



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia
Laboratório de Fitoquímica
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB
Laboratório de Morfopatologia – LMP



Samara Aparecida Santana Souza

Efeito da atividade tripanocida *in vitro* do extrato bruto de *Schinus terebinthifolia* e da sua formulação

Ouro Preto

2025

Samara Aparecida Santana Souza

Efeito da atividade tripanocida *in vitro* do extrato bruto de *Schinus terebinthifolia* e da sua formulação

Monografia apresentada à disciplina “Trabalho de Conclusão de Curso (TCC007)” como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Prof^a Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Coorientadores: Me. Elves Manhique; Dr^a. Thays Helena Duarte

Ouro Preto

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S729e Souza, Samara Aparecida Santana.

Efeito da atividade tripanocida in vitro do extrato bruto de Schinus terebinthifolia e da sua formulação. [manuscrito] / Samara Aparecida Santana Souza. - 2025.

44 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Medo de Abreu Vieira.

Coorientadores: Me. Elves Milagre Manhique, Dra. Thays Helena Chaves Duarte.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Schinus terebinthifolia. 4. Nanoemulsão. I. Vieira, Paula Medo de Abreu. II. Duarte, Thays Helena Chaves. III. Manhique, Elves Milagre. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Samara Aparecida Santana Souza

“Efeito da atividade tripanocida *in vitro* do extrato bruto de frutos de *Schinus terebinthifolia*”

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 27 de agosto de 2025

Membros da banca

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Thays Helena Chaves Duarte - Co-orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Elves Milagre Manhique - Co-orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Flávia de Souza Marques - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Viviane Flores Xavier - Universidade Federal de Ouro Preto

Paula Melo de Abreu Vieira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 20/10/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/10/2025, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1000143** e o código CRC **A5346C1A**.

Dedico este trabalho a todos aqueles que
buscam a superação, apesar dos desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e força concedidas para chegar até aqui, guiando meus passos ao longo desta trajetória acadêmica.

A minha família, fonte de amparo e motivação, que sempre esteve ao meu lado nos momentos decisivos. Em especial, aos meus pais, Hélio e Maria Aparecida, exemplos de dedicação e inspiração, que sempre acreditaram no meu potencial e não mediram esforços para proporcionar minha formação.

Aos meus irmãos Victor e Gutemberg, pelo apoio constante e auxílio indispensável durante todo esse percurso.

A Skadi e Leôncio, que foram importantes para meu bem-estar emocional, contribuindo para minha perseverança.

À Prof.^a Dra. Paula Melo de Abreu Vieira, pela orientação, paciência, acolhimento e compreensão fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Thays Helena Duarte, pela confiança depositada, oportunidade de participar na iniciação científica, coorientação, suporte e por compartilhar sua experiência e conselhos. Sua disponibilidade em auxiliar, independentemente do momento, foi essencial para esta caminhada.

Ao Me. Elves Manhique, agradeço pela coorientação, confiança, auxílio nos experimentos e pelos conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para meu crescimento científico.

Ao Lucas, pela constante disposição e boa vontade em me auxiliar em diversas etapas do trabalho.

À República Poucas e Boas, pela motivação, incentivo à participação neste projeto, suporte emocional e apoio incondicional.

Aos amigos que me ouviram e apoiaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tornando o percurso mais leve.

