

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JÚLIA DUARTE RODRIGUES

Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* (Araticum) na invasão de células RAW 264.7 por *Toxoplasma gondii*

UBERLÂNDIA - MG

2019

JÚLIA DUARTE RODRIGUES

Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* (Araticum) na invasão de células RAW 264.7 por *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC 2, GMV054) e obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

UBERLÂNDIA - MG

2019

JÚLIA DUARTE RODRIGUES

Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* (Araticum) na invasão de células RAW 264.7 por *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC II) aprovado pela banca examinadora abaixo para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Uberlândia (MG).

Uberlândia, 05 de dezembro de 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves
Orientadora

Dra. Danielle Reis Napolitano
Membro

Prof. Dr. Samuel Cota Teixeira
Membro

AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A Deus, por me permitir chegar até aqui, a minha família, em especial meus pais José e Ana, as minhas irmãs Marília e Letícia, e minha sobrinha Amanda.

A professora doutora Celene Maria de Oliveira Simões Alves, por todo o período de orientação neste trabalho, por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo, profissionalismo e pela confiança.

A Danielle e Taís, pela colaboração neste projeto, e a todos do laboratório de Biofísica e Farmacologia que participaram de alguma forma.

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica, que contribuíram para a construção de todo conhecimento que tenho hoje.

Aos meus amigos, que me apoiaram e torceram por mim, em especial a Letícia C., que esteve comigo durante toda a pesquisa.

Resumo

O uso de plantas medicinais na terapêutica humana e veterinária vem crescendo e pesquisas que comprovam cientificamente os benefícios de derivados vegetais são de grande relevância. *Annona crassiflora* é uma espécie vegetal frutífera encontrada tipicamente no Cerrado brasileiro e pertencente à família Annonaceae. O fruto é conhecido popularmente como Araticum. Estudos têm demonstrado atividades biológicas importantes da *A. crassiflora*, dentre elas ações antimicrobianas, mediadas por compostos bioativos extraídos das folhas, sementes, cascas e polpas. Contudo são escassos dados sobre possível ação da *A. crassiflora* na infecção por *Toxoplasma gondii*. Nesse sentido, o objetivo geral deste estudo foi investigar a ação do extrato aquoso liofilizado das folhas da *A. crassiflora* sobre a invasão de células RAW 264.7 pelo parasito *Toxoplasma gondii*. O protozoário *T. gondii* é o agente causador da toxoplasmose, uma doença geralmente assintomática, mas associada a abortos e alterações neurológicas em casos de prenhez e imunossupressão. Neste estudo, foram utilizados o extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora* e o clone 2F1 da cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Foi feita a avaliação da citotoxicidade do extrato em células RAW 264.7e, posteriormente, o ensaio de invasão por *T. gondii* nas mesmas células. Os resultados mostraram que o extrato exibiu citotoxicidade apenas na maior concentração testada (1000 µg/mL). No ensaio de invasão das células RAW 264.7 por *T. gondii*, o extrato não exibiu efeito estatisticamente significativo na redução da invasão, porém mostrou tendência a diminuí-la, sugerindo que novos ensaios devam ser realizados a fim de comprovar possível ação antiparasitária da *A. crassiflora*.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*; *Toxoplasma gondii*; células RAW 264.7

Abstract

The use of medicinal plants in human and veterinary therapy is growing and researches that scientifically prove the benefits of plant derivatives are of great relevance. *Annona crassiflora* is a fruit plant species typically found in the Brazilian Cerrado and belonging to the Annonaceae family. The fruit is popularly known as Araticum. Studies have demonstrated important biological activities of *A. crassiflora*, including antimicrobial actions, mediated by bioactive compounds extracted from leaves, seeds, barks and pulps. However, there are few data on the possible action of *A. crassiflora* on *Toxoplasma gondii* infection. In this sense, the general objective of this study was to investigate the action of the freeze-dried aqueous extract of the leaves of *A. crassiflora* on the invasion of RAW 264.7 cells by the parasite *Toxoplasma gondii*. The protozoan *T. gondii* is the causative agent of toxoplasmosis, a disease that is generally asymptomatic, but associated with abortions and neurological changes in cases of pregnancy and immunosuppression. In this study, aqueous extract of *A. crassiflora* leaves and clone 2F1 of the RH strain of *Toxoplasma gondii* were used. The cytotoxicity of the extract was evaluated in RAW 264.7 cells and, subsequently, the *T. gondii* invasion assay in the same cells. The results showed that the extract exhibited cytotoxicity only at the highest concentration tested (1000 µg / mL). In the *T. gondii* RAW 264.7 cell invasion assay, the extract did not exhibit a statistically significant effect in reducing the invasion, but showed a tendency to decrease it, suggesting that further assays should be performed in order to prove possible antiparasitic action of *A. crassiflora*.

Keywords: *Annona crassiflora*; *Toxoplasma gondii*; RAW 264.7 cells

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Filogenia e distribuição da <i>Annona crassiflora</i>	11
2.2	Fitoquímica da <i>Annona crassiflora</i>	11
2.3	Propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas da <i>Annona crassiflora</i> .	12
2.4	Propriedades antimicrobianas da <i>Annona crassiflora</i>	13
2.5	Propriedades hepatoprotetoras exercidas pela <i>Annona crassiflora</i>	14
2.6	Propriedades antidiarreicas do extrato aquoso da <i>Annona crassiflora</i>	15
2.7	Ação antitumoral e anticolinesterásica da <i>Annona crassiflora</i>	15
2.8	Atividade antimutagênica exercida pela <i>Annona crassiflora</i>	16
2.9	Ação antimalárica de frações foliares e de madeira da <i>Annona crassiflora</i> .	17
2.10	Efeitos antileishmanial e tripanocida da <i>Annona crassiflora</i>	17
2.11	Potencial nematicida da <i>Annona crassiflora</i>	17
2.12	Exibição de atividade larvicida da <i>Annona crassiflora</i>	18
2.13	Potencial moluscicida da <i>Annona crassiflora</i>	18
2.14	Genotoxicidade.....	18
2.15	<i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	19
2.16	Mecanismos de invasão do <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3	JUSTIFICATIVA.....	23
4	OBJETIVOS.....	24
4.1	Objetivo geral.....	24
4.2	Objetivos específicos.....	24
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1	Local de execução.....	25
5.2	Material vegetal.....	25
5.3	Obtenção do extrato aquoso.....	25
5.4	Cultura de células da linhagem <i>macrophage-like RAW 264.7</i>	26
5.5	Parasitas.....	27
5.6	Ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso de <i>Annona crassiflora</i> em células	

RAW 264.7.....	27
5.7 Ensaio de invasão de <i>T. gondii</i> em células RAW 264.7.....	28
5.8 Análise estatística.....	29
6 RESULTADOS.....	30
6.1 <i>Annona crassiflora</i> e citotoxicidade em células RAW 264.7.....	30
6.2 <i>Annona crassiflora</i> e invasão de células RAW pelo parasito <i>T. gondii</i>	31
7 DISCUSSÃO.....	35
8 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 Introdução

A *Annona crassiflora*, cujo fruto é conhecido popularmente como araticum, é uma planta pertencente à família Annonaceae, encontrada principalmente no Cerrado brasileiro (TELLES, et al., 2003). A literatura tem reportado várias atividades biológicas associadas a diferentes derivados vegetais dessa espécie e de outras da mesma família, tais como propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobianas, hepatoprotetoras, antidiarreicas, antiproliferativas e antimutagênicas, antimalárica, antileishmania e tripanocida, nematicida, larvicida e moluscicida (ARRUDA E PASTORE, 2019).

As várias atividades biológicas identificadas em diferentes preparações da *Annona crassiflora* obtidas a partir de suas folhas, casca, raízes e frutos têm sido atribuídas a compostos bioativos, dentre eles, flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas, alcaloides e acetogeninas (DA COSTA OLIVEIRA et al., 2018). Apesar de descritas ações antimicrobianas de derivados vegetais da *A. crassiflora*, até o presente momento, ainda não encontramos muitas pesquisas relacionadas a possíveis efeitos da *Annona crassiflora* sobre a infecção pelo parasito *Toxoplasma gondii*.

O *T. gondii* é distribuído globalmente, sendo um dos parasitos humanos mais comuns, infectando até um terço da população mundial. (SWIERZY et al., 2017). O protozoário *T. gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, causa a doença toxoplasmose, acometendo o homem e alguns outros animais. Esse microrganismo é um parasito intracelular obrigatório, de baixa virulência que, na maioria das vezes, causa infecções assintomáticas em indivíduos imunocompetentes. Na espécie humana, a infecção adquire importância em dois grupos de alto risco, as mulheres gestantes, podendo causar aborto, mortalidade neonatal e anormalidades fetais, e os indivíduos imunocomprometidos, podendo ser observadas grave morbidade e elevada taxa de mortalidade (LUFT; et al., 1992; YANG et al., 2017).

Em outras espécies de animais, a infecção por *T. gondii* leva a altos índices de aborto (FIALHO, TEIXEIRA E ARAUJO, 2009). Segundo Chen et al. (2017), a alta prevalência de *T. gondii* nos animais pode causar perdas econômicas consideráveis na produção animal. Essa é uma das razões que justificam a importância dos estudos acerca desse parasito. Os problemas econômicos estão, por exemplo, relacionados aos abortos e mortes neonatais em caprinos e suínos, como relatado por Fialho, Teixeira e Araújo (2009). Esses autores também destacam sinais clínicos de inapetência, prostração, além de acometimento dos sistemas respiratório, neuromuscular e gastrointestinal.

