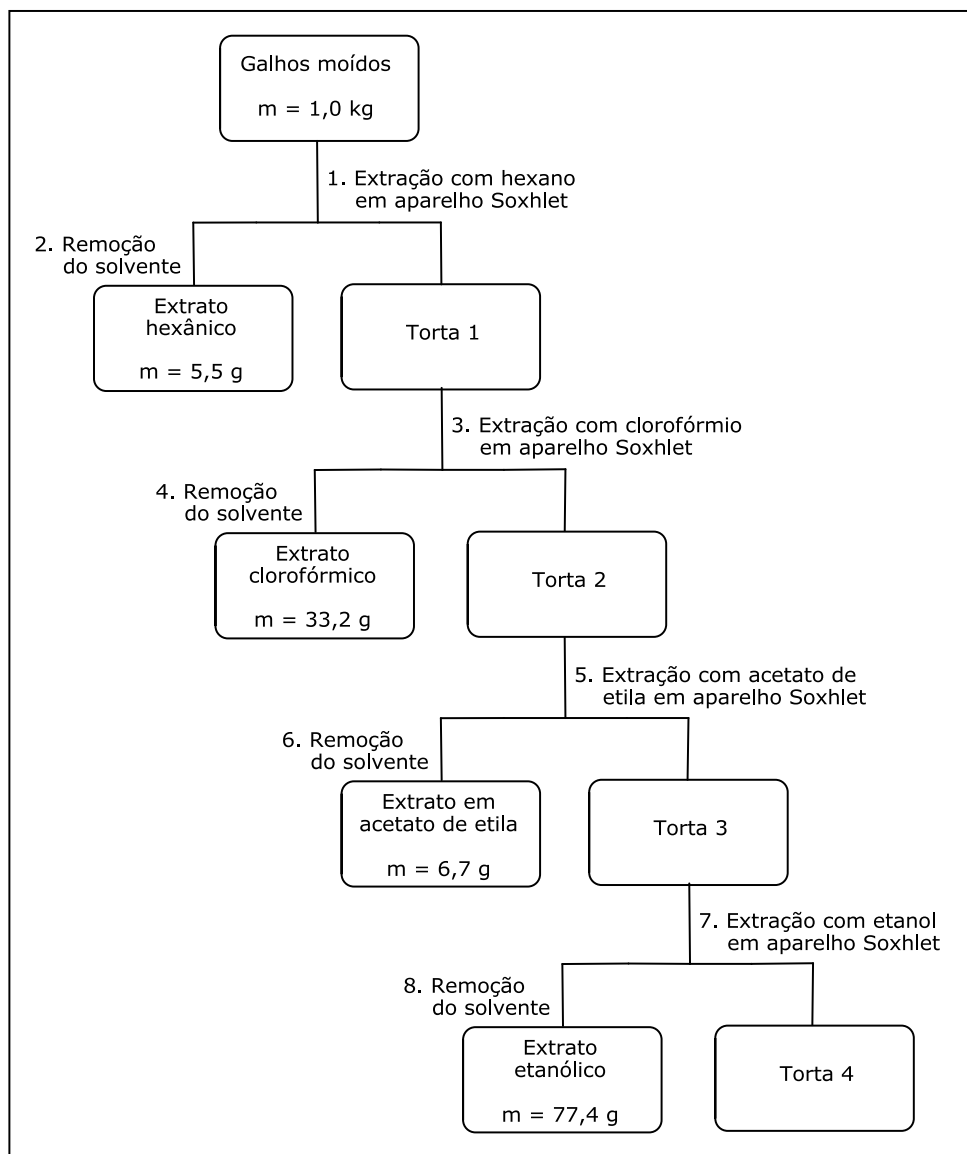


Figura 8 – Esquema do preparo dos extratos de galhos de *M. gonoclada*



Figura 9 – Fotos de cascas (esquerda) e cernes (direita) de raízes de *M. gonoclada*
Autor: Fernando César Silva

As cascas foram trituradas em moinho de facas e os cernes em moinho de martelos. Cascas e cernes foram submetidos à extração exaustiva com hexano/éter etílico (1:1), clorofórmio, acetato de etila e etanol, sequencialmente em aparelho Soxhlet. A utilização da mistura de hexano/éter etílico (1:1) foi realizada visando à obtenção de triterpenos quinonametídeos em quantidades significativas (Rodríguez Pérez, 2000; Núñez Rivas, 2004). A filtração e remoção do solvente, por destilação à pressão reduzida em evaporador rotatório, conduziram aos extratos de acordo com o solvente utilizado. O esquema do processo de obtenção de extratos é mostrado na Figura 10 e Figura 11, respectivamente.

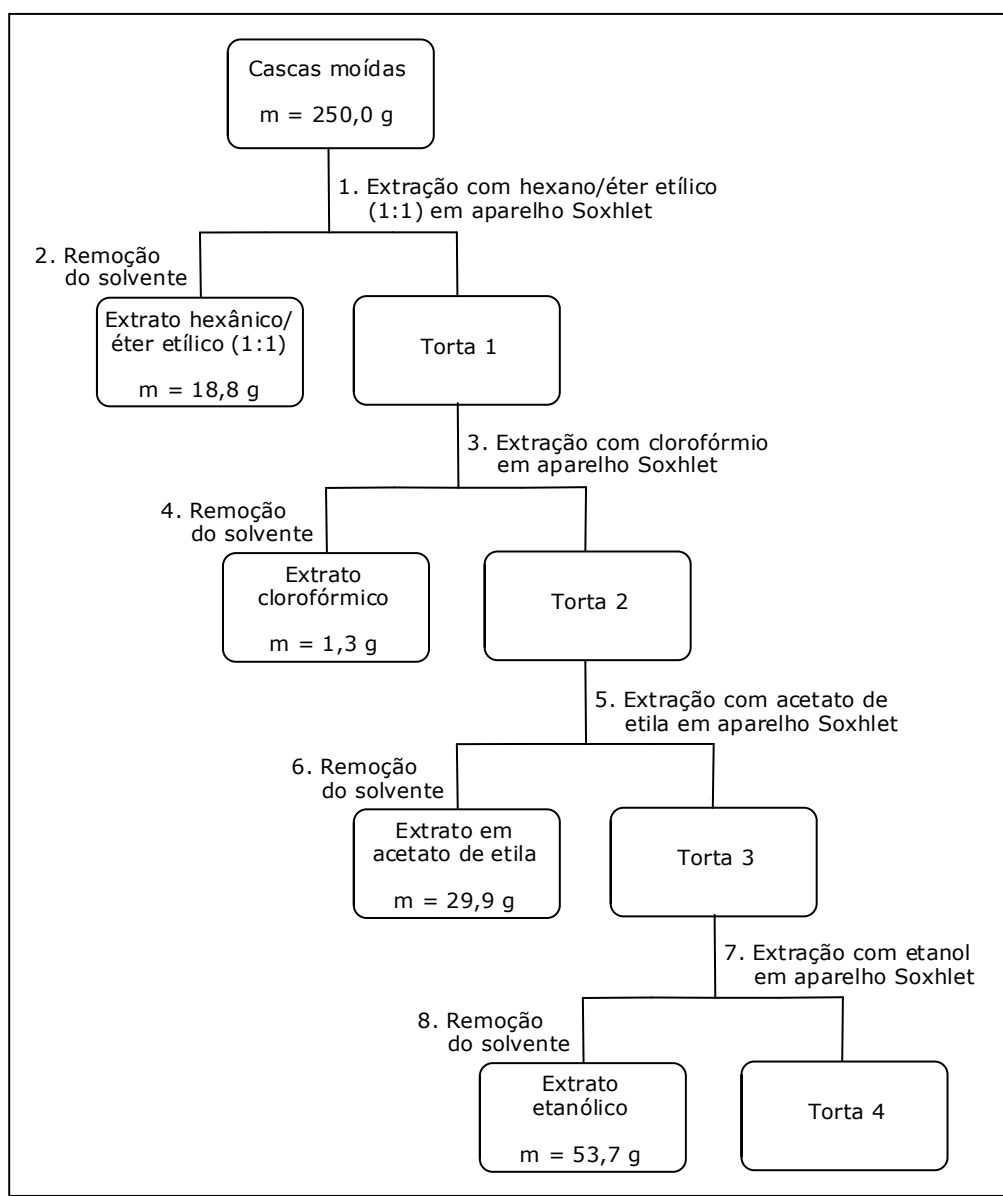


Figura 10 – Esquema do preparo dos extratos de cascas de raízes de *M. gonoclada*.

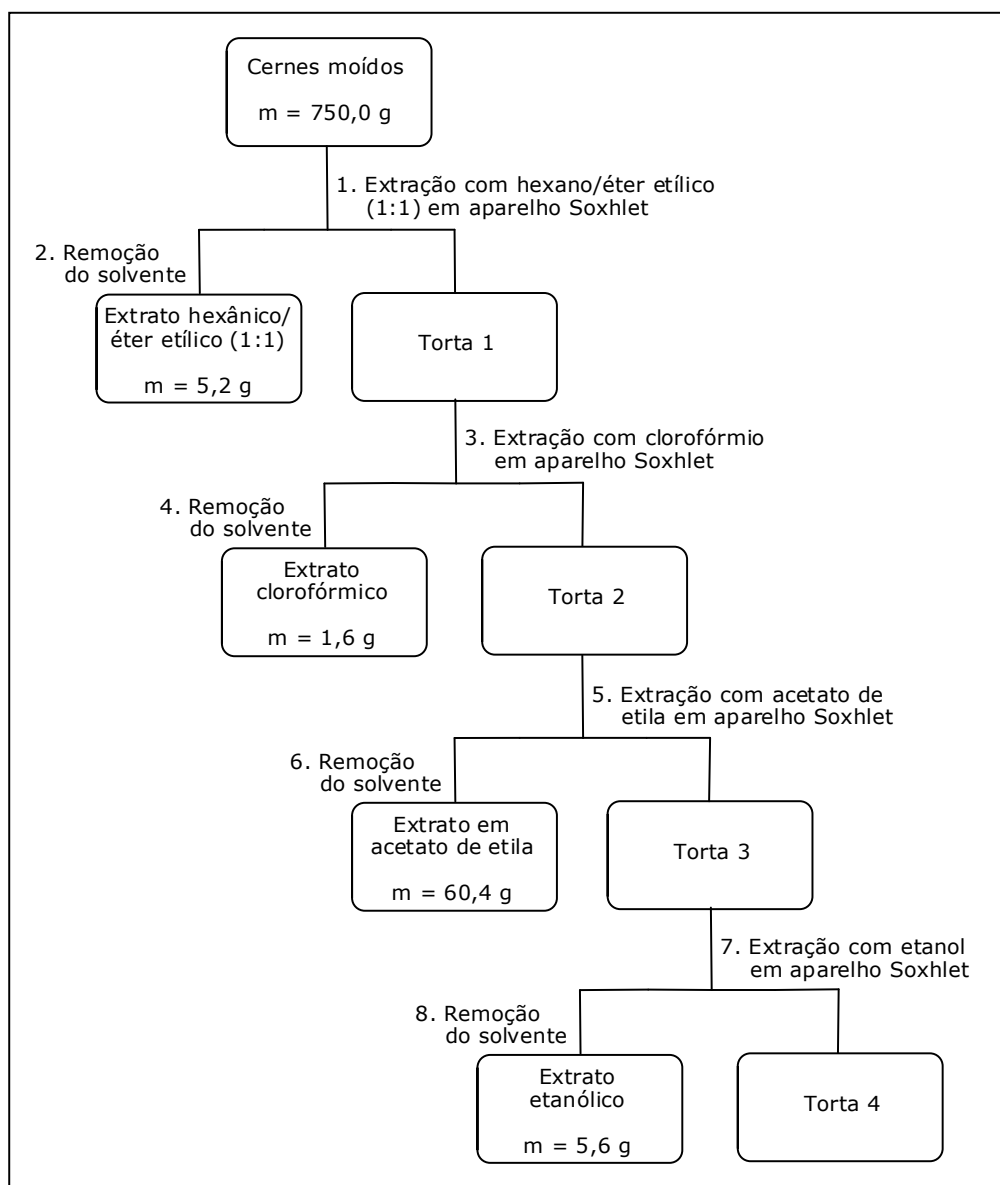


Figura 11 – Esquema do preparo dos extratos de cernes de raízes de *M. gonoclada*

No quadro II, abaixo, tem-se a codificação atribuída a todos os extratos brutos obtidos de galhos, cascas e cernes de raízes de *Maytenus gonoclada*.