A todos os colegas do Laboratório de Morfopatologia, pela colaboração e ambiente acolhedor.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pelo espaço acadêmico e ao projeto de iniciação científica pela oportunidade de crescimento.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelas bolsas e pelo suporte financeiro que viabilizaram esta pesquisa.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* – agente etiológico da doença de Chagas – atua na patogênese da doença de Chagas de diversas maneiras, incluindo fatores inerentes ao hospedeiro bem como ao agente em si. O benznidazol (BZ) um dos fármacos padrão para o tratamento da doença de Chagas apresenta limitações, principalmente os relacionados à farmacocinética e biodistribuição, o que contribui às cepas de *T. cruzi* distintos perfis de susceptibilidade ao fármaco. Estudos atuais buscam novos compostos ou fármacos capazes de apresentar atividade tripanocida eficaz e com menos efeitos colaterais em comparação ao BZ. A *Schinus terebinthifolia*, é utilizada no tratamento de doenças degenerativas como o Alzheimer e bem como contra o câncer. Além disso, a *S. terebinthifolia* possui características antioxidantes e de fortalecimento do sistema imunológico. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade tripanocida do extrato bruto e da formulação de frutos de *S. terebinthifolia* contra o *T. cruzi*, buscando novos fármacos promissores para o tratamento da doença de Chagas. Para tanto, foram preparadas nanoemulsões contendo o extrato bruto, caracterizadas quanto à sua estabilidade e viscosidade. A citotoxicidade foi avaliada utilizando cardiomiócitos H9C2 como modelo celular. A análise da atividade tripanocida foi realizada por meio da quantificação do número de amastigotas intracelulares da cepa Y após 24 e 48 horas de tratamento. Os resultados demonstraram redução significativa do número de amastigotas nas concentrações testadas, sem apresentar citotoxicidade relevante. Ademais, as características reológicas das nanoemulsões apresentaram comportamento pseudoplástico. Conclui-se que o extrato bruto de frutos de *S. terebinthifolia* apresenta atividade tripanocida promissora, podendo ser explorado como alternativa terapêutica para a doença de Chagas, especialmente diante dos desafios encontrados na terapia convencional com benznidazol. Entretanto, a toxicidade observada da formulação ressalta a necessidade de investigações adicionais direcionadas ao desenvolvimento de formulações capazes de aliar eficácia farmacológica e segurança toxicológica, de modo a possibilitar a aplicação desta alternativa terapêutica em contextos clínicos futuros.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Schinus terebinthifolia*, Atividade tripanocida, Nanoemulsão.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi – the etiological agent of Chagas disease – plays a role in the pathogenesis of Chagas disease in several ways, including factors inherent to the host as well as the agent itself. Benznidazole (BZ), one of the standard drugs for the treatment of Chagas disease, has limitations, mainly related to pharmacokinetics and biodistribution, which contribute to distinct susceptibility profiles for *T. cruzi* strains. Current studies are seeking new compounds or drugs capable of presenting effective trypanocidal activity with fewer side effects compared to BZ. *Schinus terebinthifolia* is used in the treatment of degenerative diseases such as Alzheimer's and also against cancer. Furthermore, *S. terebinthifolia* has antioxidant and immune-boosting properties. This study aimed to evaluate the trypanocidal activity of the crude extract and the formulation of *S. terebinthifolia* fruits against *T. cruzi*, seeking new promising drugs for the treatment of Chagas disease. To this end, nanoemulsions containing the crude extract were prepared and characterized for stability and viscosity. Cytotoxicity was assessed using H9C2 cardiomyocytes as a cell model. Trypanocidal activity was analyzed by quantifying the number of intracellular amastigotes of the Y strain after 24 and 48 hours of treatment. The results demonstrated a significant reduction in the number of amastigotes at the tested concentrations, without significant cytotoxicity. Furthermore, the rheological characteristics of the nanoemulsions showed pseudoplastic behavior. We conclude that the crude extract of *S. terebinthifolia* fruits exhibits promising trypanocidal activity and could be explored as a therapeutic alternative for Chagas disease, especially given the challenges encountered in conventional benznidazole therapy. However, the observed toxicity of the formulation highlights the need for further investigation aimed at developing formulations capable of combining pharmacological efficacy and toxicological safety, enabling the application of this therapeutic alternative in future clinical settings.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Schinus terebinthifolia*, Trypanocidal activity, Nanoemulsion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da doença de Chagas: países endêmicos e não endêmicos..	11
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	13
Figura 3: Avaliação da viabilidade celular em células H9C2..	23
Figura 4: Avaliação da infectividade de células H9C2 com cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	25
Figura 5: Avaliação número de amastigotas em células H9C2 com cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 6: Análise de tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.	29
Figura 7: Curva de fluxo de cisalhamento constante representativa da formulação Branco (A) e da FEB (B); reograma representativo da formulação Branco (C) e do FEB (D)..	32
Figura 8: Avaliação da viabilidade celular em células H9C2 tratadas no tempo de 24h com as diferentes formulações..	33
Figura 9: Avaliação da infectividade de células H9C2 com cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	34
Figura 10: Avaliação do número de amastigotas por 100 células H9C2 com cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise fitoquímica do extrato bruto etanólico de <i>S. terebinthifolia</i>	22
Tabela 2: Valores de CC ₅₀ , IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) dos compostos EB e do controle Benznidazol (BZ).....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ — Benznidazol