Além disso, a toxoplasmose é uma doença importante na Medicina Veterinária devido a sua ocorrência em várias outras espécies, como os cães, ovinos, bovídeos, equinos, roedores, aves e, principalmente, por ter a participação dos felídeos como os únicos hospedeiros definitivos do parasito, de acordo com Langoni et al. (2001).

Dessa forma, o objetivo geral desse estudo foi avaliar possíveis ações do extrato aquoso da *Annona crassiflora* no processo de invasão celular (em células RAW 264.7) pelo parasito *Toxoplasma gondii*.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Taxonomia e distribuição da *Annona crassiflora*

Annona crassiflora é popularmente conhecida como Araticum, nome dado ao seu fruto. É uma árvore nativa do cerrado brasileiro, amplamente difundida em todo o bioma que abrange os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Maranhão, Piauí, Pará e Distrito Federal (COTA et al., 2011, apud ARRUDA e PASTORE, 2019).

De acordo com a USDA-NRCS (2019), *A. crassiflora* pertence ao reino Plantae, sub-domínio Tracheobionta, super divisão Spermatophyta, divisão Magnoliophyta, da classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, ordem das Magnoliales, família Annonacea, do gênero *Annona L.* e por fim, espécie *Annona crassiflora Mart.*

2.2 Fitoquímica da *Annona crassiflora*

Estudos têm descrito a presença de grande diversidade de substâncias fitoquímicas, como carotenóides, tocoferóis, folatos e algumas vitaminas no fruto araticum (CARDOSO et al., 2013 apud ARRUDA, et al., 2018). Além desses, também foram encontrados constituintes, tais como os ácidos fenólicos protocatecuico, gentísico, clorogênico, cafeico, coumarico, ferúlico e, também, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, além dos taninos condensados fenólicos. Os compostos fenólicos do fruto foram localizados principalmente em sua casca (48,83%). A catequina e a epicatequina foram os principais compostos da polpa e casca do fruto, enquanto nas sementes os principais compostos fenólicos foram o ácido cafeico, catequina e epicatequina. A esses metabólitos, foram atribuídas atividades antioxidantes (ARRUDA et al., 2017, ROESLER et al., 2007 apud ARRUDA et al., 2018).

No extrato etanólico da casca da *A. crassiflora*, foram encontrados o ácido clorogênico, a epicatequina, as procianidinas, os cafeoil-hexosídeos, quercetina-glicosídeos e o kaempferol, além de compostos bioativos que apresentaram atividades de α -amilase, α -glicosidase e inibição das atividades de glicação. Frações acetato de etila apresentaram maior capacidade antioxidante e o n-butanol apresentou atividades inibitórias contra α -amilase, α -glucosidase e glicação, e menor citotoxicidade, quando comparada com as outras frações do extrato etanólico bruto (JUSTINO et al., 2016).

2.3 Propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas da *Annona crassiflora*

De acordo com Moura et al. (2018), propriedades anti-inflamatórias e profibrogênicas importantes foram identificadas na casca da *Annona crassiflora*, enriquecida com polifenol. Nessa pesquisa, foi usado o extrato etanólico da casca dos frutos, do qual foram extraídas frações de acetato de etila e n-butanol. Identificaram também várias biomoléculas antioxidantes, como ácido clorogênico, epicatequina, procianidinas B2 e C1, quercetina-glicosídeo, kaempferol-rutinosídeo, o glucosídeo de kaempferol e o cafeoide-glucosídeo. Os potenciais anti-inflamatório, avaliado pela atividade de neutrófilos e macrófagos, e profibrinogênico foram analisados com base na cicatrização de feridas cutâneas provocadas experimentalmente em camundongos. Houve eficácia no tratamento das feridas com a fração da casca da *A. crassiflora* enriquecida com polifenol, em cerca de 4 a 7 dias após o início do tratamento. Observou-se que além do efeito anti-inflamatório, houve deposição de fibras de colágeno dos tipos I e III nas feridas. A atividade pró-angiogênica não foi comprovada, porém, a *A. crassiflora* foi considerada uma fonte significativa de compostos que promovem a cicatrização de feridas.

Da Costa Oliveira e seus colaboradores (2018) avaliaram propriedades analgésicas e anti-inflamatórias em camundongos *Swiss* ou *Balb/c* utilizando frações hidroalcoólicas filtradas (F1) e precipitadas (F2) das folhas da *Annona crassiflora* ricas em alcalóides, flavonóides e terpenóides. A nocicepção foi induzida pela injeção intraplantar de formalina e foi também realizado o teste de desempenho motor baseado em uma haste rotativa (Rota-rod). Os camundongos *Balb/c* receberam o tratamento prévio com F1 e F2, seguido da injeção intratorácica de carragenina, zimosan, lipopolissacarídeo (LPS) e interleucina 8 (IL-8). Nos resultados, a triagem fitoquímica mostrou a presença de alcalóides na fração filtrada, enquanto os flavonóides estavam presentes nas duas frações. Houve uma redução significativa no tempo de lambertura de pata em uma segunda fase dos testes, mas não houve redução do teste de latência do reflexo nociceptivo da cauda e do desempenho motor. Por fim, o tratamento com F2 inibiu significativamente a neutrofilia induzida por carragenina, LPS ou IL-8, mas não houve resultado positivo sobre o zimosan.

O extrato metanólico das folhas da *Annona crassiflora* também foi utilizado para demonstrar potencial anti-inflamatório e quimiopreventivo. Segundo Rocha et al. (2016), por meio dos seus flavonóides, esse extrato inibiu significativamente a formação de edema de pata induzido por carragenina. Nesse experimento, utilizaram-se camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos ao tratamento oral com o extrato metanólico de *A. crassiflora*

(ACME) e com o anti-inflamatório dexametasona por via subcutânea; além disso, na pata dianteira traseira dos camundongos foi administrada solução salina estéril a 0,9%, servindo como controle. Para avaliar a atividade do ACME em resposta ao edema induzido por carragenina (aplicada intra-articular), foi mensurada a atividade da mieloperoxidase e os camundongos foram mortos para avaliação dos efeitos do ACME na migração de células pleurais e exsudato formado após o estímulo inflamatório. Também foi avaliada a resposta de alodinia e observou-se diminuição no limiar mecânico, quando comparado com a resposta das mesmas patas antes do tratamento. O ACME reduziu significativamente o aumento dos leucócitos totais e o aumento nos níveis de proteína induzido pela administração de carragenina na cavidade pleural.

Estudos de nocicepção demonstraram que a injeção intraplantar do peltatosídeo derivado da *Annona crassiflora* exibiu efeito antinociceptivo (Oliveira et al., 2016). Neste trabalho, foi utilizado o peltatosídeo, um flavonoide (quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)-O- α -L-arabinósido) derivado das folhas da *Annona crassiflora*. Camundongos *Swiss*, machos, com 9 semanas de idade, foram induzidos a hiperalgesia pela administração intraplantar de carragenina (Lambda-type carrageenan) e o limiar nociceptivo foi medido pelo teste de pressão da pata. O peltatosídeo apresentou efeito antinociceptivo três horas após a indução de hiperalgesia, e aumentou o limiar nociceptivo para 15 minutos com um pico de ação em 20 min após a injeção intraplantar do peltatosídeo em ambas as patas traseiras.

2.4 Propriedades antimicrobianas da *Annona crassiflora*

Os efeitos antimicrobianos de diversas plantas do Cerrado, dentre elas a *Annona crassiflora*, foram investigados contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, por meio do método de difusão em ágar-disco. O extrato etanólico da *Annona crassiflora*, rico em taninos, apresentou antagonismo sobre o crescimento de todas as estirpes de *Staphylococcus* spp.

Da Silva et al. (2014) investigaram atividades antimicrobianas *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das plantas *Bidens pilosa* e *Annona crassiflora* sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (ORSA). Os extratos foram preparados a partir da casca, polpa, folha, semente e do caule da *Annona crassiflora* e foram utilizados os métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo. O estudo demonstrou que a *A. crassiflora* foi

ativa contra ORSA e não houve exibição de citotoxicidade contra as células usadas no modelo *in vitro*.

Em uma pesquisa realizada por Takahashi et al. (2006), oito plantas brasileiras da família das Annonaceae foram avaliadas em relação à atividade antibacteriana por meio do método de difusão em ágar. Foram analisadas as plantas *Xylopia frutescens*, *X. aromatica*, *X. amazônica*, *X. benthamii*, *Annona ambotay*, *A. crassiflora*, *A. muricata* e *A. cherimólia*. Para estudo da *A. crassiflora* foi utilizado o extrato etanólico das sementes e extrato de hexano das folhas. As bactérias para o ensaio antimicrobiano foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O estudo mostrou que seis extratos (extratos hexânicos de frutos de *X. frutescens*, extratos etanólicos de frutos de *X. frutescens*, madeira de *X. amazonica*, extrato clorofórmico de *X. amazonica*, extrato de benzeno de madeira de *A. ambotay* e extratos de folhas de *A. cherimolia*) mostraram atividade antibacteriana contra pelo menos um dos organismos testados, todos sendo ativos contra *B. subtilis* e três (extratos etanólicos de frutos de *X. frutescens*, extrato de benzeno de madeira de *A. ambotay* e extrato de folhas de *A. cherimolia*) também mostraram atividade contra *S. aureus*. Os resultados obtidos com a *Annona crassiflora* podem estar associados ao conteúdo de alcaloides e flavonoides nesta espécie.