Quadro II - Extratos brutos obtidos de *Maytenus gonoclada*

Código	Amostra
D5	Extrato hexano/éter etílico (1:1) de cascas de raízes

D6	Extrato clorofórmico de cascas de raízes
D7	Extrato em acetato de etila de cascas de raízes
D8	Extrato etanólico de cascas de raízes
D9	Extrato hexano/éter etílico (1:1) de cernes de raízes
D10	Extrato clorofórmico de cernes de raízes
D11	Extrato em acetato de etila de cernes de raízes
D12	Extrato etanólico de cernes de raízes
FH2	Extrato hexânico de galhos
EC	Extrato clorofórmico de galhos
EA	Extrato em acetato de etila de galhos
EE	Extrato etanólico de galhos

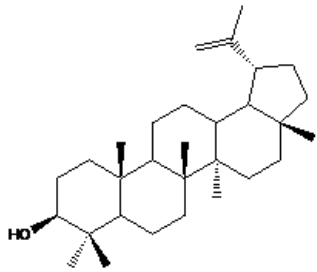
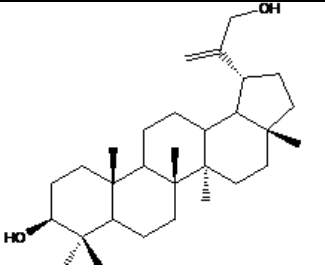
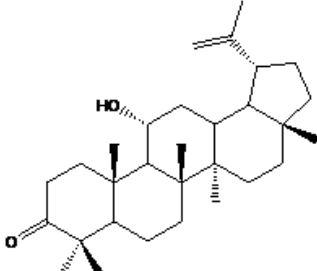
4.4 Isolamento de triterpenos de *M. gonoclada*

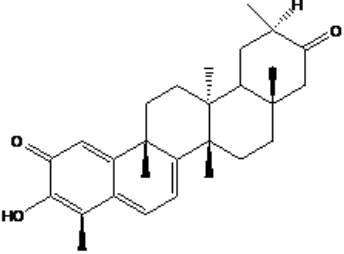
Os triterpenos constituem um dos grupos de terpenos mais estruturalmente diversificados, com mais de 100 esqueletos já descritos como produtos naturais (Domingo *et al.*, 2009).

O 3 β -hidroxilup-20(29)-eno foi obtido do extrato clorofórmico de galhos de *M. gonoclada* por meio de colunas cromatográficas de sílica gel, utilizando como sistema eluente uma mistura de hexano/clorofórmio/acetato de etila (7:2:1) (Silva *et al.*, 2011a). O composto 3 β -30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno foi obtido da reação de oxidação do 3 β -hidroxilup-20(29)-eno com iodosilbenzeno e metaloporfirina de manganês (Mn(III)TPPCl) como catalisador. A purificação foi realizada utilizando colunas cromatográficas de sílica gel e o sistema eluente

utilizado foi o hexano/acetato de etila (7:3) (Silva *et al.*, 2011b). O extrato hexânico/éter etílico (1:1) de cascas de raízes de *M. gonoclada* foi submetido a cromatografia em sephadex e, posteriormente, em sílica gel obtendo-se os seguintes compostos: 3-oxo-11 α -hidroxilup-20(29)-eno e 3-hidroxi-24,29-dinor-1(10), 3,5,7-friedelatetraen-2,21-diona, também conhecido como tingenona. No quadro a seguir estão representadas as estruturas químicas e as respectivas massas molares dos triterpenos obtidos de *M. gonoclada* (Silva *et al.* 2011a).

Quadro III – Estrutura química e massa molar de triterpenos isolados de *M. gonoclada*

Substância	Massa molar (g/mol)	Estrutura Química
3 β -hidroxilup-20(29)-eno (D1)	426,39	
3 β -30-dihidroxilup-20(29)-eno (D2)	442,38	
3-oxo-11 α -hidroxilup-20(29)-eno (D3)	440,37	

3-hidroxi-24,29- dinor-1(10),3,5,7- friedelatetraen-2,21- diona (D4 ou Tingenona)	420,27	
---	--------	--

4.5 Padronização do inóculo

Para a padronização do inóculo, tubos de vidro estéreis contendo trofozoítos de *E. histolytica* em fase logarítmica de crescimento, foram mantidos em banho de gelo durante 20 minutos e, posteriormente, homogeneizados a fim de facilitar o desprendimento dos mesmos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 1500 rpm. Parte do sobrenadante foi descartado e os precipitados obtidos foram concentrados em único tubo. A quantificação da suspensão de trofozoítos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando a técnica de contagem de leucócitos adaptada (Carvalho & Silva 1988) e o corante vital eosina (0,125%). Resumidamente, 40 µL da suspensão de trofozoítos, foram transferidos para “ependorfs” contendo 160 µL de eosina. Após homogeneização, uma alíquota deste conteúdo foi depositada nos retículos da câmara, evitando excesso de líquido e bolhas de ar. A contagem dos parasitos presentes na câmara foi executada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100) utilizando o aumento de 10X. O cálculo do número de trofozoítos/mL foi efetivado empregando a seguinte equação:

$$Z = Fc \times Fd \times Y$$

Onde:

Z = número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão;

Fc = fator de correção da Câmara de Neubauer (2.500);

Fd = fator de diluição utilizado durante a contagem;

Y = número de trofozoítos contados nos quatro quadrantes laterais da câmara.

Para a seleção do inóculo ideal, diferentes concentrações de trofozoítos, em triplicata, foram testadas (40.000/mL, 60.000/mL e 80.000/mL). Após 48h de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C, cada cultura foi analisada em microscópio invertido (Olympus IX51), verificando seu crescimento, mobilidade e aderência.

4.6 Teste preliminar

Inicialmente foi realizado o teste preliminar (“screening”) de todos os extratos brutos e triterpenos, a fim de selecionar aqueles com efeito sobre a viabilidade e/ou vitalidade dos trofozoítos de *E. histolytica*.

Os extratos brutos (16,5 mg) (Quadro II) e triterpenos (14 mg a 19 mg) (Quadro III) foram solubilizados em 1 mL de DMSO obtendo-se, respectivamente, soluções de 16,5 mg/mL e 14 mg/mL a 19 mg/mL. Alíquotas de 200 µL destas soluções foram diluídas em meio de cultura YI-S para um volume final de 10 mL, obtendo-se concentrações finais de 0,33 mg/mL (extratos brutos) e 0,28 mg/mL a 0,38 mg/mL (triterpenos). As soluções preparadas foram filtradas em membrana esterilizante de nitrocelulose (0,22 µm) e alíquotas desta foram adicionadas, separadamente, a tubos de vidro contendo trofozoítos (inóculo previamente padronizado) e meio de cultura a fim de obter concentração máxima para teste de 17 µg/mL (extratos brutos) e 100 µM (triterpenos), em um volume final de 6 mL. Cada “screening” foi realizado em triplicata e repetido duas vezes utilizando-se controle negativo, controle positivo (metronidazol - MTZ) e controle de DMSO (0,5%).

Após 48h de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C, cada tubo foi analisado em microscópio invertido. Os extratos brutos e triterpenos que apresentaram atividade foram, posteriormente, associados ao parasito em concentrações crescentes para a determinação da IC₅₀.

4.7 Determinação da IC₅₀

4.7.1 Padronização da técnica

Foi utilizado o MTZ na padronização da técnica de determinação da IC₅₀. Este fármaco é amplamente descrito em todo o mundo e comumente utilizado durante experimentos de atividade amebicida. O MTZ (20,0 mg) foi dissolvido diretamente em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se solução de 20,0 mg/mL. Alíquota de 200,0 µL desta solução foi diluída em meio de cultura YI-S para um volume final de 10 mL, obtendo-se concentração final de 0,4 mg/mL. A solução preparada foi, posteriormente, filtrada em membrana esterilizante de nitrocelulose (0,22 µm) e alíquotas desta foram adicionadas a tubos de vidro contendo trofozoítos de *E. histolytica* (inóculo previamente padronizado) e meio de cultura a fim de obter concentrações finais variando de 0,4 a 12,8 µM, em um volume final de 6,0 mL.

Do mesmo modo, os triterpenos que apresentaram atividade no “screening” foram adicionados, separadamente, a novos tubos contendo trofozoítos de *E. histolytica* e meio de cultura, a fim de obter concentrações finais variando de 1 a 32 µM, em um volume final de 6,0 mL.

Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C durante intervalos de 24 e 48 h. Após os períodos de incubação, a viabilidade foi verificada qualitativamente em microscópio invertido observando-se a mobilidade e aderência dos trofozoítos. Para a determinação da IC₅₀ os trofozoítos foram quantificados através da técnica de contagem de leucócitos adaptada (Carvalho & Silva, 1988), detalhada anteriormente no item 4.5.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes. Foram utilizados controle negativo, controle positivo (MTZ) e controle de DMSO (0,5%).

4.8 Avaliação da citotoxicidade

Para determinar o potencial citotóxico dos compostos ativos, foi avaliado “in vitro” o efeito destes sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a fim de sinalizar o nível de segurança em utilizações futuras. As análises a seguir foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Departamento de Fisiologia) da UFMG com a colaboração da Prof.^a Elaine Maria de Souza Fagundes.

4.8.1 Células mononucleares do sangue periférico humano

As amostras de PBMC foram cedidas pela Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), provenientes de sangue venoso heparinizado de 11 voluntários saudáveis. As PBMC foram separadas conforme o método descrito por Souza-Fagundes e colaboradores (2003), com modificações. O sangue heparinizado foi aplicado a tubos de 15 mL, estéreis, contendo uma mistura de Ficol/Hypaque[®] (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:2. Estes tubos foram centrifugados por 40 minutos, 1400 rpm à 18 °C. Após a centrifugação, as PBMC foram coletadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferidas para um tubo de fundo cônico estéril. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), centrifugadas (7 minutos, 1400 rpm à 24 °C) e a densidade celular ajustada para $2,0 \times 10^6$ células/mL. 100 µL desta suspensão foram adicionadas a placa de microtitulação de 96 poços. A cada poço foi acrescentado 20 µL de fitohemaglutinina (PHA a 25 µg/mL) e 60 µL de meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh+ (previamente inativado), 3% de L-Glutamina (2mM), 2% da mistura antibiótico/antimicótico (1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg / mL de fungisone) para evitar uma possível contaminação bacteriana ou fúngica. A placa foi incubada por 24 h em atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade, 37 °C para estabilização. Posteriormente, as substâncias testes foram dissolvidas em DMSO e associadas à cultura de células, separadamente, através de diluições seriadas em diferentes concentrações (0,25 a 100 µM). As placas foram novamente incubadas, por 72 h sob as mesmas condições anteriores.

Os ensaios foram realizados em triplicata, repetidos duas vezes independentes e utilizando-se como controle positivo a cisplatina, composto utilizado na terapia anticâncer (Delarmelina *et al.*, 2012). O controle do solvente (DMSO) foi realizado na concentração máxima de 0,5%. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT, descrito a seguir.

4.8.2 Avaliação da viabilidade e proliferação celular

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan. A metodologia utilizada foi descrita por Monks e colaboradores (1991), com modificações.

Restando 4 h para o fim do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço 20 µL de uma solução de MTT (2,5 mg/mL). Após as 4 h de incubação e formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado à vácuo. A cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan, formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

Os resultados foram expressos em percentual de proliferação em relação à cultura controle, sendo calculado a partir da fórmula:

$$\text{Porcentagem de proliferação} = (A_{595} \text{ teste} \times 100) \div A_{595} \text{ controle negativo}$$

Sendo:

A_{595} = absorvância a 595 nm.

A_{595} controle negativo = absorvância da cultura controle estimulada com PHA.

A_{595} teste = absorvância referente à ação da substância testada.

As substâncias que apresentaram significativa inibição da proliferação celular foram submetidas à determinação da concentração inibitória de 50% (IC_{50}).