DCh — Doença de Chagas

EB — Extrato Bruto

IC — Concentração Inibitória

IS — Índice de Seletividade

ISO — *International Organization for Standardization*

T. cruzi — *Trypanosoma cruzi*

FEB — Formulação com Extrato Bruto

H9C2 — Linhagem Celular de Cardiomiócitos

S. terebinthifolia — *Schinus terebinthifolia*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	Epidemiologia e formas clínicas da doença de Chagas	10
1.2	Tratamento da doença de Chagas	14
1.3	<i>Schinus terebinthifolia</i> e metabólitos secundários.....	15
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	<i>Schinus terebinthifolia</i> – Pimenta rosa.....	18
4.2	Obtenção do extrato bruto	18
4.3	Preparação formulação do extrato bruto de <i>Schinus terebinthifolia</i>	18
4.4	Caracterização das formulações	19
4.5	Teste de estabilidade da formulação	19
4.6	Citotoxicidade das formulações e do extrato da <i>S. terebinthifolia</i>	20
4.7	Avaliação da atividade tripanocida.....	20
4.8	Análise estatística.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	Análise fitoquímica	22
5.2	Viabilidade Celular	22
5.3	Taxa de infectividade	24
5.4	Caracterização das formulações	28
5.4.1	Tamanho da partícula, Potencial Zeta e Índice de polidispersão.....	28
5.4.2	Comportamento reológico da formulação	30
5.5	Viabilidade Celular	33
5.6	Atividade tripanocida.....	33

6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e formas clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas (DCh) é uma enfermidade que está presente desde os primórdios da civilização, evidências arqueológicas indicam que a DCh existia há aproximadamente 9.000 anos, com estudos em múmias exumadas do Peru e Chile revelando a presença do DNA do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em tecidos datados de 7.000 a.C., mas, só foi descoberta no início do século XX, por conta das tecnologias e com a chegada de estudiosos nas populações mais atingidas do interior do Brasil. Foi por volta de 1909 que Carlos Chagas identificou o vetor (triatomíneo), o parasito *T. cruzi* e a doença em uma paciente chamada Berenice, em Lassance, Minas Gerais, Brasil. A doença foi inicialmente ignorada pela comunidade científica europeia devido ao foco em outros problemas globais, como a Primeira Guerra Mundial, evidenciado ainda mais com Chagas, que foi indicado ao Prêmio Nobel duas vezes, mas não recebeu o prêmio (CHAGAS, 1909; CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Embora a DCh seja tradicionalmente restrita aos continentes sul e centro-americano devido à presença do vetor. Igualmente, casos têm sido registrados em países não endêmicos como, Espanha, França, Suíça, Itália e Alemanha, principalmente em decorrência da migração de indivíduos infectados e de outras vias de transmissão, como transfusões de sangue e transmissão vertical (Figura 1). A Doença de Chagas (DCh) tem distribuição primária nas Américas, sendo endêmica em 21 países da América Latina, incluindo o Brasil, com maior incidência de casos agudos nas regiões Norte e Nordeste. Ademais, a região Norte concentra o maior número de notificações, com destaque para o estado do Pará, responsável por aproximadamente 40% dos casos registrados (DE SOUZA MACÊDO et al., 2021). Além disso, estima-se que, em 2019, cerca de 12 mil mortes foram causadas pela DCh, sendo que menos de 10% dos indivíduos infectados foram diagnosticados (DNDi, 2024).