2.5 Propriedades hepatoprotetoras exercidas pela *Annona crassiflora*

Justino et al. (2017) realizaram estudos acerca das propriedades hepatoprotetoras de uma fração enriquecida com polifenol da casca da *Annona crassiflora*. O estudo utilizou camundongos *Wistar*, com diabetes induzido pela inanição por 24 horas, seguida de injeção intraperitoneal de estreptozotocina. A avaliação de parâmetros bioquímicos séricos nesses animais mostrou aumento de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -GT, fosfatase alcalina (FA) e triglicérides, contudo, após a administração da fração da *A. crassiflora* houve redução da atividade enzimática da ALT, AST e FA; γ -GT e triglicérides não foram reduzidos. A análise de marcadores de estresse oxidativo mostrou que a fração enriquecida com polifenol da casca da planta elevou a capacidade antioxidante hepática, reduziu a peroxidação lipídica (elevada anteriormente pela diabetes induzida) e diminuiu o teor de proteína. O mesmo estudo mostrou redução de moléculas antioxidantes, tais como a catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx) e superóxido

dismutase (SOD), enquanto a insulina reduziu apenas o conteúdo de GPx. Houve ainda aumento da atividade da glutathione redutase (GR) e, conseqüentemente, do conteúdo de glutathione reduzida (GSH). Os marcadores de estresse nitrosativo foram avaliados a partir dos teores hepáticos da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e nitrotirosina (N-Tyr), enzimas estas reduzidas após o tratamento com a planta nos camundongos diabéticos. Por fim, foi realizada a análise histológica do fígado, a qual demonstrou ausência de hepatotoxicidade do extrato utilizado.

2.6 Propriedades antidiarreicas do extrato aquoso da *Annona crassiflora*

Um trabalho realizado por Ferraz et al. (2017) investigou o potencial antidiarreico do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* (AEAC) em modelo experimental *in vivo* com indução de diarreia por óleo de mamona. Foi analisado o efeito da *A. crassiflora* sobre a motilidade gastrintestinal e o acúmulo de líquido intestinal. Entre os compostos identificados no extrato foram encontrados flavonoides (incluindo glicosados com hexose, desoxihexose e pentose), alcaloides, catequina, epicatequina, proantocianidinas, além de duas séries poliméricas constituídas de procianidina e prodelfinidina. Os resultados mostraram que o AEAC diminuiu fezes diarreicas e aumentou a distância percorrida pelo farelo de carvão vegetal no intestino, indicando efeito procinético do extrato aquoso. Observaram também que houve redução no acúmulo de líquido. Dessa forma, concluíram que o efeito antidiarreico do extrato aquoso da *A. crassiflora* decorre da sua capacidade de inibição da secreção intestinal ou de aumentar a absorção no intestino.

2.7 Ação antitumoral e anticolinesterásica da *Annona crassiflora*

Segundo Formagio e colaboradores (2015), muitos membros da Annonaceae são usados em medicina popular para tratamento antiparasitário ou antitumoral de doenças intestinais. Em ensaio para avaliação de atividade antiproliferativa *in vitro*, com linhagens de células humanas tumorais tratadas com extratos metanólicos das sementes de *A. crassiflora*, houve redução de 50% no crescimento celular em relação às células controle não tratadas. Também foi avaliado o parâmetro de resposta que se relaciona a atividade inibidora de crescimento, a atividade citostática, a qual refere-se à concentração do fármaco para inibição do crescimento total e a atividade citotóxica, que corresponde a concentração suficiente para matar 50% das células. Os resultados obtidos foram que a *A. crassiflora*

possui potente atividade antitumoral contra todas as 10 linhagens de células tumorais testadas.

A análise fitoquímica revelou a presença dos compostos ácido cafeico, ácido sinápico e rutina no extrato metanólico da *A. crassiflora*.

No mesmo estudo, a atividade anticolinesterásica foi mensurada utilizando o reagente de Ellman, a partir do ensaio de microplaca e do ensaio de cromatografia em camada fina (TLC). Os extratos foram testados em concentrações de 1,0-2,0 mg/mL. Com base nesse ensaio, a porcentagem de inibição da AchE pelos extratos variou de 12 a 52%, com o extrato de semente de *A. coriacea* apresentando a maior inibição (52%). As folhas da *A. crassiflora* apresentaram 22% de inibição da AchE e suas sementes, 45%. No TLC, o resultado foi positivo para os extratos metanólicos extraídos das duas partes da *A. crassiflora*.

2.8 Atividade antimutagênica exercida pela *Annona crassiflora*

Dragano et al. (2010) descreveram a influência da ingestão da polpa da *Annona crassiflora* Mart. na modulação de processos mutagênicos ou antimutagênicos e sua ação no estresse oxidativo em modelo experimental *in vivo* (camundongos adultos *Mus musculus*). A polpa da fruta passou por análises químicas e procedimentos para preparação das dietas dos animais. Foram quantificados os teores de umidade, proteína, fibra, glicose, sacarose, frutose, minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio, manganês, zinco, cobre, sódio, selênio), além dos níveis lipídicos e do teor calórico da fruta. Consideraram ainda a *A. crassiflora* como uma boa fonte de ácido ascórbico, carotenos totais e taninos. Após a alimentação dos camundongos com as dietas experimentais com a polpa da fruta, notaram que não houve efeitos mutagênicos ou antimutagênicos sobre as células da medula óssea dos animais, mas também não causou anormalidades nos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol. Por outro lado, a partir do teste de micronúcleo policromático, observou-se que o fruto pode potencializar a atividade mutagênica de um agente alquilante

No experimento realizado por Rocha et al. (2016), confirmou-se a ação antimutagênica, com importantes atividades de quimioprevenção do extrato metanólico de *A. crassiflora*. Para isso, utilizaram o teste de *Allium cepa*, em que o metanossulfonato de metila (MMS) foi usado para induzir danos ao DNA, além de um outro modelo utilizando ensaio de micronúcleos com células periféricas de camundongos, no qual a ciclofosfamida foi usada com o mesmo objetivo do MMS. Nessa etapa do experimento, notou-se redução

dos índices mitóticos na *Allium cepa* e a avaliação antimutagênica com camundongos mostrou percentuais de redução de danos de 75,00 e 64,58% para os protocolos pré e pós-tratamento, respectivamente.

2.9 Ação antimalárica de frações foliares e da madeira da *Annona crassiflora*

O potencial antimalárico da *A. crassiflora* foi confirmado por estudos realizados por Pimenta et al. (2014). De acordo com os autores, foi detectada a presença de acetogeninas, flavonoides e dos alcaloides liriodenina e aterospermidina nas frações foliares e d madeira da *A. crassiflora*. Camundongos infectados com *Plasmodium berghei* foram tratados com frações de madeira e frações foliares da *A. crassiflora*. Os resultados mostraram que as frações de madeira não apresentaram atividade antimalárica significativa e produziu alta toxicidade aos animais, enquanto as frações foliares demonstraram um tempo médio de sobrevivência dos camundongos infectados maior, comparado àquele dos animais não tratados. Além disso, a fração foliar, enriquecida em flavonóides de baixa polaridade, foi mais ativa na redução da parasitemia e mostrou ser menos tóxica que as frações enriquecidas com acetogenina.

2.10 Efeitos antileishmanial e tripanocida da *Annona crassiflora*

Extratos brutos hexânicos e etanólicos de plantas nativas do cerrado brasileiro, dentre elas *Annona crassiflora*, foram avaliados quanto à atividade antileishmania, e tripanocida em modelo experimental *in vitro*. O extrato etanólico da casca de raiz da *A. crassiflora* exibiu atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani*, enquanto os alcaloides totais mostraram-se ativos contra *L. chagasi* e contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (MESQUITA et al., 2005).

2.11 Potencial nematicida da *Annona crassiflora*

Outros estudos investigam também a atividade da *A. crassiflora* sobre nematódeos, buscando desenvolver produtos que possam substituir e diminuir o uso de nematicidas sintéticos. De acordo com pesquisas realizadas por Machado e colaboradores (2015), o parasito *Caenorhabditis elegans*, utilizado como modelo experimental, sofreu forte

atividade nematicida do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona crassiflora*, especialmente, das frações de diclorometano e acetato de etila, que exibiram alta capacidade de gerar imobilidade nos parasitos. Além disso, foram identificados os compostos metil éster de ácido palmítico, 2-isopropil-5-metilciclohexanol, éster metílico de ácido oleico, éster metílico de ácido esteárico, quercetina e kaempferol nas frações de diclorometano, acetato de etila, metanol e fração aquosa.

2.12 Exibição de atividade larvicida da *Annona crassiflora*

Além dos estudos descritos acima, a *Annona crassiflora* foi incluída no grupo de 51 espécies de plantas medicinais brasileiras no estudo de atividades larvicidas contra o mosquito *Aedes aegypti*, de acordo com o estudo realizado por Omena et al. (2007). Esses autores sugeriram que as plantas do gênero *Annona* parecem conter componentes inseticidas altamente ativos e que as maiores atividades foram observadas nos extratos etanólicos de sementes de *A. glabra*, seguidos de extratos etanólicos de casca de raiz de *A. crassiflora* e semente de *A. squamosa*.

2.13 Potencial moluscicida da *Annona crassiflora*

A *A. crassiflora* foi um destaque também em um estudo realizado por Santos e Sant'Ana (2001), no qual foram evidenciadas propriedades moluscicidas da planta, bem como outras espécies pertencentes a família Annonaceae. Nesse trabalho, foram utilizados extratos etanólicos secos para avaliar a atividade moluscicida contra as formas adultas e massas de ovos de *Biomphalaria glabrata*, importante na Esquistossomose. O estudo concluiu que todas as espécies investigadas possuem atividade moluscicida contra *B. glabrata*. Dos vinte e um trechos selecionados, quinze apresentaram atividade contra o caracol adulto e quatro para massa de ovos de caracol. Além disso, afirmam que a atividade moluscicida não parece estar limitada a alguma parte morfológica da planta.