4.9 Análise estatística

Na avaliação dos ensaios “in vitro” foram utilizadas de técnicas de análise descritiva, como gráficos de dispersão, para demonstrar a linha de tendência da relação entre a concentração da substância teste e o percentual de inibição do protozoário *E. histolytica*. A técnica de análise de regressão linear simples (Werkema & Aguiar 2006) foi utilizada para estimar a relação entre a concentração e o percentual de inibição. A variável resposta ou dependente foi o percentual de inibição do crescimento e a variável independente ou explicativa foi a concentração.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para identificar a significância do modelo de regressão obtido, ou seja, avaliar se a concentração influencia de forma significativa a inibição do crescimento. Para validação e posterior utilização da equação de regressão proposta, realizou-se a análise de resíduos e *outliers*. A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada através do Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2 aj.), através do qual se demonstra a proporção da variabilidade de inibição explicada pela concentração da substância testada.

A partir da relação obtida, estimou-se a IC_{50} , bem como seu intervalo de confiança, através da técnica de regressão inversa ou calibração (Werkema & Aguiar 2006). Para determinar a margem de erro utilizou-se o intervalo de confiança estimado para o IC_{50} , obtido através da técnica de regressão inversa, considerando-se uma confiança de 95% e de 90%. O “Software” utilizado foi o “Minitab 15”, ferramenta de Análise de Regressão Linear.

5 RESULTADOS

5.1 Inóculo de *E. histolytica* “in vitro”

O inóculo padrão escolhido foi de 40.000 trofozoítos/mL. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C, a cultura apresentou-se com formação de monocamada de trofozoítos alongados, boa vitalidade e ausência de precipitação (Figura 12). Os inóculos de 60.000/mL e 80.000/mL exibiram culturas com características muito semelhantes, apresentando trofozoítos arredondados e em grumos, com pouca mobilidade, em processo de degeneração e formação de precipitado. Dessa forma, os inóculos de 60.000 e 80.000/mL, foram considerados inadequados para o uso (Figura 13).

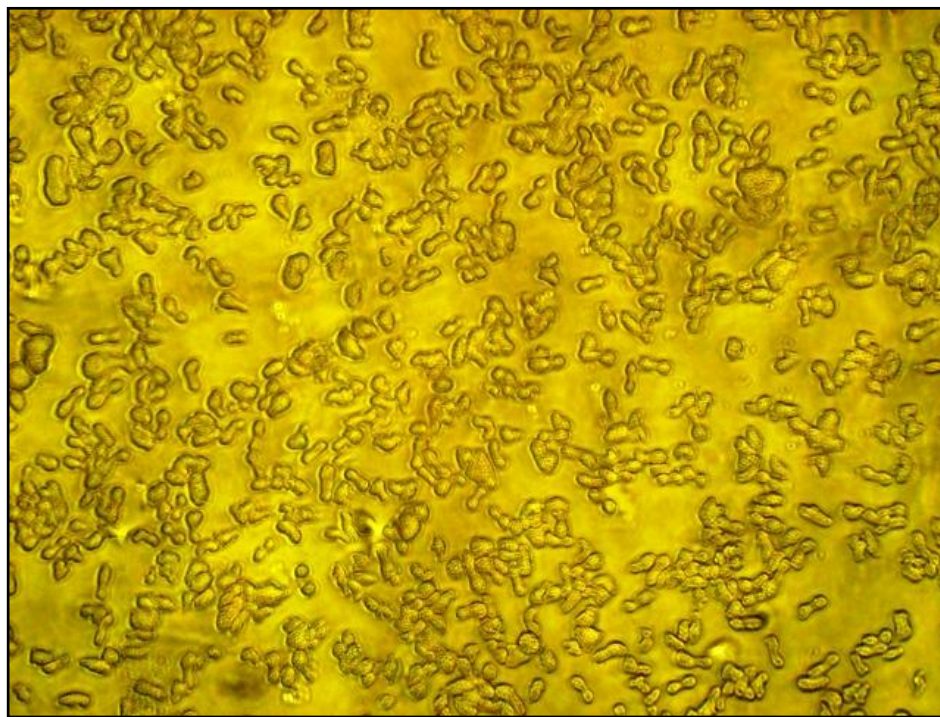


Figura 12 - Foto de trofozoítos de *E. histolytica* (40.000/mL) em meio de cultura (10X)

Autor: Thaisa Helena Silva Fonseca

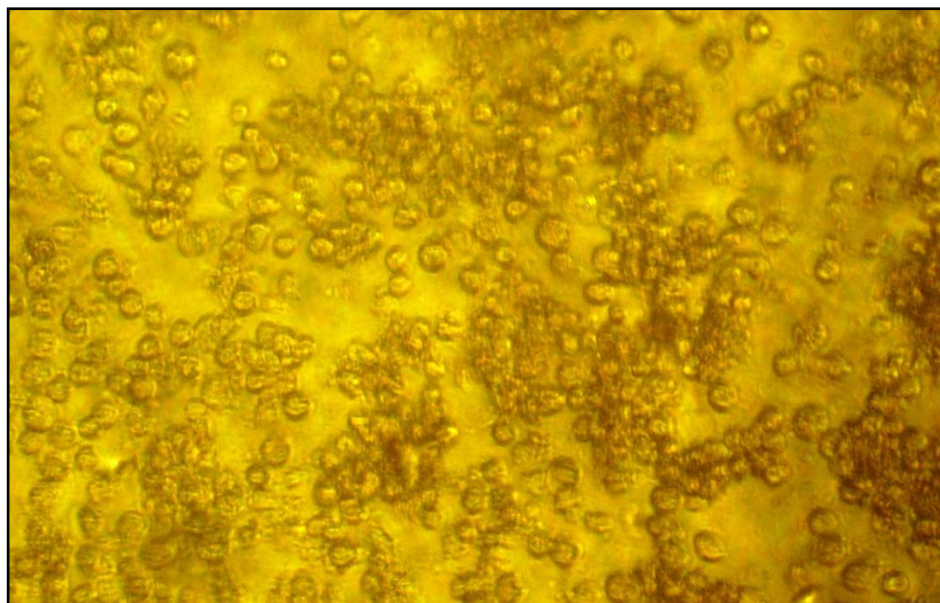


Figura 13 – Foto de trofozoítos de *E. histolytica* (60.000/mL) em meio de cultura (10X)

Autor: Thaisa Helena Silva Fonseca

5.2 Atividade dos extratos brutos e triterpenos sobre trofozoítos de *E. histolytica* “in vitro”

Os extratos brutos e triterpenos testados foram solubilizados em DMSO, o qual em concentração 10 vezes maior que máxima utilizada (0,05%), não inibiu o crescimento dos trofozoítos de *E. histolytica*.

Os extratos brutos provenientes de galhos, cascas e cernes de raízes foram avaliados contra *E. histolytica*. Nenhum dos extratos testados apresentou efeito inibitório até a concentração de 17 µg/mL.

Os triterpenos 3β-hidroxilup-20(29)-eno (**D1**); 3-oxo-11α-hidroxi-lup-20(29)-eno (**D3**) e 3-hidroxi-24,29-dinor-1(10),3,5,7-friedelatetraen-2,21-diona (**D4**), e um derivado obtido a partir de **D1**, 3β-30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno (**D2**), foram avaliados contra *E. histolytica* na concentração máxima de 100 µM. Destes compostos, apenas a tingenona (**D4**) demonstrou alterações morfológicas na cultura, como: aumento de tamanho e vacuolização dos trofozoítos, perda de mobilidade e diminuição da capacidade aderente à superfície dos tubos, e presença de trofozoítos mortos.

5.2.1 IC₅₀ do MTZ e tingenona

Sendo a tingenona a única substância que apresentou atividade amebicida no *screening*, sua IC₅₀ foi determinada. O MTZ, utilizado como um controle da qualidade dos experimentos, também foi avaliado quanto a sua concentração inibitória de 50% do crescimento dos trofozoítos de *E. histolytica*.

Para determinar a IC₅₀ do MTZ, após um período de incubação de 24 e 48 h, o primeiro passo foi identificar o grau de associação entre as variáveis e a tendência de variação que apresentam. Para tanto, construiu-se o gráfico de dispersão ilustrado na figura a seguir:

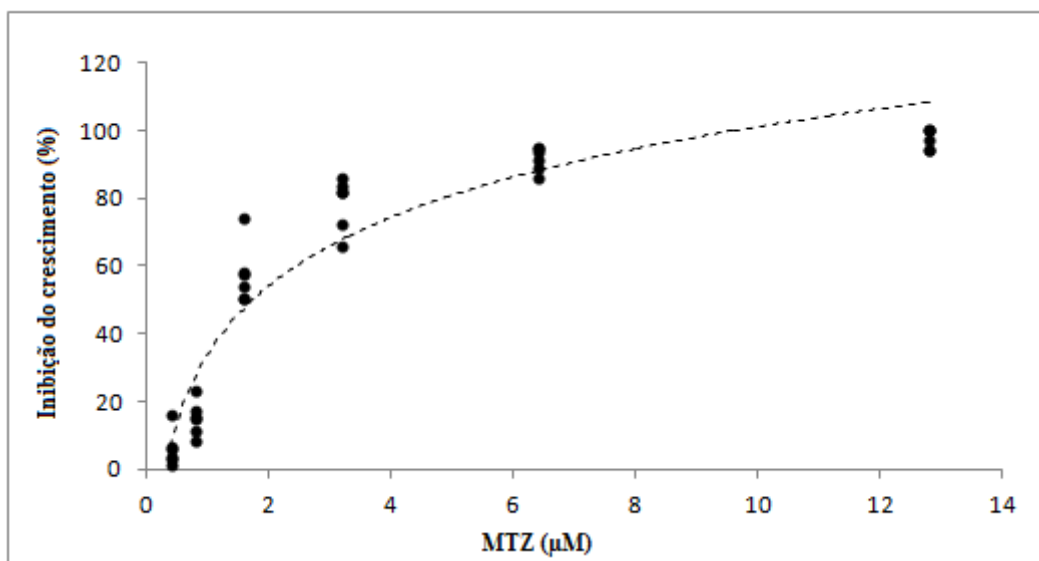


Figura 14 - Gráfico de Dispersão MTZ 24 h (Inibição x Concentração)

Através da Figura 14 pode-se observar que a relação entre concentração e percentual de inibição não é linear, ou seja, a relação entre essas duas variáveis apresenta uma curvatura próxima da curva exponencial. Desta forma, os resultados inviabilizam a obtenção do modelo de regressão linear para os dados em sua forma natural, tornando necessária a realização de uma transformação das variáveis de forma a tornar a relação linear. Uma forma de tornar a relação observada em linear consiste em determinar o logaritmo natural (Ln) da concentração de MTZ (Figura 15).

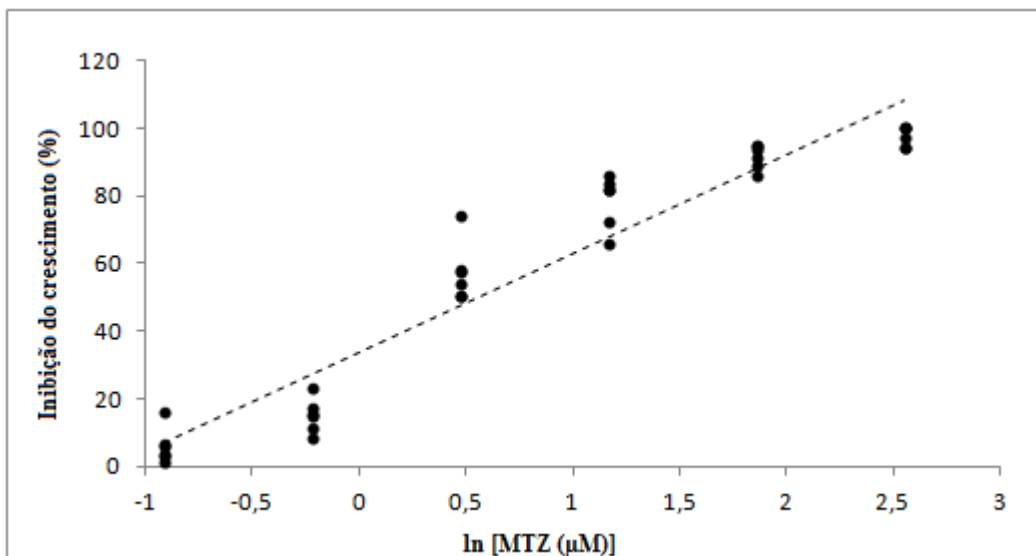


Figura 15 - Gráfico de Dispersão MTZ 24 h (Inibição x Ln [Concentração])

Através de ANOVA foi possível identificar se a concentração do MTZ influenciou de forma significativa no percentual de inibição. De acordo com a análise de variância, observou-se uma probabilidade de significância menor que 0,001, demonstrando que existem evidências de que a concentração do MTZ influenciou de forma significativa na inibição do crescimento de trofozoítos de *E. histolytica*. O modelo obtido é apresentado na Tabela 1, descrita a seguir.