corrente sanguínea. No trato digestivo do inseto, essa forma se diferencia em epimastigota, que é adaptada ao ambiente do hospedeiro invertebrado, onde se multiplica ativamente por fissão binária, migrando até o intestino. No reto do inseto, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante para o vertebrado. Durante uma nova alimentação, o triatomíneo libera fezes ou urina contendo os tripomastigotas metacíclicos sobre a pele do hospedeiro. Ao coçar o local da picada, o parasita pode penetrar no organismo através da lesão, alcançando a corrente sanguínea e iniciando uma nova infecção (SIQUEIRA-BATISTA, 2020; RASSI et al., 2010).

Ao alcançar a corrente sanguínea, o *T. cruzi*, logo na forma tripomastigota metacíclica, está apto a prosseguir com seu ciclo no hospedeiro vertebrado. Nessa fase, o parasita busca células hospedeiras para invadir, utilizando-se do ambiente intracelular como forma de proteção contra o sistema imunológico. As primeiras células a serem parasitadas, em geral, pertencem ao sistema fagocitário mononuclear, cuja função natural seria justamente a eliminação de patógenos. No entanto, o *T. cruzi* consegue escapar da ação imune mesmo após ser fagocitado, ao secretar substâncias que rompem a membrana do compartimento desse sistema, impedindo sua destruição. Uma vez livre no citoplasma da célula hospedeira, o parasito se diferencia para a forma amastigota e inicia sua multiplicação por divisão binária. Após sucessivas replicações, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas, que rompem a célula infectada e são liberados na corrente sanguínea. A partir desse ponto, o parasita pode alcançar diversos tecidos e invadir diferentes tipos celulares, como epiteliais, musculares e nervosos, ampliando sua capacidade de disseminação no organismo, como ilustrado na Figura 2 (MACHADO et al., 2012; BRENER, 1969).

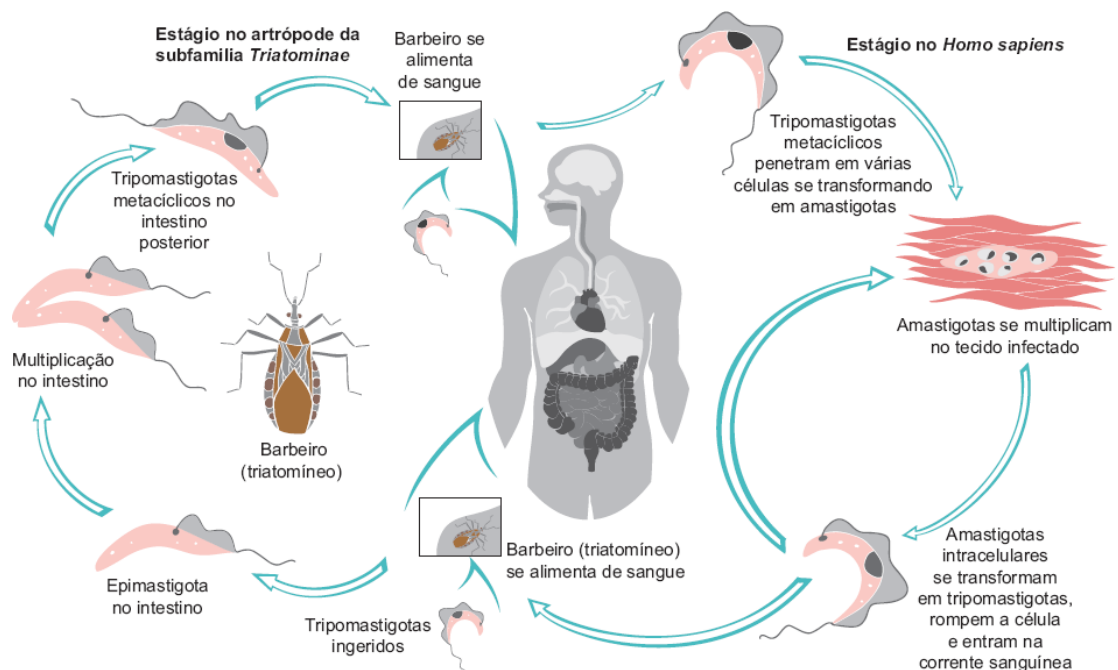


Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. E-book. p.258.