2.14 Genotoxicidade

Vilar, Ferri e Chen-Chen (2011) realizaram uma investigação da genotoxicidade da *Annona crassiflora* a partir do SOS-Indutest para detecção de agentes genotóxicos e pelo

teste de Ames, que identifica compostos mutagênicos. Para o estudo, utilizaram o extrato etanólico da planta e cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados não revelaram genotoxicidade direta ou mutagenicidade do extrato, mesmo tendo apresentado um perfil citotóxico, indicando que o extrato etanólico de *A. crassiflora* pode potencialmente fornecer compostos bioativos que poderiam ter utilidade para os avanços na saúde.

2.15 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

O parasito *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose. *T. gondii* pertence ao reino Protista, ao filo Apicomplexa, à classe Conoidasida, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma*, e por fim, espécie *T. gondii*. (DE SOUZA e BELFORT JR., 2014).

O *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: (1) taquizoítos que apresentam rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda da doença; (2) bradizoítos que se encontram dentro de cistos teciduais sob replicação lenta (fase crônica) por estresse imposto pela resposta imune do hospedeiro; e (3) esporozoítos liberados a partir de esporocistos contidos em oocistos eliminados nas fezes de felídeos (hospedeiros definitivos), que correspondem às formas infectantes oriundas da reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino de felídeos. A infecção por *T. gondii* em seres humanos e outros animais pode ocorrer por (1) transmissão horizontal por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (esporozoítos) do ambiente; (2) transmissão horizontal por ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais (bradizoítos); (3) transmissão vertical pela passagem transplacentária de taquizoítos de mães infectadas para os fetos; ou, também, pode haver transmissão em (4) transfusões sanguíneas (DUBEY et al., 1998; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2018).

O ciclo evolutivo desse protozoário apresenta fases sexuada e assexuada de reprodução. Na primeira, o hospedeiro definitivo (felídeo) ingere oocistos (contendo esporozoítos), bradizoítos ou taquizoítos, que irão se desenvolver no intestino do mesmo. Os esporozoítos ou trofozoítos originarão esquizontes, que formam macrogametas, e merozoítos, formando microgametas. A partir daí, é originado o ovo (ou zigoto), que irá formar oocistos e estes podem ser eliminados nas fezes. Essa última forma sofre esporulação, liberando esporozoítos, os quais invadem os enterócitos dos hospedeiros definitivos ou intermediários, passando a serem denominados taquizoítos. Na fase

assexuada, esses taquizoítos se multiplicam e podem infectar novas células, sangue e linfa do hospedeiro intermediário. Com isso, pode haver formação dos bradizoítos, que se desenvolvem na forma de cistos teciduais, que ficam principalmente em tecido muscular e nervoso, a partir do momento em que o hospedeiro adquire imunidade.

A toxoplasmose é uma doença infecciosa sistêmica de caráter zoonótico, causada pelo *T. gondii*, que pode aparecer de forma assintomática ou causar problemas graves, como abortos e sinais neurológicos. No caso de imunossupressão, os bradizoítos latentes podem se transformar em taquizoítos, levando à destruição tecidual necrosante e a doença se manifesta (MONTROYA, 2004 apud SWIERZY et al., 2017). É interessante destacar que o *T. gondii* causa inflamação intestinal pela sua penetração e multiplicação nos hospedeiros, o que os leva a quadros de diarreia. De acordo com Arantes et al. (2015), reações inflamatórias intraoculares isoladas podem ser uma manifestação inicial da infecção por *T. gondii*, apresentando coriorretinite.

O tratamento para pacientes que apresentam a doença com manifestação clínica de toxoplasmose é principalmente baseado em uma combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido fólico (DE SOUZA et al., 2017). Em medicina veterinária, os tratamentos incluem, de acordo com Sousa (2015), fluidoterapia de suporte, manejo para alterações oftálmicas secundárias, antibioticoterapia com, por exemplo, sulfadiazina combinada ao trimetoprim ou clindamicina, e a pirimetamina para os felinos. Esse tratamento é problemático, porque os fármacos atuais não podem erradicar a infecção latente com *T. gondii* e podem causar toxicidade à medula óssea. Com isso, é de notória importância identificar compostos que não induzam diferenciação de bradizoítos e que sejam efetivos contra essas formas do parasito (MURATA et al., 2017).

No segmento de tratamentos utilizando compostos naturais, uma pesquisa realizada por DOĞAN et al. (2017) buscou investigar potenciais atividades antitoxoplasma dos extratos metanólicos e etanólicos das plantas *Centaurea lydia* e *Phlomis nissolii* em uma cultura de células fibroblastos infectados com trofozoítos de *T. gondii*. O estudo utilizou um grupo controle não tratado e linhagens celulares infectadas com o *T. gondii* e tratadas com diferentes concentrações do extrato das plantas, observando-se os resultados nos dias 7, 14 e 24 após a infecção das células com os trofozoítos. O extrato de *C. lydia* apresentou atividade marcante contra os trofozoítos de *T. gondii*. Por outro lado, resultados acerca do extrato de *P. nissolii* não foram satisfatórios, pois houve um crescimento no número de trofozoítos de *T. gondii* no grupo tratado, indicando ausência de atividade antitoxoplasmática, e com isso, os autores concluíram que a *C. lydia* pode ser um bom

candidato como medicamento para toxoplasmose, necessitando ainda realizar experimentos em modelos *in vivo*. Contudo, até o presente momento, não existem estudos investigando o potencial efeito microbicida da espécie *A. crassiflora* sobre o protozoário *T. gondii*.

Um aspecto importante é também a semelhança do *Toxoplasma gondii* com o *Neospora caninum*. Ambos são protozoários intracelulares, pertencentes ao filo Apicomplexa, intimamente relacionados e distribuídos mundialmente (BOJAR e SZYMANSKA, 2010; DUBEY e SCHARES, 2011 apud SAN MIGUEL et al., 2016). O *Neospora caninum* causa uma neuropatia em cães, mostrando uma grande capacidade de transmissão vertical também em bovinos e pequenos ruminantes (CAMPERO et al., 2018 apud DELLARUPE et al., 2019). Com isso, estudos acerca do *T. gondii* podem ser fontes para a condução de pesquisas relacionadas ao *N. caninum*.

2.16 Mecanismos de invasão do *Toxoplasma gondii*

A invasão do *T. gondii* é conduzida pelo sistema motor de actina-miosina do parasita e é realizado pela liberação sequencial de proteínas secretoras de três organelas especializadas, as micronemas, as roptrias e os grânulos densos (TEO et al., 2006).

De acordo com Carruthers e Boothroyd (2007), para conseguir invadir uma célula hospedeira, o *T. gondii* realiza uma série de ações sequenciais, até que possa se manter intracelular. Conforme mostrado na **figura 1**, ocorre primeiramente a ligação inicial, que envolve o reconhecimento de receptores de superfície pelos SAGs, que são antígenos de superfície. Depois vem a fixação apical, que envolve a implantação de MICs, que são proteínas micronemais, e elas acumulam na superfície apical. Logo após, as proteínas de junção e as proteínas da membrana criam uma ligação íntima a célula do hospedeiro. Simultaneamente ou logo depois, as ROPs (roptrias) são injetadas no citoplasma hospedeiro no local da invasão. A partir daí o parasita penetra ativamente na célula e invagina na membrana plasmática. Por fim, ocorre fechamento da estrutura por fissão e o parasita fica dentro da célula hospedeira.

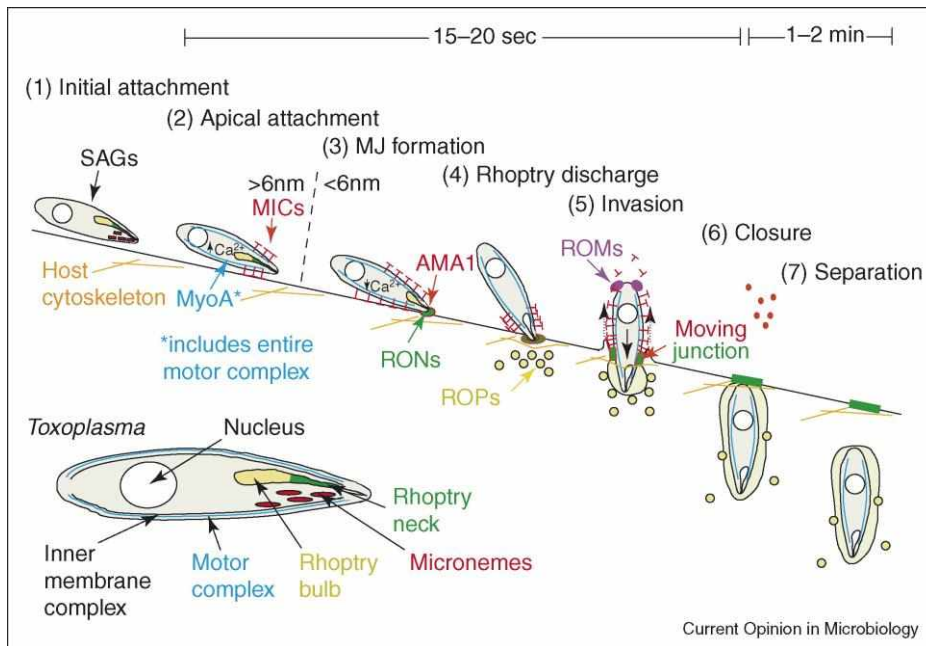


Figura 1. Mecanismo de invasão do *Toxoplasma gondii* em células hospedeiras. Fonte: Carruthers e Boothroyd, 2007.