Tabela 1 - Modelo de regressão final (MTZ - 24 h)

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante Ln (Concentração)	$\beta_0=33,9$ $\beta_1=29,2$	< 0,001	0,913	< 0,001

$$\text{Percentual de Inibição} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$$

Analisando os dados da Tabela 1, conclui-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), demonstrando que o logaritmo da concentração de MTZ é importante para explicar o percentual de inibição. O

valor positivo do coeficiente angular indicou que quanto maior a concentração da substância, maior será o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2) obtido para o modelo foi de 0,913; demonstrando que 91,3% da variabilidade da resposta, percentual de inibição, é explicado utilizando o logaritmo da concentração da substância. Os outros 8,7 % são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo, sendo esse considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado foi de 10,8%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, sendo independentes e normalmente distribuídos. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Como o modelo se mostrou adequado, a etapa final foi determinar o valor da IC_{50} , ou seja, a concentração do MTZ que produz um efeito inibitório de 50% do crescimento da cultura de *E. histolytica*. Para tanto, utilizou-se a técnica de regressão inversa, conhecida também como calibração (Werkema & Aguiar 2006). A equação de regressão obtida a partir dos experimentos é descrita a seguir:

$$Inibição(\%) = 33,9 + 29,2 \cdot Ln(Concentração)$$

$$Concentração(MTZ) = \exp\left(\frac{Inibição - 33,9}{29,2}\right)$$

Substituindo a inibição por 50 na equação acima, conclui-se que o valor da IC_{50} estimado para o MTZ é de 1,74 μ M. O erro padrão para a IC_{50} foi 1,18 μ M. Para um cálculo mais preciso, torna-se necessário a construção do intervalo de confiança para a IC_{50} . A Tabela 2, descrita a seguir, apresenta o valor estimado para a IC_{50} bem como seu intervalo com 90 % e 95 % de confiança.

Tabela 2 - Intervalo da IC₅₀ (MTZ - 24 h)

Substância	IC ₅₀ (μM)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	1,74	95%	1,24	2,42
		90%	1,32	2,29

A partir da Tabela 2, conclui-se que a IC₅₀ para o MTZ, após 24 h de incubação, foi de 1,74 μM, variando de 1,24 a 2,42 μM com 95% de confiança. Considerando-se uma confiança de 90%, este intervalo variou de 1,32 a 2,29 μM.

Para determinar a IC₅₀ do MTZ, após um período de incubação de 48 h, foi construída a Figura 16, visualizada a seguir:

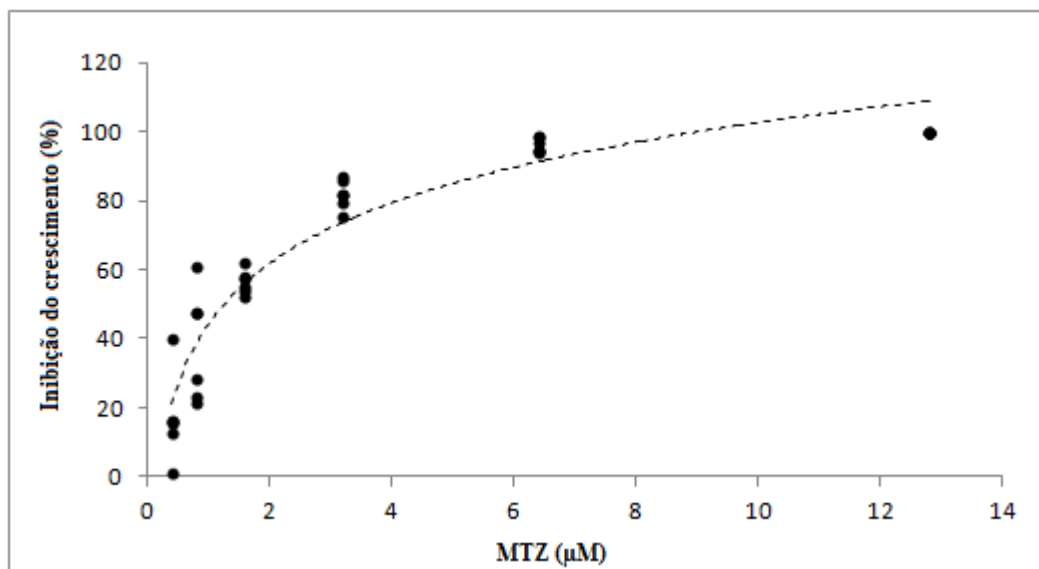


Figura 16 - Gráfico de Dispersão MTZ 48 h (Inibição x Concentração)

Como na análise anterior, observou-se que a linha de tendência entre a concentração e o percentual de inibição do crescimento não é linear. Assim os dados foram tratados como anteriormente, quando foi determinada a IC₅₀ do MTZ em 24 h. Uma forma de tornar a relação observada linear consiste em determinar o logaritmo natural (Ln) da variável concentração do MTZ (Figura 17).

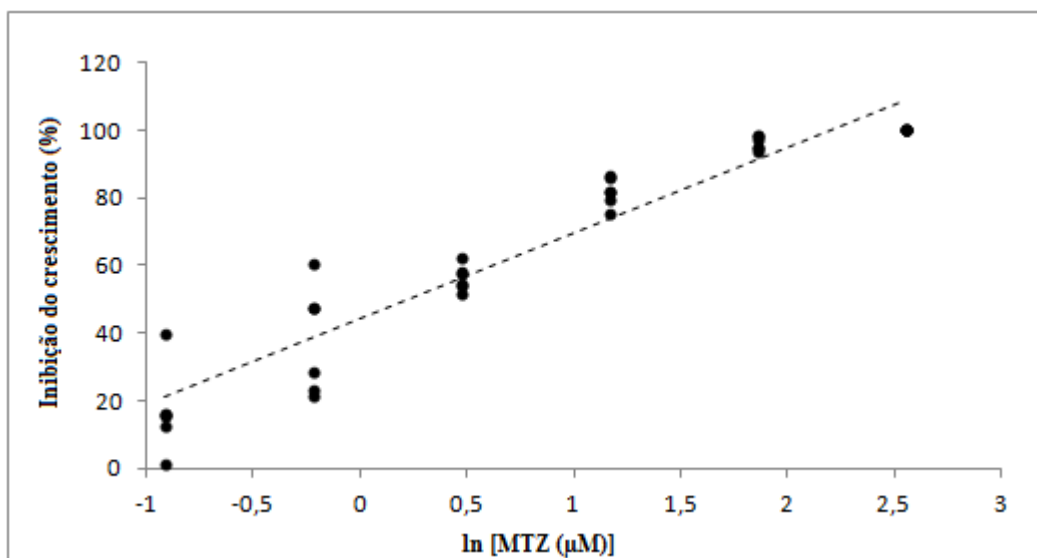


Figura 17 - Gráfico de Dispersão MTZ 48 h (Inibição x Ln[Concentração])

Através do uso da escala logarítmica foi possível estimar a relação entre a concentração do MTZ e o percentual de inibição em 48 h. De acordo com a análise de variância, observou-se uma probabilidade de significância menor que 0,001, demonstrando que existem evidências de que a concentração do MTZ impacta de forma significativa na inibição do crescimento de trofozoítos de *E. histolytica* (Tabela 3).

Tabela 3 - Modelo de regressão final (MTZ - 48 h)

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante Ln (Concentração)	$\beta_0=44,2$ $\beta_1=25,3$	< 0,001	0,903	< 0,001

$$\text{Percentual de Inibição} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$$

Analisando os dados da Tabela 3, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), mostrando que o uso do logaritmo da concentração do MTZ é importante para se explicar o percentual de inibição. O

valor positivo do coeficiente angular indica que quanto maior a concentração da substância, maior será o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2), obtido para o modelo, foi de 0,903; mostrando que 90,3% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição em 48 h é explicado utilizando o logaritmo da concentração da substância. Os outros 9,7% são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo, sendo esse considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 10%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, o que valida o modelo utilizado. A próxima etapa foi estimar o valor do IC_{50} , em 48 h, utilizando a técnica de regressão inversa (Werkema & Aguiar 2006). A equação de regressão obtida a partir dos experimentos é descrita a seguir.

$$Inibição(\%) = 44,2 + 25,3 \cdot Ln(Concentração)$$

$$Concentração(MTZ) = \exp\left(\frac{Inibição - 44,2}{25,3}\right)$$

Substituindo a inibição por 50 na equação acima, concluiu-se que o valor do IC_{50} estimado para o MTZ é de 1,26 μ M (Tabela 4).

Tabela 4 - Intervalo da IC_{50} (MTZ - 48 h)

Substância	IC_{50} (μM)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	1,26	95%	0,88	1,80
		90%	0,93	1,74

A partir dos resultados encontrados na Tabela 4, concluiu-se que a IC_{50} para o MTZ, após 48 h de incubação, é de $1,26 \mu\text{M}$, variando de $0,88$ a $1,80 \mu\text{M}$ com 95% de confiança. Considerando-se uma confiança de 90%, este intervalo variou de $0,93$ a $1,74 \mu\text{M}$. O erro padrão obtido foi de $1,17 \mu\text{M}$.

A tingenona foi o triterpeno que apresentou atividade no *screening* inicial. Desta forma, prosseguiram-se os estudos de atividade com esta substância a fim de determinar sua IC_{50} após um período de incubação de 24 h e 48 h. Foram utilizadas as mesmas metodologias descritas anteriormente para o MTZ.

Assim, construiu-se a Figura 18, que representa o gráfico de dispersão entre o percentual de inibição e a concentração testada.

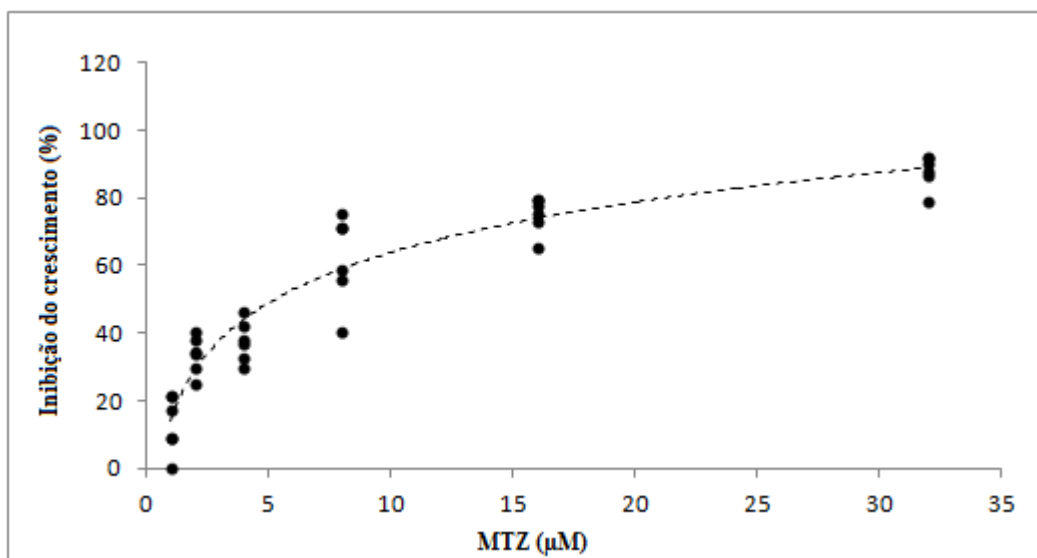


Figura 18 - Gráfico de Dispersão tingenona 24 h (Inibição x Concentração)

Tornando a relação linear, determinou-se o Logaritmo Natural (Ln) da variável concentração (Figura 19).