A DCh apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. Esta última pode se manifestar de três formas distintas: indeterminada (assintomática), cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Após a infecção inicial pelo *T. cruzi*, o período de incubação varia de uma a três semanas, durante as quais o indivíduo pode apresentar sintomas inespecíficos. Na fase aguda, os sinais clínicos são geralmente leves e inespecíficos como febre, cefaleia e mialgia, o que dificulta o diagnóstico por se assemelharem a outras infecções comuns (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Ademais, alguns sinais característicos, embora raros, podem estar presentes, especialmente em casos de infecção vetorial. Entre eles, destaca-se o chagoma de inoculação, caracterizado por inchaço no local da picada do triatomíneo, e o sinal de Romaña, que consiste no edema palpebral unilateral quando o parasita penetra pelo olho. Esses sinais, denominados “portas de entrada”, são exclusivos da transmissão por vetores.

Embora os sintomas da fase aguda tendam a regredir espontaneamente, isso não impede a progressão da doença para a fase crônica. Na fase crônica, a maioria dos pacientes permanece na forma indeterminada, que pode durar até 30 anos sem qualquer manifestação clínica. Durante esse período, a pessoa infectada pode não apresentar alterações no eletrocardiograma ou em exames de imagem, tornando difícil prever a evolução da doença (DE SOUZA MACÊDO et al., 2021).

A partir da fase indeterminada, o paciente pode evoluir para formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas, que incluem as formas cardíaca, digestiva ou mista. A forma cardíaca é caracterizada por insuficiência cardíaca congestiva, decorrente da destruição progressiva dos cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi*. Esse processo leva à formação de áreas de fibrose e à consequente perda de massa muscular cardíaca. É comum a formação de trombos intracardíacos, os quais podem resultar em eventos graves, como infarto ou morte súbita.

Além disso, pode ocorrer cardiomegalia, caracterizada pelo aumento do volume do coração. Quando o parasita atinge o trato digestivo, ele pode comprometer o sistema nervoso autônomo, tanto o simpático quanto o parassimpático, afetando a motilidade gastrointestinal. A destruição das fibras parassimpáticas, responsáveis pelos movimentos peristálticos, pode causar retenção fecal e levar ao desenvolvimento de megacólon ou megaesôfago. Já a forma mista é diagnosticada quando o paciente apresenta simultaneamente manifestações cardíacas e digestivas da doença (MACHADO et al., 2012; BRENER, 1969).

A DCh pode ser transmitida por diversas vias, sendo a forma vetorial a principal e já previamente descrita. Além dessa, destaca-se a transmissão congênita, que ocorre da mãe para o feto durante a gestação ou no parto. Outra via importante é a transmissão por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, embora sua incidência tenha diminuído significativamente desde a década de 1980, em função do aprimoramento dos procedimentos de triagem adotados em bancos de sangue e instituições hospitalares. A transmissão oral também representa um mecanismo relevante, especialmente pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou com suas excreções, com ênfase em produtos como caldo de cana e açaí. Finalmente, há relatos de infecções acidentais em ambientes laboratoriais que manipulam o *T. cruzi* para fins de pesquisa (PACHECO et al., 2021).

1.2 Tratamento da doença de Chagas

O controle do inseto vetor é o método de prevenção mais importante para evitar a doença de Chagas na América Latina, mas como medida pós-infecção, tem-se o tratamento farmacológico. A doença de Chagas tem uma alta chance de cura se o tratamento for iniciado logo após a infecção ou impedindo que a doença evolua para forma mais grave. O tratamento etiológico é direcionado às manifestações da doença a fim de controlar os sintomas e evitar as complicações. Em pacientes crônicos, o tratamento antiparasitário pode prevenir ou reduzir a

progressão da doença e impedir a transmissão, por exemplo, a infecção de mãe para filho (DE MACÊDO; LEMOS; DOS SANTOS, 2023).