3 Justificativa

Diversos estudos demonstraram nos extratos das folhas, sementes, casca e polpa das frutas da *A. crassiflora* propriedades relacionadas a atividades bactericida (SILVA JUNIOR et al., 2014; ROCHA et al., 2015), antimalárica (PIMENTA et al., 2014), larvicida (OMENA et al., 2007; ROCHA et al., 2015), moluscicida (SANTOS et al., 2001), nematocida (MACHADO et al., 2015), anti-Leishmania e trypanocida (MESQUITA et al., 2005). No entanto, ainda são escassos dados na literatura sobre possíveis efeitos de derivados vegetais da *A. crassiflora* sobre a infecção por *Toxoplasma gondii*. Assim, considerando-se as várias propriedades antimicrobiana e antiparasitária identificadas para a espécie *A. crassiflora*, o presente estudo justifica-se dado o seu potencial para identificar novos compostos ativos contra o parasito *T. gondii*, utilizando-se um derivado vegetal da espécie *A. crassiflora*, nativa do Cerrado brasileiro, e de uso popular medicinal. Vale ressaltar que *T. gondii* é um parasito com ampla distribuição mundial, que infecta o homem e outros animais, e cuja infecção está associada a abortos, mortalidade neonatal e anormalidades fetais em casos de prenhez, bem como à grave morbidade e elevada taxa de mortalidade, em casos de imunossupressão. Portanto, a descoberta de novas substâncias com ação antiparasitária contra *T. gondii* e com menos efeitos tóxicos, em comparação aos fármacos atualmente utilizados, é bastante relevante para a saúde humana e animal.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antiparasitária do extrato aquoso das folhas da espécie vegetal *Annona crassiflora* na infecção de células RAW 264.7 com o clone 2F1 da cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

4.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*.
- Analisar a citotoxicidade do extrato aquoso de *Annona crassiflora* em células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7.
- Avaliar o efeito do extrato aquoso da *Annona crassiflora* na invasão de células RAW 264.7 por taquizoítas do clone 2F1 da cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

5 Material e Métodos

5.1 Local de execução

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de pesquisa dos Departamentos de Farmacologia (Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais) e de Biofísica (Laboratório de Biologia Molecular e Celular), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

5.2 Material vegetal

Para a realização da pesquisa utilizando o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*, previamente, uma amostra da referida espécie foi coletada em campo de vegetação espontânea e, em seguida, identificada por biólogo qualificado. Posteriormente, uma exsicata (amostra prensada e dessecada) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro HUFU 73.547).

5.3 Obtenção do extrato aquoso

Para a preparação do extrato aquoso, as folhas da *A. crassiflora* foram coletadas em campos de vegetação espontânea em novembro/2018, na Fazenda Pasto Velho em Lassance, MG (Coordenadas geográficas: Latitude mínima: 44° 44' 42,5" W; Longitude mínima: 17° 59' 14,3" S) e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava. Após a colheita, as folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 40 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 10% (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi duplamente filtrado, primeiramente em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura – 20 °C. Após o congelamento, o extrato foi liofilizado à – 40 °C até a total remoção do conteúdo de água (FERRAZ et al.,

2017). O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a data da utilização.



Figura 2. *Annona crassiflora*. Folhas usadas para obtenção do extrato aquoso de *A. crassiflora*. Fonte: o autor.

5.4 Cultura de células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7

Macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 e células epiteliais do cérvix uterino humano (linhagem HeLa) foram gentilmente cedidas pelos Profs. Fábio de Oliveira e Bellisa de Freitas Barbosa, dos Laboratórios de Biologia Molecular e Celular e Imunofisiologia da Reprodução, ambos do ICBIM/UFU.

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 5% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Campinas, Brasil; inativado a 56°C / 30 min) (meio completo, RPMI-SBF), em estufa a 37°C e 5% de CO_2 .

As culturas de células foram mantidas por meio de passagens seriadas a cada dois dias. No momento do repique, o meio de cultura era descartado e as células lavadas com meio RPMI sem SBF. Em seguida, a monocamada celular era removida com *cell scraper*, as células transferidas para tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 400 g por 5 minutos à

temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio a 5% de SBF e distribuídas em frascos novos de cultura.

5.5 Parasitos

Os parasitos taquizoítas 2F1, derivados da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, os quais são derivados da cepa RH e expressam constitutivamente a enzima citoplasmática β -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA (TEO et al., 2007). Os parasitos foram mantidos por passagens seriadas, a intervalos regulares de 48 horas, em células da linhagem HeLa, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 μ g/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 2% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Campinas, Brasil; inativado a 56°C / 30 min) (meio completo, RPMI-SBF), em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Quando a maioria das células infectadas em cultura estava lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítos livres foi centrifugado a 400 g, por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e os parasitos foram homogeneizados em meio RPMI a 2% de SBF e distribuídos em novos frascos com células não infectadas.

5.6 Ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* em células RAW 264.7

O efeito de citotoxicidade do extrato aquoso da *A. crassiflora* em macrófagos murinos (linhagem *macrophage-like* RAW 264.7) foi avaliado por meio de um ensaio colorimétrico, baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT (tetrazólio de metiltiazol; Sigma) (MOSMANN, 1983). Células RAW 264.7 foram removidas dos frascos de cultura utilizando-se *cell scraper* e centrifugadas a 400 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células homogeneizado em meio RPMI a 5% de SBF. Em seguida, uma alíquota (20 μ L) foi misturada com igual volume do corante vital Azul de Tripam 0,4% (Sigma Chemical Co., Brasil) para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Uma suspensão a 1×10^5 células/mL foi, então, preparada em meio RPMI-SBF 5%. Posteriormente, as células foram

cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/200 μ L/poço) *overnight* (18 h) a 37° em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida, após remoção do meio de cultura, as células foram tratadas (200 μ L/poço) com: (1) concentrações crescentes do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (0,487 a 1000 μ g/mL); (2) meio RPMI com 5% de SBF (grupo controle de viabilidade celular igual a 100%) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de tratamento, os sobrenadantes das culturas foram descartados e as células foram lavadas e pulsadas com 200 μ L/poço de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL (100 μ g MTT/200 μ L/poço) em meio RPMI com 5% de SBF e permaneceram nas mesmas condições de cultura por quatro horas. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan (partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis ao metabolizarem o reagente MTT) foram solubilizados com 100 μ L/poço de álcool propílico puro. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multi skan Plus, Flow Laboratories, Mc Lean, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle. Este ensaio foi realizado quatro vezes em sextuplicata.

5.7 Ensaio de invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7

O ensaio de invasão foi realizado de acordo com Teo et al. (2007). Células RAW 264.7 em meio RPMI a 5% de SBF (2×10^4 células/200 μ L/poço) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂ durante 3 horas. Em seguida, após remoção do meio de cultura, as células foram tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso da *Annona crassiflora*, (0,487 a 500 μ g/mL) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight* (18 h). Como controle, células RAW 264.7 foram tratadas apenas com meio RPMI a 5% de SBF. Após o período de tratamento, os sobrenadantes foram descartados, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS: *phosphate buffered saline*; 1x), pH 7,2 e, em seguida, infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, na proporção de 5 parasitos por célula (5:1), ou seja, 1×10^5 parasitos/200 μ L/poço, em meio RPMI a 2% de SBF e incubadas durante 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura contendo parasitos remanescentes, que não invadiram as células, foi removido e as células foram lavadas seis vezes com PBS contendo 1 mM de CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂, sob agitação por dois minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 μ L/poço de tampão de lise (100 mM HEPES pH

8,0, 1mM MgSO₄, 0,1% triton x-100, 5 mM ditiotreititol) gelado e as células foram incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 160 µL/poço do tampão de ensaio (100 mM tampão fosfato pH 7,3, 102 mM β-mercaptoetanol, 9 mM MgCl₂) e 40 µL/poço de CPRG 3mM (clorofenol vermelho β-D-galactopiranosídeo). Em seguida, a placa foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, *overnight*. Ao final da reação, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) em leitora de microplaca (Titertek Multi skan Plus, Flow Laboratories, Mc Lean, EUA) em 570 nm.

Paralelamente, foi construída uma curva padrão em duplicata, por meio de diluições seriadas, de taquizoítos de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a 2×10^5 parasitos/50 µL/poço. À curva padrão também foram adicionadas as soluções tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG e a DO foi mensurada a 570 nm.

Após a lise celular, os parasitos da cepa RH de *T. gondii* livres no sobrenadante, foram expostos ao reagente CPRG. A enzima β-galactosidase, expressa pelos taquizoítos dessa cepa, converte o substrato CPRG de coloração amarelo-laranja em galactose e o cromóforo vermelho clorofenol, desenvolvendo-se uma coloração vermelho-escuro no meio. A intensidade de cor corresponde, portanto, à atividade enzimática da β-galactosidase e constitui uma medida indireta para determinação quantitativa de parasitos em cada condição experimental.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como o número de taquizoítos/condição experimental em relação à curva padrão.

5.8 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média ± S.E.M (erro padrão da média). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar se os dados obtidos, em cada modelo experimental, seguiam distribuição normal. Diferenças entre células tratadas e controle foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni ou, quando as variáveis não exibiram distribuição normal, pelo teste não paramétrico de Kurskal-Wallis. Comparações entre dois grupos experimentais foram analisadas pelo teste *t* de Student. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

6 Resultados

6.1 *Annona crassiflora* e citotoxicidade em células RAW 264.7

Antes de investigar o efeito do extrato aquoso da *A. crassiflora* sobre a invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7, avaliamos possível citotoxicidade do extrato sobre essa linhagem celular.