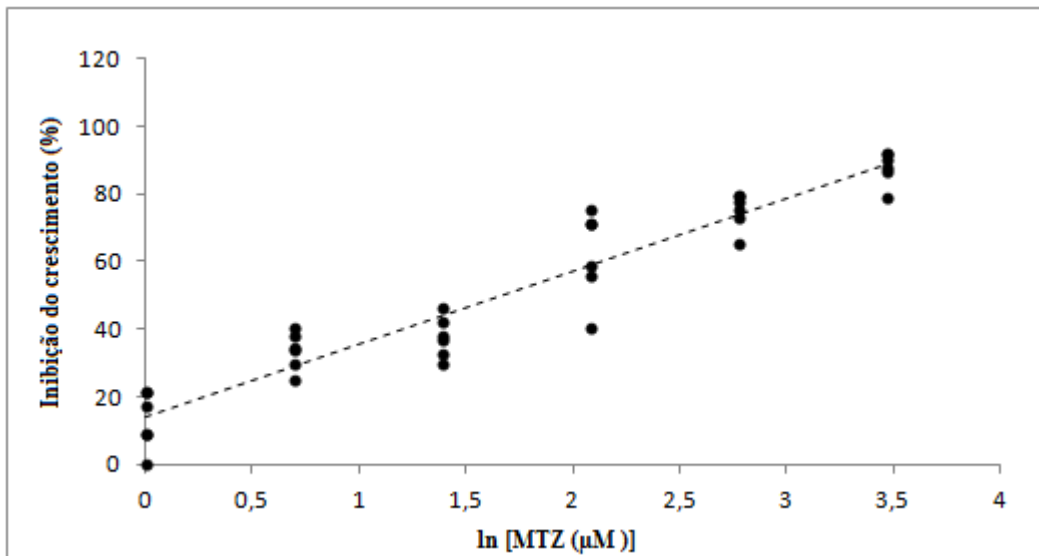


Figura 19 - Gráfico de Dispersão tingenona 24 h (Inibição x Ln[Concentração])

Através do teste de significância do modelo (ANOVA), verificou-se que a concentração da tingenona influenciou de forma significativa no percentual de inibição (Tabela 5).

Tabela 5 - Modelo de regressão final (Tingenona - 24 h)

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante Ln (Concentração)	$\beta_0=14,2$ $\beta_1=21,5$	< 0,001	0,909	< 0,001

$$\text{Percentual de Inibição} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$$

Analisando a Tabela 5, nota-se que 90,9% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição em 24 h foi explicado através do logaritmo da concentração da substância. O desvio padrão do modelo ajustado foi de 8,1 %. Não foram encontrados *outliers*.

Utilizando a técnica de Regressão Inversa, conhecida também como Calibração (Werkema & Aguiar 2006) foi encontrada a seguinte equação de regressão:

$$Inibição(\%) = 14,3 + 21,5 \cdot Ln(Concentração)$$

$$Concentração(Tingenona) = \exp\left(\frac{Inibição - 14,3}{21,5}\right)$$

Substituindo a inibição por 50 na equação acima, concluiu-se que o valor da IC₅₀ estimado para a tingenona foi de 5,26 µM. Para um cálculo mais preciso, torna-se necessário a construção do intervalo de confiança para a IC₅₀. O valor estimado para a IC₅₀, bem como seu intervalo com 90 % e 95 % de confiança é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Intervalo da IC₅₀ (Tingenona - 24 h)

Substância	IC₅₀ (µM)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
Tingenona	5,26	95%	3,75	7,38
		90%	3,97	6,97

A partir dos dados da Tabela 6, concluiu-se que a IC₅₀ para tingenona, após 24 h de incubação, foi de 5,26 µM, variando de 3,75 a 7,38 µM com 95% de confiança, de acordo com o modelo de regressão estimado. Considerando-se uma confiança de 90%, este intervalo varia de 3,97 a 6,97 µM. O erro padrão obtido foi de 1,18 µM.

Para determinar a IC₅₀ da tingenona, após um período de incubação de 48 h, foi construído o gráfico a seguir (Figura 20):

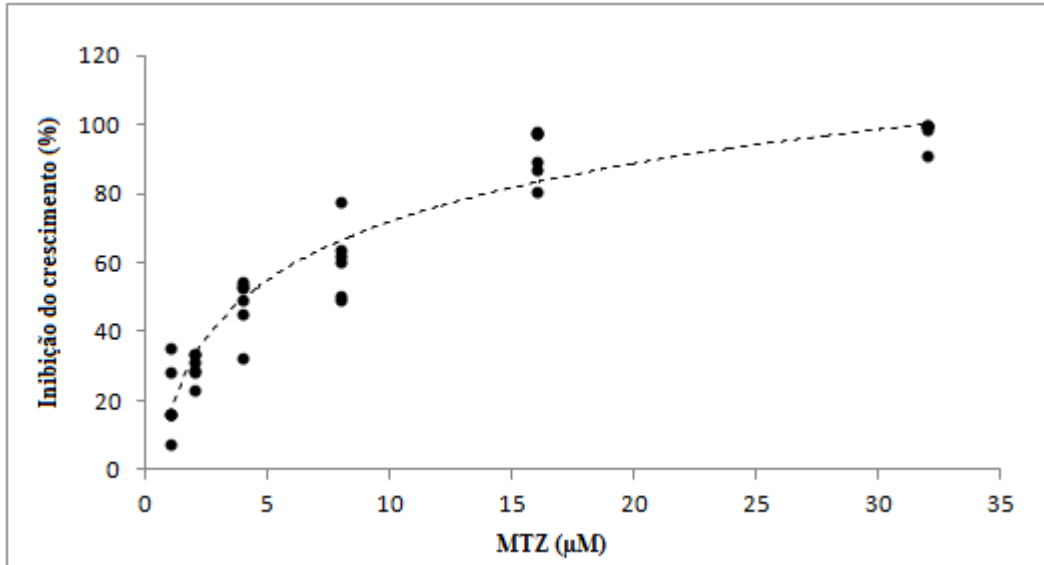


Figura 20 - Gráfico de Dispersão tingenona 48 h (Inibição x Concentração)

Para tornar a relação linear, determinou-se o Logaritmo Natural (Ln) da variável concentração (Figura 21).

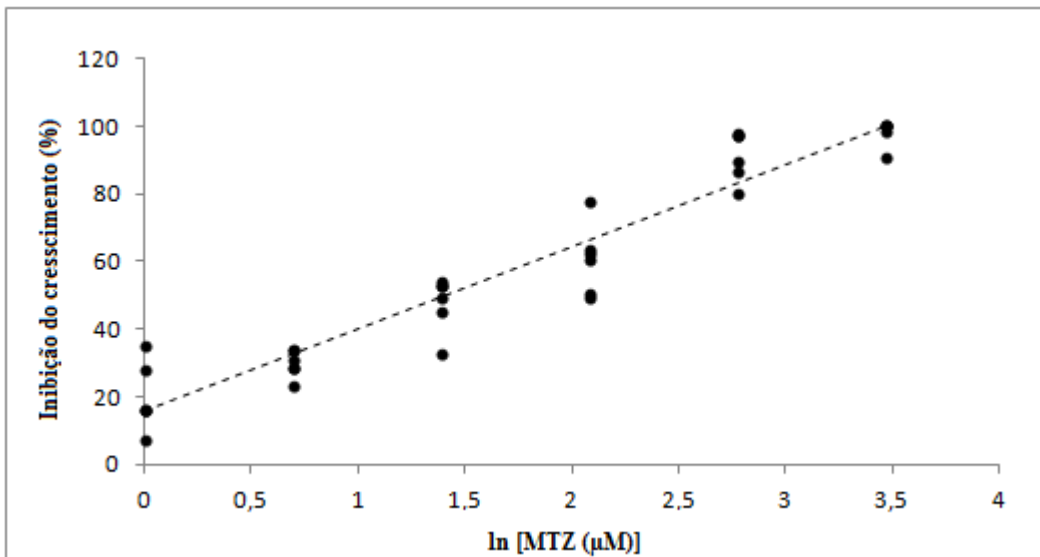


Figura 21- Gráfico de Dispersão tingenona 48 h (Inibição x Ln[Concentração])

Posteriormente, aplicou-se o teste de significância do modelo (ANOVA), verificando que a concentração da tingenona influencia de forma significativa na variável resposta (Tabela 7).

Tabela 7 - Modelo de regressão final (Tingenona - 48 h)

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante Ln (Concentração)	$\beta_0=15,8$ $\beta_1=24,3$	< 0,001	0,918	< 0,001

$$\text{Percentual de Inibição} = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Ln (Concentração)}$$

Analisando a Tabela 7, nota-se que 91,8% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição em 48 h é explicado pelo logaritmo da concentração da substância. O desvio padrão do modelo ajustado é de 8,7%. Não foram encontrados *outliers*.

Através da técnica de Regressão Inversa, estimou-se o valor do IC₅₀ da tingenona em 48 h:

$$\text{Inibição}(\%) = 15,8 + 24,3 \cdot \text{Ln}(\text{Concentração})$$

$$\text{Concentração}(\text{Tingenona}) = \exp\left(\frac{\text{Inibição} - 15,8}{24,3}\right)$$

Substituindo a inibição por 50 na equação acima, conclui-se que o valor do IC₅₀ estimado para a tingenona é de 4,08 μM . Para um cálculo mais preciso, torna-se necessário a construção do intervalo de confiança para a IC₅₀ (Tabela 8).

Tabela 8 - Intervalo da IC₅₀ (Tingenona - 48 h)

Substância	IC ₅₀ (µM)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
Tingenona	4,08	95%	2,95	5,63
		90%	3,12	5,33

A partir dos dados da Tabela 8, concluiu-se que a IC₅₀ para a tingenona, após 48 h de incubação, foi de 4,08 µM, variando de 2,95 a 5,63 µM com 95% de confiança. Considerando-se uma confiança de 90%, este intervalo variou de 3,12 a 5,33 µM. O erro padrão obtido foi de 1,17 µM.

5.3 Ensaio de citotoxicidade

Após a definição da IC₅₀, testes complementares foram realizados para avaliar a citotoxicidade do triterpeno ativo (tingenona) através do ensaio de proliferação de PBMC, tendo como padrão o MTZ. A IC₅₀ encontrada para a tingenona foi de 8,9 µM (6,5 - 12,1 µM). Este resultado revelou-se 1,7 vezes superior a IC₅₀ “in vitro”, da referida substância, em 24 h (5,26 µM) e 2,1 vezes superior em 48 h (4,08 µM). Não foi observado efeito inibitório significativo do MTZ sobre a proliferação de PBMC até a concentração máxima de 100 µM (Tabela 9).

Tabela 9 - Citotoxicidade do MTZ e da tingenona sobre PBMC

Substância	IC ₅₀ (µM) ^a
MTZ	> 100 ^b
Tingenona	8,9 (6,5 – 12,1) ^b
Cisplatina ^c	3,4 (2,8 – 5,9) ^b

^a IC₅₀ concentração mínima que inibe 50% do crescimento de PBMC

^b Intervalo de confiança de 95%

^c Fármaco anticancerígeno referência

6. DISCUSSÃO

Amebíase é uma infecção do trato gastrointestinal humano causada pelo protozoário *E. histolytica*, parasito responsável por originar uma grande variedade de sintomas clínicos. Especula-se que 10% da população mundial esteja infectada por este parasito, entretanto, apenas 1% desenvolve a forma invasiva da doença com manifestações clínicas (Ximénez *et al*, 2009). A amebíase acomete pessoas de ambos os sexos e de todas as idades, e, o risco de infecção varia de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro, as diferentes virulências do parasito (cepas) e a localização geográfica do indivíduo, já que a doença é frequentemente encontrada em regiões de saneamento básico precário (Pritt & Clark 2008).