Atualmente, só existem dois fármacos utilizados no tratamento da DCh: Nifurtimox (NFX) e Benznidazol (BZ), que foram desenvolvidos há mais de 50 anos (LASCANO; BOURNISSEN; ALTCHER, 2021). Ambos os medicamentos têm perfis de eficácia e segurança semelhantes, cujo objetivo é eliminar o parasito do corpo. Contudo, mesmo sendo o tratamento de escolha, esses fármacos possuem limitações, tais como: tratamento prolongado (60-90 dias) e são eficazes para as infecções aguda, cessando a parasitemia no hospedeiro, mas em infecções crônicas, não possuem boa eficácia, visto que na maioria dos casos os parasitos persistem. Além disso, o tratamento não só é contraindicado durante a gravidez, devido a evidências limitadas sobre segurança, mas também tem efeitos adversos como edema, dores musculares e dermatite devido à sua baixa biodisponibilidade que levam à uma redução na adesão do tratamento e ineficácia terapêutica (HASSLOCHER-MORENO, 2024). Dessa forma, para o desenvolvimento e aprimoramento dos medicamentos tripanocidas, são essenciais estudos direcionados à formulação do produto farmacêutico, bem como o aprofundamento das pesquisas nessa área.

1.3 *Schinus terebinthifolia* e metabólitos secundários

Com o avanço do conhecimento da biologia do *T. cruzi*, sequenciamento do seu genoma e da fisiopatologia da DCh, concomitantemente vem surgindo a possibilidade de novos compostos serem avaliados para o tratamento da DCh. Nesse cenário, as plantas medicinais e seus metabólitos secundários têm se destacado como fontes promissoras de moléculas bioativas com potencial tripanocida. Estudos recentes demonstram que extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados de diversas espécies apresentam atividades relevantes contra o *T. cruzi*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AZEREDO et al. 2014).

Estudos revisaram o potencial de terpenóides de origem vegetal como compostos ativos contra tripanossomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, destacando resultados positivos em ensaios laboratoriais (DURÃO et al., 2022) (MASYITA, Ayu et al). Adicionalmente, Carneiro e colaboradores relataram que os extratos e óleos essenciais de *Schinus terebinthifolia* (*S. terebinthifolia*) apresentaram atividade tripanocida significativa (CARNEIRO, 2021). Além disso, revisões recentes, reforçam o papel de alcaloides, terpenóides e flavonóides presentes em plantas medicinais como alternativas viáveis para o desenvolvimento de novos tratamentos,

especialmente diante das limitações dos medicamentos atualmente disponíveis para a DCh (SANTOS et al., 2020) (SILVA, Matheus L. et al).

A medicina popular é uma prática tradicional amplamente utilizada no Brasil e em diversos países para o tratamento e cura de doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O Brasil destaca-se por sua vasta biodiversidade, a qual a população emprega em áreas como medicina, agricultura e indústria. Nesse contexto, observa-se uma crescente busca por recursos naturais, especialmente plantas medicinais, e por novos compostos biologicamente ativos, com o objetivo de avançar na farmacologia e desenvolver novos tratamentos e medicamentos fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Uma das plantas com potencial terapêutico relevante é a *S. terebinthifolia*, originária da América do Sul e nativa do Brasil, Paraguai, Uruguai e leste da Argentina. Conhecida por diversos nomes populares, como aroeira-da-praia, aroeira-precoce, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, aroeira-negra, aroeira-branca, aroeira-do-campo e pimenta rosa essa planta está amplamente difundida no território brasileiro (AZEVEDO, et al 2015; FALCÃO, et al. 2015). Ela apresenta propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antivirais, antibacterianas, antioxidantes e anticancerígenas (MORAIS, et al. 2014).