Células RAW 264.7 foram, então, tratadas com diferentes concentrações do extrato (0,487 a 1000 µg/mL) para determinarmos as concentrações subtóxicas que seriam utilizadas nos ensaios de invasão. A citotoxicidade do extrato em células RAW 264.7 foi avaliada por meio do método de conversão de MTT, determinando-se a viabilidade celular, em porcentagem, comparada ao controle (**Figura 3**). Os resultados obtidos mostraram que o extrato aquoso da *A. crassiflora* não apresentou efeitos citotóxicos sobre as células RAW 264.7, exceto na maior concentração utilizada (1000 µg/mL), com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Ao contrário, os resultados obtidos sugerem efeito proliferativo dose - dependente como demonstrado pela maior viabilidade nas células tratadas com as concentrações 31,25 a 250,0 µg/ml do extrato, embora estes dados não tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle.

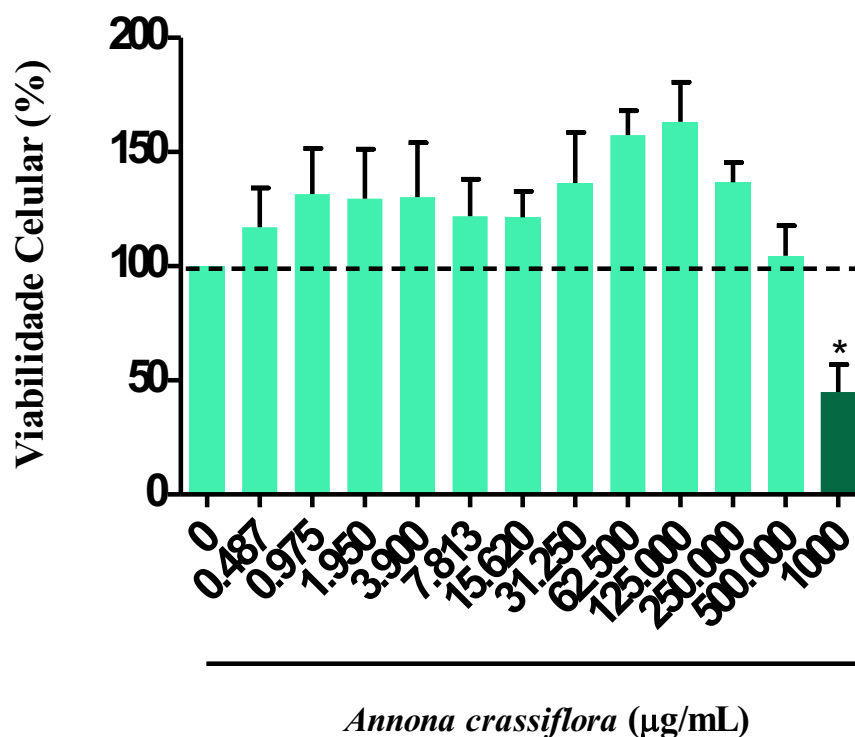


Figura 3. Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso da *Annona crassiflora*. Células *macrophage-like* RAW 264.7 (2×10^4 células/200 µL/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *A. crassiflora* (0,487 a 1.000 µg/mL). As células não tratadas com o extrato (concentração = 0 µg/mL) constituíram o grupo controle, com 100% de viabilidade. A viabilidade celular foi analisada pelo método de conversão de MTT (tetrazólio de metiltiazol). Os dados estão expressos como média ± S.E.M. de quatro experimentos independentes, realizados em sextuplicata. As comparações entre células tratadas com as diferentes concentrações do extrato e o grupo controle não tratado foram analisadas utilizando-se ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

6.2 *Annona crassiflora* e invasão de células RAW pelo parasito *T. gondii*

As células RAW 264.7 são uma linhagem de células imortalizadas semelhantes a monócitos/macrófagos, a qual está bem estabelecida na literatura como um modelo para estudos que avaliam as funções fenotípicas e funcionais de macrófagos. De modo geral, macrófagos são células fagocíticas e produtoras de óxido nítrico (NO) (TACIAK, et al., 2018). Ao contrário, células HeLa, não são fagócitos profissionais, embora sob condições

experimentais específicas possam realizar fagocitose (SHEPARD, 2014; JONES et al., 1981). Diante disto, antes de iniciarmos os ensaios de invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7 tratadas com o extrato da *A. crassiflora*, comparamos a infecção dessa linhagem com a de células HeLa, ambas não tratadas com o extrato, porém sob as mesmas condições experimentais que seriam utilizadas no ensaio de invasão. O objetivo desta análise preliminar foi analisar se a taxa de parasitos em células RAW seria significativamente maior em relação às células HeLa, dado que poderia sugerir a fagocitose dos taquizoítos pelas células RAW, ao invés de invasão. Os resultados obtidos sugerem que, nas condições experimentais utilizadas no ensaio de invasão, houve invasão e não fagocitose dos taquizoítos em células RAW, uma vez que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o número de taquizoítas encontrado em ambas as linhagens celulares (Figura 4).

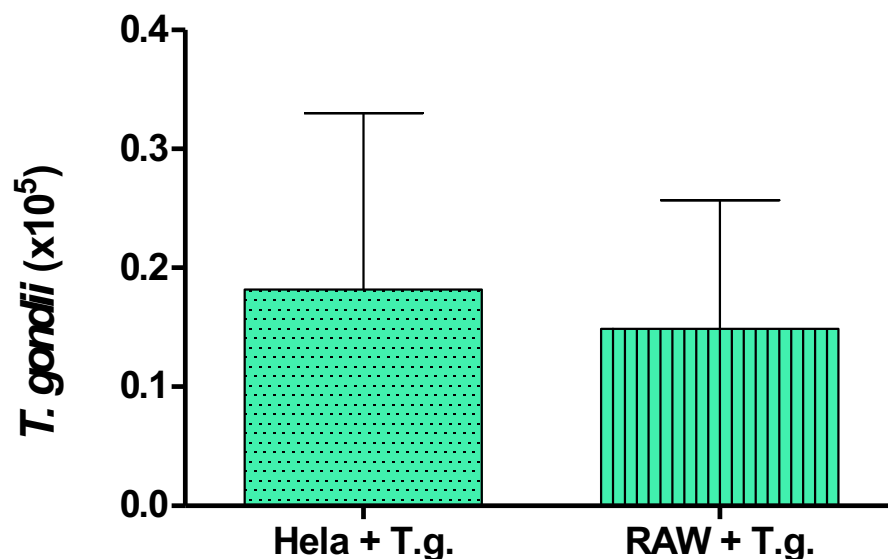


Figura 4. Células HeLa e RAW infectadas com o *Toxoplasma gondii*. Células RAW 264.7 e HeLa (2×10^4 células/200 μ L/poço) em meio RPMI a 5% de SBF foram plaqueadas em microplaca de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight* (18 h). Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, (5 parasitos por célula) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 3 horas, as células foram lavadas e lisadas com tampão específico. A quantificação dos parasitos, em cada condição experimental, foi determinada por reação colorimétrica, utilizando-se o cromógeno CPRG (clorofenol vermelho β -D-galactopiranosídeo) e leitura da densidade óptica a 570 nm, comparando-

se os dados obtidos a uma curva-padrão. Os dados estão expressos como média \pm S.E.M de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. As comparações entre o número de parasitos em células HeLa e RAW foram analisadas utilizando-se o teste *t* de Student ($p > 0,05$).

Para verificarmos o efeito do extrato aquoso da *A. crassiflora* no processo de invasão de células RAW 264.7 por taquizoítos de *T. gondii*, as células foram tratadas com as concentrações subtóxicas (0,487 a 500 $\mu\text{g/mL}$) do extrato, determinadas no ensaio de MTT.

Comparações entre o número de taquizoítos nas células controle e células tratadas com o extrato, em todas as concentrações utilizadas, sugerem que o extrato inibiu a invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7. Contudo, estes dados não foram estatisticamente significantes (**Figura 5**).

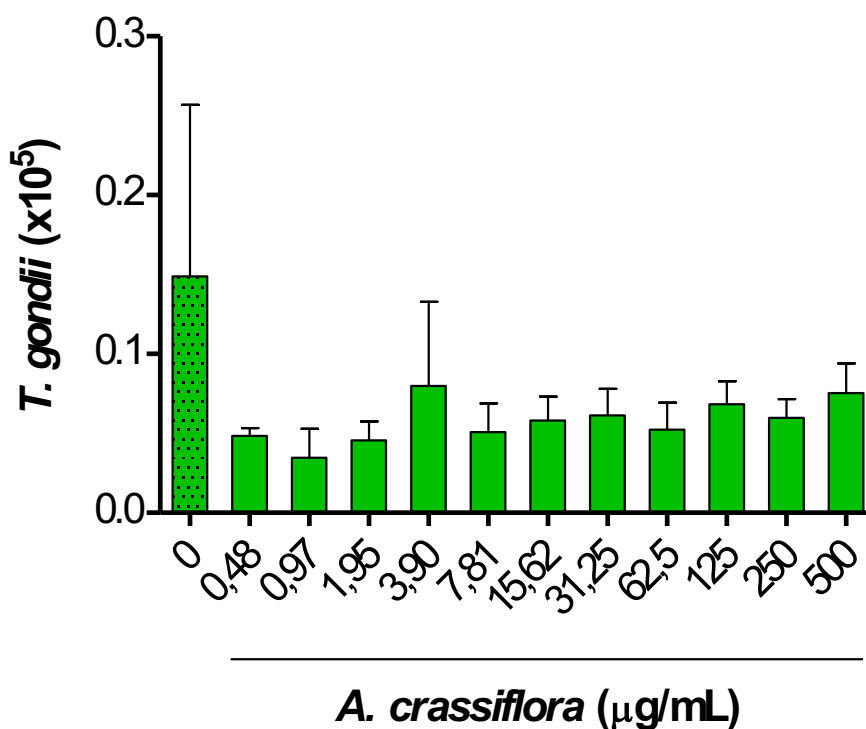


Figura 5. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7. Células RAW 264.7 (2×10^4 células/200 μL /poço) foram tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso da *Annona crassiflora*, (0,487 a 500 $\mu\text{g/mL}$) e mantidas a 37 °C e 5% de CO_2 *overnight* (18 h). Como controle, células RAW 264.7 foram tratadas apenas com meio RPMI a 5% de SBF (concentração = 0

$\mu\text{g/mL}$). Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, (5 parasitos por célula) e mantidas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após 3 horas, as células foram lavadas e lisadas com tampão específico. A quantificação dos parasitos, em cada condição experimental, foi determinada por reação colorimétrica, utilizando-se o cromógeno CPRG (clorofenol vermelho β -D-galactopiranosídeo) e leitura da densidade óptica a 570 nm, comparando-se os dados obtidos a uma curva-padrão. Os dados estão expressos como média \pm S.E.M de três experimentos independentes realizados em triplicata. As comparações entre células tratadas com as diferentes concentrações do extrato e o grupo controle foram analisadas utilizando-se o teste de Kurskal-Wallis ($p > 0,05$).