O MTZ é atualmente o fármaco mais prescrito para a terapêutica dessa parasitose, porém, este medicamento tem sido responsável pela indução de vários efeitos adversos ao paciente, o que têm levado muitos indivíduos à desistência ou a não adesão ao tratamento (Cudmore *et al*, 2004). Casos de resistência ao MTZ em *G. lamblia* e *T. vaginalis* têm sido documentados desde o século passado (Upcroft, 1993; Voolmann, 1993). Em contraste, escassos são os relatos de resistência relacionados a *E. histolytica*, como Palhares (2008) ao observar uma mulher com 34 anos, infectada por *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* e *Iodamoeba butschilli* que, após dois tratamentos consecutivos com MTZ, continuou apresentando cistos dos respectivos parasitos em exames de fezes.

O isolamento e desenvolvimento de novas substâncias visando possibilitar a diminuição de efeitos colaterais provenientes da terapia convencional, além de aumentar o arsenal terapêutico e impedir o surgimento de cepas resistentes, tornou-se atividade de destaque no cenário mundial. Neste contexto, produtos naturais obtidos de plantas, representam uma área promissora para a descoberta de substâncias bioativas inovadoras.

Espécies da família Celastraceae se destacam devido às diversas aplicações na medicina, como: *Austroplenckia populnea* utilizada no tratamento de disenterias (Miranda *et al*, 2009), *Maytenus rigida* para tratar infecções e inflamações (Estevam *et al*, 2009) e *M. truncata* com considerável atividade analgésica e antiulcerogênica (Fonseca *et al*, 2007).

Neste trabalho foi investigada a propriedade amebicida de *M. gonoclada*, utilizando extratos brutos e substâncias isoladas de galhos, cascas e cernes de raízes para avaliar seu provável potencial anti- *E. histolytica*.

Busatti & Gomes (2007) utilizaram método colorimétrico para quantificar o crescimento de *G. lamblia* em placas de 24 poços. A princípio, seguiu-se tal metodologia para avaliar o crescimento de culturas de amebas, entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios durante a quantificação dos parasitos. Assim, optou-se por utilizar tubos de vidro com capacidade de 7 mL, nos quais as amebas apresentaram excelente adaptação. Nestes tubos padronizou-se o inóculo ideal que originasse células em fase exponencial de crescimento, após 48 h de cultivo. Dentre os inóculos testados, 40×10^3 trofozoítos/mL foi o que melhor apresentou formação de monocamada de trofozoítos alongados, com boa vitalidade e ausência de precipitação, considerado o ideal para identificar a ação das substâncias sobre as amebas.

Para serem testadas, todas as substâncias utilizadas neste estudo foram solubilizadas em DMSO em concentração máxima do solvente de 0,05%. Em concentração superior a utilizada, não foram observadas alterações morfológicas e no crescimento da cultura, corroborando com dados da literatura (Bharti *et al*, 2006; Busatti *et al*, 2007). Feito isto, passou-se para a avaliação da atividade dos extratos e triterpenos, solubilizados em DMSO, sobre culturas de *E. histolytica*.

Silva e colaboradores (2012) demonstraram o elevado potencial giardicida (IC_{50} : 1,02 $\mu\text{g/mL}$) do extrato hexânico de galhos de *M. gonoclada* sobre culturas de *G. lamblia*. Tais resultados incentivaram a avaliação da atividade amebicida de *M. gonoclada*, já que alguns fármacos utilizados como giardicidas são também aplicados como amebicidas (Gardner & Hill 2001). Entretanto, no presente estudo, nenhum extrato bruto testado apresentou efeito inibitório até a concentração de 17 $\mu\text{g/mL}$. Assim, considerando a complexidade de substâncias presentes em extratos brutos (Barreto Júnior *et al*, 2005), sugere-se que uma tenha interferido na atividade da outra por inibição, competição ou impedimento físico ao alvo de ação da mesma.

Quatro triterpenos foram isolados dos extratos avaliados, sendo que somente a tingenona apresentou propriedade amebicida. Dentre os triterpenos testados, a tingenona é a mais polar e esta peculiaridade pode estar relacionada ao fato de tal substância possuir atividade, já que sua solubilidade é maior. A solubilidade das substâncias químicas em meio aquoso é uma propriedade físico-química importante que proporciona melhor atividade antimicrobiana. Os triterpenos inativos são menos polares, sugerindo que a ausência de sua atividade esteja ligada à baixa solubilidade.

Prosseguindo com os estudos de atividade amebicida, iniciamos a padronização da técnica da IC₅₀ utilizando o MTZ e, em seguida a tingenona. Em uma busca nas publicações disponíveis, identificou-se que os valores de IC₅₀ do MTZ, para *E. histolytica*, são bastante variados. Verificou-se, ainda, que diferentes tempos de exposição das substâncias teste às amebas são apresentados sem nenhuma justificativa apresentada pelo tratamento estatístico (Bansal *et al*, 2004; Abid *et al*, 2008; Saadeh *et al*, 2009; Sarker *et al*, 2010). Estes resultados demonstram que a padronização na determinação da atividade amebicida é necessária para que haja uma maior fidedignidade nos resultados. Considerando o exposto, sugere-se que a atividade amebicida de novos fármacos possa não revelar seu verdadeiro potencial. Desta forma, decidiu-se estimar inicialmente o intervalo de tempo apropriado para a avaliação da atividade do MTZ frente às amebas e, ainda, determinar o impacto desta variável na IC₅₀ da substância.

Foram utilizadas técnicas de análise descritiva e gráficos de dispersão, através dos quais, foi observada a tendência da relação entre a concentração das substâncias e o percentual de inibição do crescimento de *E. histolytica*. Estes resultados foram validados pela técnica de Análise de Regressão Linear Simples (Werkema & Aguiar 2006).

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos foram independentes e normalmente distribuídos, indicando a adequação do modelo escolhido. Posto isto, estimou-se a IC₅₀ das substâncias, bem como seu intervalo de confiança através de Regressão Inversa (Werkema & Aguiar 2006), considerando-se uma confiança de 95% e de 90%.

O valor de IC₅₀ sobre *E. histolytica*, encontrado para o MTZ foi de 1,74 µM variando de 1,24 a 2,42 com 95% de confiança em 24 h. A IC₅₀ do MTZ em 48 h foi 1,26 µM, variando de 0,88 a 1,80 com 95% de confiança. Neste caso, o valor estimado para IC₅₀ em 24 h está contido no valor estimado para 48 h, significando que não existe diferença entre os tempos avaliados. Dentre as publicações encontradas na literatura, em relação a IC₅₀ do MTZ, poucas apresentam resultados compatíveis aos encontrados neste estudo (Wright *et al*, 1988; Singh *et al*, 2005; Abid *et al*, 2008; Bharti *et al*, 2003; Bharti *et al*, 2006).

O efeito da tingenona sobre as culturas de ameba foi verificado após incubação de 24 e 48 h. O valor de IC₅₀ sobre *E. histolytica*, em 24 h foi de 5,26 µM variando de 3,75 a 7,38 com 95% de confiança. A IC₅₀ da tingenona encontrada em 48 h foi 4,08 µM, variando de 2,95 a 5,63 com 95% de confiança. Também, neste caso, o valor estimado para IC₅₀ em 24 h

está contido no valor estimado para 48 h, significando que não existe diferença entre os tempos avaliados. Além disto, em ambos os tempos foi observado que a substância atuou de forma significativa ($p < 0,001$) na inibição do crescimento do parasito.

Comparando a IC_{50} do MTZ e tingenona, verificou-se que é necessário cerca de 3 vezes mais quantidade de tingenona para uma mesma atividade. Apesar desta diferença, a atividade apresentada pela tingenona pode ser considerada muito boa, por ser um metabólito majoritário encontrado em algumas espécies da família Celastraceae (Rodrigues *et al*, 2012) e que grandes quantidades da mesma são facilmente produzidas. Estudos revelaram que a tingenona apresenta excelente atividade contra trofozoítos de *G. lamblia* (IC_{50} : 0,74 μ M) (Mena-Rejón *et al*, 2007) e inibição total do crescimento de *Trypanosoma cruzi* (Godjiman *et al*, 1985), confirmando o elevado potencial antiparasitário que os triterpenos quinonametídeos apresentam.

Com relação ao mecanismo de ação, até mesmo o MTZ, fármaco utilizado há anos, não apresenta seu mecanismo completamente elucidado. O mecanismo de ação do MTZ inicia-se quando o mesmo penetra por difusão passiva nas células. Os microrganismos possuem componentes transportadores de elétrons, conhecidos por ferridoxinas, pequenas proteínas com potencial redox negativo. Organismos anaeróbios susceptíveis ao MTZ geram sua energia por meio da fermentação oxidativa do ácido pirúvico. A descarboxilação do piruvato, catalisada pela enzima piruvato-ferridoxina oxidoreductase (PFOR), libera elétrons que reduzem a ferridoxina, a qual doa seus elétrons para o MTZ (Brunton *et al*, 2006). A transferência de um único elétron ao MTZ forma o radical aniônico nitro ($NO^{\cdot-}$) altamente reativo e tóxico para os microrganismos anaeróbios. Este radical inibe a síntese de DNA, causando a fragmentação do mesmo e de outras biomoléculas vitais, que interrompem a divisão e a motilidade do parasito, levando-o a morte (Löfmark *et al*, 2010).

O mecanismo de ação dos triterpenos ainda não é bem esclarecido. Especula-se que tais substâncias levem ao rompimento da membrana celular do microrganismo, visto que estes compostos são bastante lipofílicos (Kuethe *et al*, 2007; Saleem *et al*, 2010). O mecanismo de ação proposto para a potente atividade da tingenona está relacionado à sua possível interação com o DNA ou à inibição de sua síntese (Kayser *et al*, 2002).

Ainda ressalta-se que, o desenvolvimento de novos fármacos vai além da atividade biológica e facilidade de obtenção da substância. Questões como toxicidade, são imperativas para o direcionamento de uma substância para os ensaios clínicos.

Para ser aprovada em um teste de citotoxicidade “in vitro”, uma substância química não deverá causar a morte de células humanas nem afetar suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, é possível detectar a ocorrência de lise celular, inibição do crescimento celular e outros efeitos gerados pela associação dessas células com uma substância química (Malmonge *et al*, 1999). Células primárias, isoladas de tecidos, possuem muitas propriedades semelhantes a células normais “in vivo”, tornando possível a realização de ensaios de citotoxicidade, “in vitro”, específicos contra células de vários tecidos. Nessa perspectiva, as PBMC constituem um interessante modelo para a avaliação de toxicidade “in vitro” (Das Sarma *et al*, 2007; Kundakoviae *et al*, 2006).

O MTZ e tingenona foram avaliados quanto à citotoxicidade sobre PBMC. O MTZ não demonstrou efeito inibitório significativo até a concentração máxima testada (100 µM) e este resultado corrobora com estudos previamente realizados (Busatti *et al*, 2007; Budakoti *et al*, 2009). A IC₅₀ encontrada para tingenona foi de 8,9 µM. Neste caso, a dose citotóxica está muito próxima da dose amebicida, o que dificulta o prosseguimento dos estudos com a substância *in natura*. Estes resultados demonstram uma baixa segurança da tingenona como amebicida.

A citotoxicidade da tingenona sobre células humanas poderia ser uma restrição para a sua utilização em tratamentos antiparasitários (Mena-Rejón *et al*, 2007). Contudo, modificações estruturais na molécula podem produzir derivados com potente atividade e menor toxicidade.

Considerando as informações disponíveis sobre a relação estrutura-atividade das substâncias, alguns critérios são utilizados para prever ou justificar a citotoxicidade de um composto. No caso dos triterpenos quinonametideos, a citotoxicidade é explicada pela presença de conjugações estendidas de dupla ligação no anel B, presença de grupo carbonila no carbono 2 (C-2) e, pequenos grupos éster como substituinte em C-3 (Ravelo *et al*, 2004). A relação estrutura-atividade da tingenona sugere que os anéis A e B desta substância contenham um grupo carbonila α,β -insaturado, determinante para a citotoxicidade observada (Gomes *et al*, 2011).