Entre os principais componentes químicos da *S. terebinthifolia* destacam-se substâncias alifáticas simples, óleo essencial (mono, sesqui e diterpenos), triterpenóides, fenóis simples e seus glicosídeos, flavonóides, taninos e bisfenóis (Fundação Oswaldo Cruz, 2011). Seu uso popular abrange o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções urinárias, diarreia, doenças sexualmente transmissíveis e úlceras. Entre os metabólitos secundários responsáveis por essas atividades, sobressaem os flavonóides e biflavonóides, terpenos, fenóis, saponinas, taninos e compostos esteroidais (CARVALHO, et al. 2013).

No contexto DCh, os metabólitos mais investigados são os flavonoides e terpenoides. Os flavonoides, presentes em diversas plantas além da *S. terebinthifolia*, como *Arrabidaea brachypoda*, demonstraram atividade antiparasitária significativa, reduzindo a parasitemia sanguínea em camundongos infectados com *T. cruzi* (ROCHA et al., 2014) e aumentando a sobrevivência dos animais em comparação ao tratamento com BZ. Esses resultados sugerem que a *S. terebinthifolia* possui potencial atividade antiparasitária. Quanto aos terpenoides vegetais e seus derivados semissintéticos, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam efeitos promissores contra o parasita *T. cruzi*. Em modelo experimental com camundongos infectados, o tratamento com terpenoides resultou em redução significativa da parasitemia, apresentando eficácia comparável

ao BZ, medicamento de referência (DURÃO et al., 2022). Tais achados reforçam o potencial terapêutico dos terpenos como alternativas no tratamento da doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando as limitações dos tratamentos atualmente disponíveis para a doença de Chagas, é fundamental investir em pesquisas que busquem o desenvolvimento de novos fármacos capazes de identificar alvos terapêuticos alternativos e propor estratégias mais eficazes para o manejo e prevenção das manifestações clínicas da doença. Nesse contexto, o estudo de compostos naturais com atividade tripanocida se destaca pelo seu grande potencial, especialmente devido à vasta biodiversidade vegetal do Brasil, que oferece uma rica fonte de moléculas bioativas promissoras para novas abordagens terapêuticas. Dessa forma, neste trabalho escolheu-se estudar a planta *S. terebinthifolia* devido às suas propriedades e metabolitos secundários conhecidos como tendo ação antiparasitária e outras aplicações, além da sua disponibilidade no bioma brasileiro, portanto, a *S. terebinthifolia* configura como uma planta de baixo custo e acessível para as comunidades afetadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade tripanocida do extrato bruto de frutos de *Schinus terebinthifolia* e da formulação contendo este extrato.

3.2 Objetivos específicos

- Obter extrato bruto de frutos de *Schinus terebinthifolia*;
- Avaliar citotoxicidade do extrato bruto de *Schinus terebinthifolia*;
- Avaliar atividade tripanocida do extrato bruto de *Schinus terebinthifolia*;
- Desenvolver formulações particuladas sólidas;
- Avaliar a estabilidade da formulação;
- Avaliar comportamento reológico da formulação;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação;
- Avaliar atividade tripanocida da formulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Schinus terebinthifolia* – Pimenta rosa

Frutos de *S. terebinthifolia* foram coletados em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil (20° 23' 8" S e 43° 30' 13" W) em abril de 2019. Um espécime voucher foi identificado e depositado no herbário José Badini da UFOP sob o código OUPR31536.

4.2 Obtenção do extrato bruto

A extração foi conduzida seguindo o método descrito em Pinto et al. (2020) e envolveu a maceração dos frutos (1,08kg) à temperatura ambiente com etanol 95% (2L, 2 extrações consecutivas em 24h). As soluções extraídas foram filtradas e submetidas à evaporação a vácuo para gerar 123,64g de extrato etanólico bruto. O extrato obtido foi armazenado à temperatura ambiente em frasco envolto em papel alumínio, devidamente protegido da luz, a fim de preservar sua estabilidade e evitar degradação de compostos sensíveis.