A **Figura 6** ilustra uma microplaca representativa dos três experimentos do ensaio de invasão de *T. gondii* em células RAW 264.7.

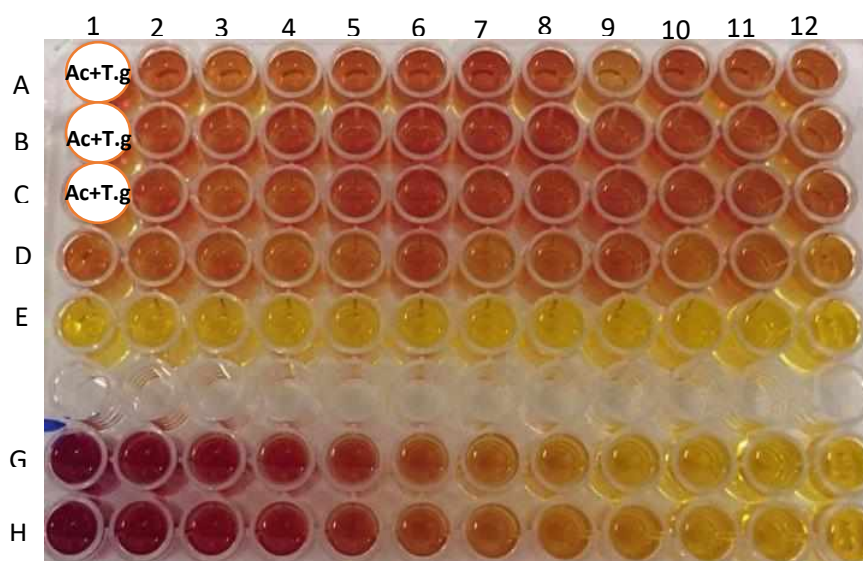


Figura 6. Microplaca ilustrativa da reação colorimétrica do ensaio de invasão de taquizoítos de *T. gondii* em células RAW 264.7. Colunas 2 a 12, linhas A, B, C: células RAW 264.7 + extrato *A. crassiflora* (500,0 a 0,487 $\mu\text{g/mL}$) + *T. gondii* (1×10^5 parasitos/poço). Colunas 1 a 6, linha D: células RAW 264.7 + *T. gondii* (1×10^5 parasitos/poço). Colunas 7 a 11, linha D: células HeLa + *T. gondii* (1×10^5 parasitos/poço). Colunas 1 a 6 e 7 a 11, linha E: células RAW 264.7 e HeLa, respectivamente. Colunas 1 a 12, linhas G e H: curva – padrão, em duplicata, de taquizoítos em quantidades/poço decrescentes. A intensidade de cor desenvolvida é diretamente proporcional ao número de taquizoítos/poço. **Fonte:** o autor.

7 Discussão

No presente estudo, avaliou-se o efeito do extrato aquoso da *Annona crassiflora* sobre a invasão de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) em células RAW 264.7.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) para investigar possível efeito citotóxico do extrato aquoso da *A. crassiflora* em células da linhagem RAW 264.7. Os resultados obtidos mostraram viabilidade celular reduzida em células RAW tratadas com a maior concentração do extrato (1.000 µg/mL), indicando, portanto, efeito citotóxico. Ao contrário, em concentrações mais baixas (31,25 a 250,0 µg/ml) houve uma tendência à indução de proliferação celular, embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo. Assim, novos experimentos precisam ser realizados para avaliarmos esta possível ação do extrato aquoso da *A. crassiflora*. Vale ressaltar que o método do MTT para avaliar viabilidade e proliferação celular está bem estabelecido na literatura, produzindo resultados reprodutíveis e confiáveis (BENOV, 2019).

Em estudo realizado por Hien e colaboradores (2015), o efeito antitumoral de vários compostos derivados do fruto da *Annona glabra* foi avaliado. Foram utilizadas nove frações do extrato do fruto seco. Os efeitos dos nove compostos sobre o crescimento de células cancerosas humanas foram determinados a partir da mensuração da atividade citotóxica utilizando-se o método do MTT. Os resultados obtidos mostraram que dois dos nove compostos apresentaram atividades citotóxicas moderadas contra a linhagem de células estudada, e uma das frações apresentou forte ação citotóxica, ação essa que foi confirmada a partir de outras análises, as quais apontaram efeito significativo de apoptose nas células tumorais. Esses dados associados aos obtidos em nosso estudo indicam que espécies do gênero *Annona* exibem efeitos citotóxicos e podem ser fonte de compostos bioativos com ações sobre células neoplásicas.

Neste estudo, a análise da viabilidade celular em células RAW tratadas com diferentes concentrações do extrato da *A. crassiflora*, permitiu determinar as concentrações subtóxicas do extrato, as quais seriam utilizadas nos ensaios de invasão das células com *T. gondii*.

Em um estudo abrangente de revisão bibliográfica realizado por Arruda e Pastore (2019), foram descritas diversas atividades antiparasitárias da *Annona crassiflora*. Mesquita et al. (2005), apud Arruda e Pastore (2019), avaliaram o efeito dos hexanos e extratos etanólicos da *Annona crassiflora* em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania donovani* e mostraram que extratos etanólicos da casca e da

madeira de raiz foram mais ativos contra *T. cruzi* e *L. donovani* e, ainda, que *L. donovani* foi mais sensível aos extratos, quando comparado ao *T. cruzi*. Outro estudo verificou efeito microbicida da *A. crassiflora* sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina e atribuiu este efeito aos alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas encontrados em análises fitoquímicas (Silva et al., 2014).

Além disso, os estudos citados na revisão bibliográfica referentes a ação larvicida, moluscicida, nematocida e antimalárica de diferentes compostos vegetais também indicam atividades microbicidas importantes, que podem estar relacionadas à atividade de compostos bioativos encontrados na *Annona crassiflora*.

Os efeitos antimicrobianos descritos na literatura em estudos utilizando derivados vegetais da *A. crassiflora*, instigaram-nos a investigar possível efeito do extrato aquoso da folha da referida espécie na infecção de células RAW 264.7 pelo parasito *T. gondii*. Vários estudos buscam encontrar diferentes espécies vegetais contra o *Toxoplasma gondii*, já que o tratamento da doença causada por esse parasito ainda é difícil, produzindo vários efeitos adversos importantes.

Estudo realizado na África Ocidental relatou que extratos aquosos de *Vernonia colorata* exibiam atividade anti-toxoplasma significativa. (J. MUI et al., 2005 apud AL NASR et al., 2016). Choi et al. (2008) avaliaram a atividade contra o *T. gondii* de extratos metanólicos de 15 espécies tradicionais usadas para tratar infecções por esse parasito e os resultados indicaram atividade anti-toxoplasma na planta *Zingiber officinale* e em extratos de *Sophora flavescens*. A espécie *Sophora flavescens* também foi utilizada no estudo realizado por Efferth et al. (2011), citado por Al Nasr et al. (2016); extrato etanólico da planta inibiu a proliferação de *T. gondii* em 98,7%. Nesse mesmo estudo, o mesmo extrato de *Torilis japonica* inibiu 99,3% a proliferação do parasito.

Outra pesquisa, realizada por Oliveira et al. (2009) buscou avaliar os efeitos da *Artemisia annua* sobre o parasito *T. gondii*, usando modelo *in vivo* e *in vitro*. Nessa pesquisa, os autores compararam a atividade da espécie vegetal com o medicamento Sulfadiazina, usado no tratamento da toxoplasmose. Como resultados, obtiveram que tanto no modelo *in vivo* como no *in vitro*, o grupo tratado com *A. annua* não apresentaram diferença significativa com o grupo tratado com Sulfadiazina, e ainda puderam inferir que houve uma inibição da infecção *in vitro* de 75% quando as células foram previamente tratadas com a planta.

Neste estudo, até o presente momento, não foram obtidos dados que confirmem efeito antiparasitário da *A. crassiflora* sobre a infecção de células RAW pelo parasito *T.*

gondii. Contudo, a falta de significância estatística nos resultados obtidos pode estar associada a um N amostral pequeno. Portanto, novos experimentos deverão ser realizados para a confirmação dos efeitos do extrato sobre a invasão e infecção de células RAW por *T. gondii*.

8 Conclusões

- O extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* não foi citotóxico em concentrações até 500 µg/mL, tendo apenas citotoxicidade na concentração de 1000 µg/mL;
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre a taxa de invasão do *T. gondii* em células HeLa e em células RAW 264.7;
- O extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora* não interferiu na invasão do parasito *Toxoplasma gondii* em células RAW 264.7.