Modificações estruturais em compostos biologicamente ativos, constituem, certamente, o método mais utilizado para a obtenção de moléculas com maior atividade (Cechinel Filho & Yunes 1998). Assim sendo, a tingenona, comumente isolada com rendimentos elevados, apresenta material de partida suficiente para a obtenção de derivados mais ativos e menos tóxicos, uma vez que a síntese total destes compostos torna-se frequentemente inviável (Buffa Filho *et al*, 2002).

Recentemente, estudos com um derivado friedelano, conhecido como friedelina, relataram atividade antiproliferativa, pró apoptótica (Martucciello *et al*, 2010), anti-inflamatória, analgésica e antipirética (Antonisamy *et al*, 2011). Pesquisas com um derivado lupano, conhecido como NVX-207, confirmaram que tal composto apresentou excelente resposta clínica em cães portadores de câncer (Willmann *et al*, 2009). Além disso, Sotanaphum e colaboradores (2005), por meio da produção de derivados da tingenona, comprovaram que algumas dessas substâncias apresentam menor citotoxicidade frente a células Vero.

Dessa forma, um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a biologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, de forma mais rápida e consistente serão alcançados os objetivos almejados.

7. CONCLUSÃO

- Dentre os extratos brutos e triterpenos isolados de *Maytenus gonoclada*, a tingenona apresentou promissora atividade amebicida;
- A atividade amebicida do MTZ e da tingenona podem ser avaliadas em 24 ou 48 horas;
- Apesar da substancial atividade amebicida apresentada pela tingenona, sua utilização *in natura* torna-se dificultada devido à estreita diferença entre as doses citotóxica e amebicida encontrada;

REFERÊNCIAS

Abid M, Agarwal SM, Azam A 2008. Synthesis and antiamoebic activity of metronidazole thiosemicarbazone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43(9): 2035-2039.

Ackers JP 2002. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of biosciences**, 27(6): 573-578.

Al-Ajmi MF 2007. **Comparative study of some *Maytenus* species growing in Saudi Arabia**, PhD Thesis, Universidade King Saud, Dhul q'adah, 294pp.

Antonisamy P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S 2011. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 63(8): 1070-1077.

Araújo FM.; Passos MGVM; Lima EO; Roque NF; Guedes MLS; Souza-Neta LC; Cruz F G; Martins DJ 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana* C. Müller (Papilionoideae-Leguminosae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20(10): 1805-1810.

Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N 2004. In vitro activity of antiamoebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 3: 27.

Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. **Indian Journal of Medical Research**, 124 (2): 189-194.

Barraca AS 1999. **Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas**, Relatório de Estágio Supervisionado em Produção Vegetal II, Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 49pp.

Barreto Júnior AG, Biscaia Junior EC, Veiga Junior VF, Pinto AC, Carvalhaes SF, Maciel MAM 2005. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, 28(4): 719-722.

Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P 2002. Is metronidazole carcinogenic? **Mutation Research**, 511: 133-144.

Bhat AR, Athar F, Azam A 2009. Bis-pyrazolines: Synthesis, characterization and antiamoebic activity as inhibitors of growth of *Entamoeba histolytica*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44: 426-431.

Bharti SN, Naqvi F, Azam A 2003. Synthesis, Spectral Studies and Screening for Amoebicidal Activity of New Palladium (II) Complexes derived from Thiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13: 689-692.

Bharti N, Singh S, Naqvi F, Azam A 2006. Isolation and in vitro antiamoebic activity of iridoids isolated from *Kigelia pinnata*. **Arkivoc**, 69-76.

Braga LL, Gomes ML, Silva MW, Façanha FE, Fiúza L, Mann BJ 2001. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in Northeastern, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 65(4): 268-271.

Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, 33 (6): 1359-1369.

Brandt H, Tamayo RP 1970. Pathology of human amebiasis. **Human Pathology**, 1(3): 351-384.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL 2006. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11 ed, Mcgraw-hill Interamericana, Rio de Janeiro.

Budakoti A, Bhat AR, Azam A 2009. Synthesis of new 2-(5-substituted-3-phenyl-2-pyrazoliny)-1, 3-thiazolino[5,4-b]quinoxaline derivatives and evaluation of their antiamebic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44: 1317-1325.

Busatti HGNO, Vieira AED, Viana JC, Silva HE, Souza-Fagundes EM, Martins-Filho AO, Alves RJ, Gomes MA 2007. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. **Parasitology Research**, 102(1): 145-149.

Busatti HGNO, Gomes MA 2007. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitology Research**, 101(3): 819-821.

Buffa Filho W, Pereira AMS, França SC, Furlan Maysa 2011. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Ilcifolia*. **Eclética Química** 27: 403-416.

Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50(4): 412-419.

Campanelli AR, D'alagni M Betolo GBM, 1980. Spectroscopic evidence for the interaction of tingenone with DNA. **FEBS Lett.**, 122: 256- 260.

Carvalho MG, Silva MBS 1988. **Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação**. Imprensa Universitária, Belo Horizonte, 139pp.

Carvalho-Okano RM 1992. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil Extra Amazônico**. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 522pp.

Carvalho PRF, Silva DHS, Bolzani VS, Furlan M 2005. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, 2: 367-372.

Cechinel Filho V, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, 21: 99-105.

Chen HT, Hsu YH, Chang YZ 2004. Fulminant amebic colitis: recommended treatment to improve survival. **Tzu Chi Medical Journal**, 16(1): 1-8.

Chodhary N, Sekhon BS 2011. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 2(2): 55-70.

Clark CG 1998. *Entamoeba dispar: an organism reborn*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 92(4): 361-364.

Cordeiro TGP, De Macedo HW 2007. Amebíase. In: **Revista de Patologia Tropical**, Rio de Janeiro, 36(2): 119-128.

Corsino J, Carvalho PRF, Kato MJ, Latorre LR, Oliveira OMMF, Araújo AR, Bolzani VS, França SC, Pereira MAS, Furlan M, 2000. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, 55(7): 741-748.

Costa PM, Ferreira PMP, Bolzani VS, Furlan M, Santos VAFFM, Corsino J, Moraes, M. O, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C 2008. Antiproliferative activity of pristimerin isolated of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, 22: 854-863.

Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE 2004. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 17(4): 783-793.

Cunha AS, Castro L, Rocha P 1991. Amebíase. In: **Tópicos em Gastroenterologia Tropical**, Rio de Janeiro. p. 287-316.

Das Sarma M, Ghosh R, Patra A, Hazra B 2007. Synthesis and antiproliferative activity of some novel derivatives of diospyrin, a plant-derived naphthoquinonoid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15: 3672-3677.

Delarmelina JM, Batitucci MCP, Gonçalves JLO 2012. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.**, 17(2): 1028-4796.

De Rezende HA, Cocco MIM 2002. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem**, 36(3): 282-288.

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. 42: 277-278.

Domingo V, Arteaga JF, Moral JFQ, Barrero AF 2009. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. **Natural Product Reports**, 26: 115-134.

Duarte LP 2000. **Estudo químico, estrutural e da atividade bacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea***. PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Eichinger D 2001. A Role for a Galactose Lectin and Its Ligands During Encystment of *Entamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 48 (1): 17-21.

Estevam CS, Cavalcanti AM, Cambui EVF, Araújo Neto V, Leopoldo PTG, Fernandes RPM, Araujo BS, Porfírio Z, Sant'Ana AEG 2009. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 299-303.

Feitosa LFM 1986. **Aspectos da amebíase intestinal e hepática no Hospital Universitário Getúlio Vargas (Manaus - AM)**. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,

Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GCM, Duarte LP, Silva RP, Jorge RM, Tagliati CA, Zani CL, Alves TMA, Peres V, Vieira-Filho AS 2007. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, anti-dematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, 30(4): 842-847.

Gardner TB, Hill DR 2001. Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(1): 114-128.

Ghoshal S, Lakshmi V 2002. Potencial Antiamoebic Property of the Roots of *Piper longum* Linn. **Phytotherapy Research**, 16(7): 689-691.

Godjiman SG, Turrens JF, Marini-Bettolo GB, Stoppani AOM 1985. Effect of tingenone, a quinine triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, 41: 646-648.

Gomes MA, Pesquero JB, Furst C, Valle PR, Pesquero JL, Silva EF, 1999. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitology**, 119: 359-362.

Gomes JPM, Cardoso CRP, Varanda EA, Molina JM, Fernandes MF, Olea N, Carlos IZ, Vilegas W 2011. Antitumoral, mutagenic and (anti)estrogenic activities of tingenone and pristimerin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(6): 963-971.

Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, 72(3): 353-358.

Guerrant RL 1986. Amebiasis: introduction, current status, and research questions. **Review Infectious Disease**, 8 (2): 218-227.

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr 2003. Amebiasis. **The new england journal of medicine**, 348(16): 1565-73.

Hara A, Hirose Y, Mori H, Iwao H, Kato T, Kusuhara Y 2004. Cytopathologic and genetic diagnosis of pulmonary amebiasis: a case report. **Acta Cytologica**, 48(4): 547-550.

Herbinger KH, Fleischmann E, Weber C, Perona P, Loscher T, Bretzel G 2011. Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers. **Infection**, 39(6): 527–535.

Huston CD, Haque R, Petri WA 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 1(9):1-11.

Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri JR 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, 71(2):964-972.

Imperato PJ 1981. A historical overview of amebiasis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, 57(3): 175-187.

Itokawa H, Shirota O, Morita H, Takeya K, Iitaka Y 1993. Structures of triterpene dimers and sesquiterpene polyesters from South American medicinal plants belonged to *Maytenus* sp. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Youshishu**, 35: 614-621.

Joffily A, Vieira RC 2005. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. Emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 19:549-61.

Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL 2002. Natural Products as potential antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, 90 (2): 55-62.

Khalid SA, Friedrichsen GEM, Christensen SBEL, Tahir A, Sattiom 2007. Isolation and characterization of pristinermine as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalis* (Lam.) Excell. **Akivoc**, 9: 129-134.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 2008. **Diagnóstico microbiológico**. 6. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1488 pp.

Kuete V, Nguemeving JR, Beng VP, Azebaze AGB, Etoa FX, Meyer M, Bodo B, Nkengfack AE 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, 109: 372-379.

Kundakoviae T, Stanojkoviae T, Juraniae Z, Kovaceviae N 2006. Cytotoxicity *in vitro* of naphthazarin derivatives from *Onosma arenaria*. **Phytotherapy Research**, 20: 602-624.

Leão RNQ *et al*, 1997. **Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico**. Rio de Janeiro: Cepuj Instituto Evandro Chagas, 885pp.

Leos-Rivas C, Verde-Star MJ, Torres LO, Oranday-Cardenas A, Rivas-Morales C, Barron-Gonzalez MP, Morales-Vallarta MR, Cruz-Vega DE 2011. *In vitro* Amoebicidal Activity of Borage (*Borago officinalis*) Extract on *Entamoeba histolytica*. **Journal of Medicinal Food**, 14(7/8): 866-869.

Lindsey KL, Budesinsky M, Kohout L, Staden JV 2006. Antibacterial activity of maytenonic acid isolated from the root-bark of *Maytenus senegalensis*. **South African Journal of Botany**, 72(3): 473-477.

Löfmark S, Edlund C, Nord CE 2010. Metronidazol is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. **Clinical Infectious Diseases**, 50: 16-23.

Lorenzi H, Matos FJA 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed, Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, 544 pp.

Lorenzi H, Matos FJA 2008. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum.

Luo D, Wang H, Tian X, Shao H, Liu J 2005. Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. **Pest Management Science.**, 61(1): 58-90.

Magalhães CG, Ferrari FC, Guimarães DAS, Silva GDF, Duarte LP, Figueiredo RC, Filho SAV 2011. *Maytenus salicifolia*: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(3): 415-419.

Malmonge SM *et al* 1999. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo “*in vitro*”. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, 15(1-2): 49-54.

Martínez-Baez M 1989. **Introducción histórica**. In: **Amibiasis**. Medica Panamericana, Bogotá, 11-16 pp.

Martínez-Girón R, Esteban JG, Ribas A, Doganci L 2008. Protozoa in respiratory pathology: a review. **European Respiratory Journal**, 32(5): 1354-70.

Martucciello S, Balestrieri ML, Felice F, Estevam CS, Sant'ana AE, Pizza C, Piacente S 2010. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemico-Biological Interactions**, 183(3): 450-454.