Referências

- AL NASR, I.; AHMED, F.; PULLISHERY, F.; EL-ASHRAM, S.; RAMAIAH, V. V. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts-A mini-review. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 8, p. 730-734, 2016.
- ARANTES, T. E.; SILVEIRA, C.; HOLLAND, G. N.; MUCCIOLI, C.; YU, F.; JONES, J. L.; BELFORT, R. Ocular involvement following postnatally acquired *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil: a 28-year experience. **American journal of ophthalmology**, v. 159, n. 6, p. 1002-1012. e2, 2015.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; DE MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.
- ARRUDA, H. S.; SILVA, E. K.; PEREIRA, G. A.; ANGOLINI, C. F. F.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A.; PASTORE, G. M. Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 50, p. 82-95, 2019.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; HERENÁNDEZ-TINOCO, J.; RAMOS-NEVAREZ, A.; ESTRADA-MARTÍNEZ, S.; CERRILLO-SOTO, S. M.; BERISTAIN-GARCIA, I. Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 4, p. 1626-1633, 2018.
- BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015.
- BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 44-52, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.039.
- BENOV, L.. Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. **PloS one**, v. 14, n. 8, 2019.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. POLÍTICA E PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, p.190. Brasília – DF, 2016.

CAMARA, B. “*Toxoplasma gondii*” e Toxoplasmose. Disponível em: <
<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2017/04/toxoplasma-gondii-toxoplasmose.html>>
Acesso em: 25 de junho de 2018.

CASTRO, A. D. S.; ALVES, C. M. D. O. S.; ANGELONI, M. B.; GOMES, A. O.;
BARBOSA, B. D. F.; FRANCO, P. S.; FERRO, E. A. V. Trophoblast cells are able to
regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3,
p. 240-247, 2013.

CHEN, K.; WANG, J. L.; HUANG, S. Y.; YANG, W. B.; ZHU, W. N.; ZHU, W. Q.
Immune responses and protection after DNA vaccination against *Toxoplasma gondii*
calcium-dependent protein kinase 2 (TgCDPK2). **Parasite**, v. 24, 2017.

CHOI, K. M.; GANG, J.; YUN, J. Jisoo. Anti-*Toxoplasma gondii* RH strain activity of
herbal extracts used in traditional medicine. **International journal of antimicrobial
agents**, v. 32, n. 4, p. 360-362, 2008.

DA COSTA OLIVEIRA, C.; DE CARVALHO VELOSO, C.; FERREIRA, R. C. M.;
LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; DE CASTRO PEREZ, A.
Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by
activation of the cannabinoid system. **Planta medica**, v. 83, n. 03/04, p. 261-267, 2017.

DA COSTA OLIVEIRA, C.; DE MATOS, N. A.; DE CARVALHO VELOSO, C.;
LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; DE CASTRO PEREZ, A. Anti-
inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the
leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, p. 1-12, 2018.

DA SILVA, J. J.; CERDEIRA, C. D.; CHAVASCO, J. M.; CINTRA, A. B. P.; SILVA,
C. B. P. D.; MENDONÇA, A. N. D.; CHAVASCO J. K. In vitro screening antibacterial
activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant
Staphylococcus aureus (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista
do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333-340, 2014.

DELLARUPE, A.; FITTE, B.; PARDINI, L.; CAMPERO, L. M.; BERNSTEIN, M.;
ROBLES, M. D. R.; UNZAGA, J. M.. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*
infections in synanthropic rodents from Argentina. **Revista Brasileira de Parasitologia
Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 113-118, 2019.

DE OLIVEIRA, T. C.; SILVA, D. A. O.; ROSTKOWSKA, C.; BELA, S. R.; FERRO, E.
A.; MAGALHÃES, P. M.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua*

L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. **Experimental parasitology**, v. 122, n. 3, p. 233-241, 2009.

DE SOUZA, Wanderley; BELFORT JR, Rubens. **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2014.

DE SOUZA, L. P. F.; RAMOS, E. L.; SANTANA, S. S.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) are able to induce beneficial immunomodulatory effects in a murine model for treatment of *Toxoplasma gondii* infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 164, 2016.

DOĞAN, Z. S.; HASVATAN, E. E.; GULEN, G.; USLU, R.; ERYIVILDIZ, B.; DURMUSKAHYA, C.; GUNDUZ, C. Effect of Extracts of the Endemic Plants *Centaurea lydia* and *Phlomis nissolii* on *Toxoplasma gondii*. **Turkiye parazitolojii dergisi**, v. 41, n. 3, p. 164-168, 2017.

DRAGANO, N. R. V.; DE VENANCIO, V. P.; DE ARAÚLO PAULA, F. B.; DELLA LUCIA, F.; DE OLIVEIRA FONSECA, M. J.; AZEVEDO, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant foods for human nutrition**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

EGYDIO-BRANDÃO, A. P. M.; FURLAN, C. M.; DOS SANTOS, D. Y. A. C.. Genetic Diversity and Structure of Populations of *Annona crassiflora* Mart. of Brazilian Savanna and Its Association with Chemical Variability. **Chemistry & biodiversity**, v. 13, n. 8, p. 990-997, 2016.

FERRAZ, C.A.; SILVA, D. B.; PRADO, L. C. D. S.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural product research**, p. 1-5, 2017.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(1): 1-23, 2009.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

HIEN, N. T. T.; NHIEM, N. X.; YEN, D. T. H.; HANG, D. T. T.; TAI, B. H.; QUANG, T. H.; KIM, S.H. Chemical constituents of the *Annona glabra* fruit and their cytotoxic activity. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1602-1607, 2015.

- JONES, G. W.; RICHARDSON, L. A.; UHLMAN, D. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. **Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 351-360, 1981.
- JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; CAIXETA, D. C.; DE SOUZA, A. V., ESPINDOLA, F. S. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, 2017.
- JUSTINO, A.B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.
- LANGONI, H.; SILVA, A. V. D.; CABRAL, K. D. G.; CUNHA, E. L. P.; CUTOLO, A. A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 243-244, 2001.
- LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago v. 15, n. 2, p. 211-222, 1992.
- MACHADO, A. R. T.; FERREIRA, S. R.; DA SILVA MEDEIROS, F.; FUJIWARA, R. T.; DE SOUZA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. S. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 113, 2015.
- MESQUITA, M. L. D.; DESRIVOT, J.; FOURNET, A.; PAULA, J. E. D.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOURA, F. B. R.; JUSTINO, A. B; FERREIRA, B. A.; ESPINDOLA, F. S.; DE ASSIS ARAÚJO, F.; TOMIOSSO, T. C. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta medica**, 2018.

MURATA, Y.; SUGI, T.; WEISS, L. M.; KATO, K. Identification of compounds that suppress *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites. Ed. Laura J. Knoll. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178203, 2017.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; DE LIMA, M. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.

PIMENTA, L P. S.; GARCIA, G. M.; GONÇALVES, S. G. D. V.; DIONÍSIO, B. L.; BRAGA, E. M.; MOSQUEIRA, V. C. F. *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014.

RIBEIRO, I. C. D. O.; MARIANO, E. G. A.; CARELI, R. T.; MORAIS-COSTA, F.; DE SANT'ANNA, F. M.; PINTO, M. S.; DUARTE, E. R. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 32, 2018.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. D. S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. D. S Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. 4, 2004.

RIBEIRO, P. C.; SOUZA, M. L.; MULLER, L. A.; ELLIS, V. A.; HEUERTZ, M.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Climatic drivers of leaf traits and genetic divergence in the tree *Annona crassiflora*: a broad spatial survey in the Brazilian savannas. **Global change biology**, v. 22, n. 11, p. 3789-3803, 2016.

ROCHA, R. S.; KASSUIA, C. A. L.; FORMAGIO, A. S. N.; MAURO, M. D. O.; ANDRADE-SILVA, M.; MONREAL, A. C. D.; OLIVEIRA, R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 35-47, 2016.

SAN MIGUEL, J. M.; GUTIERREZ-EXPOSITO, D.; AGUADO-MARTINEZ, A.; GONZALEZ-ZOTES, E.; PEREIRA-BUENO, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ALVAREZ-GARCIA, G.. Effect of different ecosystems and management practices on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in wild ruminants in Spain. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 2, p. 293-300, 2016.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 2001.

SHEPARD, C. C. Phagocytosis by HeLa cells and their susceptibility to infection by human tubercle bacilli. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 392-396, 1955.

SOUSA, M. G. Doenças Infecciosas. In: CRIVELLENTIN, L. Z.; BORIN-CRIVELLENTIN, S. Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais. **São Paulo, 2ª edição, MedVet**, 2015. cap. 4. p. 145-182.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, 111:A3.B.1-A3.B.3., 2015. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111

SWIERZY, I. J.; HANDEL, U.; KAEVER A.; JAREK, M.; SCHARFE, M.; SCHLUTER, D.; LUDER, C. G. K. Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with *Toxoplasma gondii* reveal cell type-specific host-parasite interactions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7229, 2017.

TACIAK, B.; BIALASEK, M.; BRANIEWSKA, A.; SAS, Z.; SAWICKA, P.; KIRAGA, T.; KROL, M. Avaliação da estabilidade fenotípica e funcional da linha celular RAW 264.7 através de passagens seriais. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198943, 2018.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA M. A. D.; SILVA, L. G. E. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B.. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 679-688, 2007.

USDA, NRCS. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 1 May 2018). National Plant Data Team, Greensboro. 2015.

VILAR, J. B.; FERRI, P. H.; CHEN-CHEN, L. Investigação de genotoxicidade de araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) usando SOS-Inductest e teste de Ames. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 71, n. 1, p. 197-202, 2011.

YANG, N.; WANG, D.; XING, M.; LI, C.; LI, J.; WU, A.; CHEN, Q. Seroepidemiology and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection among the Newly Enrolled Undergraduates and Postgraduate Students in China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2092, 2017.