Mena-Rejón GJ, Pérez-Espadas AR, Moo-Puc RE, Cedillo-Rivera R, Bazzocchi IL, Jiménez-Díaz IA, Quijano L 2007. Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. **Journal of Natural Products**, 70(5): 863-865.

Miller SJ, Clardy J 2009. Beyond grind and find. **Nature Chemistry**, 1: 261-263.

Miranda RRS 2007. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek**. PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 336pp.

Miranda, RRS, Duarte LP, Silva GDF, Vieira-Filho AS, Carvalho PB, Messas AC 2009. Evaluation of antibacterial activity of "Mangabarana" *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(2): 370-375.

Mishra BB, Tiwari VK 2011. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46: 4769-4807.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campell H, Mayo J, Boyd MJ 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **National Cancer Institute**, 83: 757-766.

Moreira RRD, Carlos IZ, Vilegas W 2001. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 24: 201-204.

Morita H, Hirasawa Y, Muto A, Yoshida T, Sekita S, Shiota O 2008. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 18: 1050-1052.

Motta MEFA, Da Silva GAP 2002. Diarreia por parasitas. **Revista brasileira de saúde materno infantil**, 2(2): 117-127.

Moujir L, Gutiérrez-Navarro AM, González AG, Ravelo AG, Luis JG 1990. The relationship between structure and antimicrobial activity in Quinones from the Celastraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, 18(1): 25-28.

Neves DP, De Melo AL, Vitor RWA 2011. **Parasitologia Humana**, 12.ed. São Paulo: Atheneu. 494pp.

Niero R, Andrade SF, Filho VCA 2011. Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the *Maytenus Genus*. **Current Pharmaceutical Design**, 17(18): 1851-1871.

Núñez MJ, Guadaño A, Jiménez IA, Ravelo AG, González-Coloma A, Bazzocchi IL 2004. Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **Journal of Natural Products**, 67(1): 14-18.

Núñez Rivas MJ 2004. **Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae)**. PhD Thesis, Universidad de La Laguna, La Laguna, 423pp.

Oliveira AB, Longhi JG, Andrade CA, Miguel OG, Miguel MD 2007a. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica. Curitiba**, 7(2): 1-13.

Oliveira MLG, Duarte LP, Silva GDF, Vieira Filho AS, Knupp VF, Alves FGP 2007b. 3-Oxo-12 α -hydroxyfriedelano from *Maytenus gonoclada*: structure elucidation by 1H and 13C

chemical shift assignments and 2D-NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 45(10): 895-898.

Oramas-Royo SM, Chávez H, Martín-Rodríguez P, Fernández-Pérez L, Ravelo AG, Estévez-Braun A 2010. Cytotoxic Triterpenoids from *Maytenus retusa*. **Journal of Natural Products**, 73: 2029–2034.

Organização Mundial de Saúde (OMS) 1997. A consultation with experts on amoebiasis. México City, México. **Epidemiological Bulletin**, 18: 13-14.

Palhares D 2008. Secnidazole for metronidazole-resistant amebiasis. **Revista Brasília Médica**, 45(4): 309-310.

Palharin LHDC, Figueiredo NE, Lopes MPC, Ascêncio F, Bosquê GG 2008. Efeitos fitoterápicos e homeopáticos da babosa. **Revista científica eletrônica de agronomia**, Ano VII, n. 14.

Pai HH, Ko YC, Chen ER 2003. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. **Acta Tropica**, 87(3): 355-359.

Patocka J 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, 1(1):7-12.

Petri WA, Singh U 1999. Diagnosis and management of amebiasis. **Clinical Infectious Diseases**, 29(5): 1117-1125.

Pinilla AE, Lopez MC, Viasus DF 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*, **Revista Médica del Chile**, 136(1): 118-124.

Póvoa MM, Arruda JE, Silva MC, Bichara CN, Esteves P, Gabbay YB, Machado RL 2000. Diagnosis of intestinal amebiasis using coproscopic and immunological methods in a population sample in greater metropolitan Belem, Para, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 16: 843-846.

Pritt BS, Clark CG 2008. Amebiasis. **Mayo Clinic Proceedings**, 83 (10): 1154-1160.

Proctor EM 1991. **Laboratory diagnosis of amebiasis**. Clinical Laboratory Medicine, 11(4):829-859.

Queiroz LP, Rapini A, Giulietti AM 2006. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia, 144pp.

Ravdin JI 1988. Cell biology of *Entamoeba histolytica* and immunology of amebiasis. In: **Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica***, Hardcover. New York, p:127-149.

Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D 2004. Recent Studies on Natural Products as Anticancer Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 4(2): 241-265.

Reed SL, Ravdin JI 1995. **Amebiasis**. In: Infections of the Gastrointestinal Tract. Blaser, M.I., Ravdin, J.I., Smith, D.P., Greenberg, H.B., Guerrant, R.L. (eds.). Raven Press, New York, p. 1065-1080.

Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 379p.

Rodrigues AG, Dos Santos MG, Amaral ACF 2006. **Políticas públicas em Plantas medicinais e fitoterápicos**. In: A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, Ministério da Saúde, Brasília, 149pp.

Rodrigues VG, Duarte LP, Silva GDF, Silva FC, Góes JV, Takahashi JA, Pimenta LPS, Vieira Filho AS 2012. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. **Química Nova**, 35: 1375-1380.

Rodriguez Pérez F 2000. **Estudio fitoquímico de especies de La familia celastraceae (flora panameña): *Maytenus blepharodesy* *Crossopetalum lobatum***. PhD Thesis, Universidade de La Laguna, La Laguna, 255pp.

Rover MRM, Kupek E, Delgado RCB, Souza LC 2010. A Importância da Avaliação de Fatores de Risco para Aterosclerose na Infância e Adolescência. **NewsLab**, 102: 136-144.

Ruiz-Palacios G 1997. Amoebiasis. **Medicine** 25: 46-50.

Saadeh HA, Mosleh IM, El-Abadelah MM 2009. New Synthesis and Antiparasitic Activity of Model 5-Aryl-1-methyl-4-nitroimidazoles. **Molecules**, 14 (8): 2758-2767.

Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Report**, 27(2): 238-254.

Samie A, Elbakri A, Abuodeh R 2012. Amoebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis. In: **Current Topics in Tropical Medicine**, 201-226.

Sánchez-Guillén MC, Pérez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Arguelles A, Ackers J, Shire A, Talamás-Rohana P 2002. Differentiation of *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with

clinical variants of amoebiasis. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 66(6): 731-737.

Santos VAFFM, Regasini LO, Nogueira CR, Passerini GD, Martinez GD, Bolzani VS, Graminha MAS, Cicarelli RMB, Furlan F 2012. Antiprotozoal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, 75(5): 991-995.

Santos VAFFM, Santos DP, Castro-Gamboa I, Zanoni MVB, Furlan M 2010. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, 15: 6956-6973.

Sargeant PG 1982. Amoebiasis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 75: 920-921.

Sarker MMA, Rizwan F, Haque R, Siddique A, Parveen S, Islam S 2008. "In vitro" Sensitivity Brands of Antiamoebic Drugs (Metronidazole Tablets) Against Clinical Isolates of *Entamoeba histolytica* in Bangladesh. **Journal of Biological Sciences**, 8(5): 925-929.

Schneberg BT, Green DK, Sneden AT 2001. Dihydroagarofuran sesquiterpene alkaloid from *Maytenus putterlickoides*. **Journal of Natural Products**, 64: 624-626.

Secretaria de Salud 2009. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. **Panorama epidemiológico de la amebiasis intestinal en México 2003-2008**, Semana 49, 26(49).

Singh S, Husain K, Athar F, Azam A 2005. Synthesis and antiamoebic activity of 3,7-dimethyl-pyrazolo[3,4-e][1,2,4] triazin-4-yl thiosemicarbazide derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 25(2-3): 255-62.

Silva PSC 2006. **Parasitoses Intestinais entre os Índios Suruí, Região Amazônica, Brasil**, Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 149pp.

Silva FC, Rodrigues VG, Duarte LP, Silva GDF, Miranda RRS, Vieira Filho AS 2011a. A new friedelane triterpenoid from the branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). **Journal of Chemical Research**, 35: 555-557.

Silva FC, Duarte LP, Silva GDF, Filho SAV, Lula IS, Takahashi JA, Sallum WST 2011b. Chemical Constituents from Branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae) and Evaluation of Antimicrobial Activity. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, 22(5): 943-949.

Silva FC, Busatti HGNO, Gomes MA, Duarte LP, Silva GDF, Vieira Filho SA 2012. Antigiardial activity of the hexane extract of *Maytenus gonoclada* Mart. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4: 638-639.

Silva EF 1997. *Entamoeba histolytica*: Isolamento, axenização e caracterização dediferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade “in vivo” e “in vitro”. PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 384pp.

Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, Petri WA Jr 2006. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. **Journal of Clinical Microbiology**, 44(6):2258-2261.

Sosa S, Morelli CF, Tubaro A, Cairoli P, Speranza G, Manitto P 2007. Antiinflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. **Phytomedicine**, 14: 109-114.

Sotanaphun U, Lipipun V, Yaipakdee P, Bavovada R 2005. New Acidic-Rearranged Compounds from Tingenone Derivatives and their Biological Activity. **Pharmaceutical Biology**, 43(1): 39-46.

Souza-Fagundes EM, Gazzinelli G, Parreira GG, Martins-Filho OA, Amarante Mendes GP, Oliviera RC, Zani CL 2003. *In vitro* activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. **International Immunopharmacology**, 3: 383-392.

Stanley SL Jr 2001. Pathophysiology of amoebiasis. **Trends in Parasitology**, 17(6): 280-285.

Stanley SL Jr 2003. Amoebiasis. **The Lancet**, 361(9362): 1025-1034.

Stanley SL Jr 2005. The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too?. **Trends in Parasitol.**, 21(10): 451-453.

Stauffer W, Ravdin JI 2003. *Entamoeba histolytica*: an update. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 16(5): 479-485.

Tanyuksel M, Petri WA 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Microbiology**, 16(4):713-729.

Upcroft JA, Upcroft P 1993. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitology Today**, 9: 187-190.

Upcroft P, Upcroft JA 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(1): 1-15.

Uprety Y, Asselin H, Dhakal A, Julien N 2012. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 8(7): 1-14.

Valladão FN, Miranda RRS, Vale FH, Valladão SA, Silva GDF, Duarte LP, Carvalho-Okano RM, Messias MCTB, Vieira Filho AS 2009. Four Brazilian *Maytenus salicifolia*

Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(3): 733-739.

Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM 2005. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28(3): 519-528.

Verma S, Singh SP 2008. Current and future status of herbal medicines. **Veterinary World**, 1(11): 347-350.

Voolmann T, Boreham PFL 1993. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbanc. **Medical Journal of Australia**, 159(7): 490.

Wei S, Ji Z, Zhang JA 2009. New Insecticidal Sesquiterpene Ester from *Celastrus Angulatus*. **Molecules**, 14(4): 1396-1403.

Werkema MCC, Aguiar S 2006. **Análise de regressão: como entender o relacionamento entre as variáveis de um processo**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1.ed, 306pp.

Willmann M, Wacheck V, Buckley J, Nagy K, Thalhammer J, Paschke R, Triche T, Jansen B, Selzer E 2009. Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. **European Journal of Clinical Investigation**, 39(5): 384-394.

Wiser MF 2010. *Entamoeba* and Amebiasis. In: Protozoa and Human Disease, 1.Ed. Estados Unidos: **Garland Science**, 250pp.

World Health Organization (WHO) 1997. **A consultation with experts on amoebiasis**. Epidemiological Bulletin, Mexico City, Mexico, 18: 13-14.

World Health Organization (WHO) 1998. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva, 45 pp.

Wright CW, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC 1988. Antimicrob. **Agents Chemother**, 32: 1725.

Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. **Infection, Genetics and Evolution**, 9 (6): 1023–1032.

Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, Cerritos R, González E, Hernández E, Oswaldo P 2011. Novelties on Amoebiasis: A Neglected Tropical Disease. **Journal of Global Infectious Diseases**, 3(2): 166–174.

Zlobl TL 2001. Amebiasis. **Primary Care Update for OB/GYNS**, 8(2): 65-68.