4.3 Preparação formulação do extrato bruto de *Schinus terebinthifolia*

A formulação farmacêutica escolhida para a preparação da amostra foi uma nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A), ou seja, uma mistura em que pequenas gotículas de óleo ficam dispersas de maneira estável no meio aquoso. A nanoemulsão foi feita pelo método de inversão de fases descrito por Sousa et al. (2024). Cujos princípios ativos utilizados foram: extrato bruto dos frutos de *S. terebinthifolia*. Para a fase aquosa: água ultrapura. Os tensoativos para fase oleosa: óleo de girassol. E os tensoativos não iônicos: BRIJ S2 (Éster de ácidos graxos de poli(óxido de etileno)): 2% (p/p); RH 400 (PEG-40 Óleo de Rícino Hidrogenado): 3% (p/p).

Primeiro, o princípio ativo e o óleo de girassol foram dissolvidos em uma mistura de tensoativos não iônicos (BRIJ S2 e RH 400). Em seguida, essa mistura foi emulsificada em água ultrapura. A nanoemulsão foi composta por 2% de princípio ativo, 3% de óleo de girassol, 88% de água ultrapura, 2% de BRIJ S2 e 3% de RH 400. Tanto a fase oleosa quanto os tensoativos foram aquecidos a 75 ± 2 °C, assim como a fase aquosa. Com ambas as fases aquecidas, a fase aquosa foi adicionada gradualmente à fase oleosa, agitando por 1 minuto a 600 rpm com um agitador mecânico (Fisaton, modelo 713D, São Paulo, Brasil). Depois de 1 minuto, a emulsão foi transferida para um agitador magnético (Fisaton, São Paulo, Brasil) até

esfriar completamente. Após 24 horas, foram feitas análises macroscópicas e microscópicas para avaliar a aparência e a homogeneidade.

4.4 Caracterização das formulações

A caracterização das partículas da formulação foi feita pelo índice de polidispersão, o diâmetro e a carga das partículas foram determinados pelo método de espectrometria de correlação de fótons (ECF) utilizando o Zetasizer® Nano Series (Malvern, EUA). Para isso, as formulações foram diluídas em água ultrapura (1:1000), transferidas para cubetas de quartzo e as medidas foram realizadas à temperaturas de 25°C e em ângulo 90°, 1, 7, 14, 21, 28 e 60 dias após o desenvolvimento. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4.5 Teste de estabilidade da formulação

A estabilidade da formulação foi averiguada após a estocagem da formulação com o extrato bruto da *S. terebinthifolia* à temperatura 25°C, protegidas da luz. Sendo suas características como tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta avaliados ao longo de 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias por meio do Zetasizer® Nano Series (Malvern, EUA). Para isso, as formulações foram diluídas em água ultrapura (1:1000) e aplicadas em uma célula capilar semi-descartável com o auxílio de uma seringa para fazer a leitura de potencial zeta, já para as leituras de tamanho e índice de polidispersão foi utilizada uma cubeta de quartzo. As medidas foram realizadas a temperaturas de 25°C e em ângulo 90°, decorridos 1, 7, 14, 21, 28 e 60 dias após o desenvolvimento. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

A avaliação do comportamento reológico das nanoemulsões também foi avaliada utilizando um reômetro rotacional modelo MCR 102 (Anton Paar, Graz, Áustria), equipado com geometria cone-placa (diâmetro de 50 mm, ângulo de 1°, gap de 0,049 mm). As amostras foram mantidas a 25 °C, protegidas da luz, e analisadas no período de 1 dia após o preparo. Antes das medições, as formulações foram homogeneizadas suavemente. Para cada análise, aproximadamente 0,5 mL da amostra foi aplicada diretamente na placa do reômetro. O perfil reológico foi determinado por meio de uma varredura de taxa de cisalhamento (*shear rate*) de 0,1 a 100 s⁻¹, com registro da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento, a 25 °C.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.6 Citotoxicidade das formulações e do extrato da *S. terebinthifolia*

Cardiomiócitos de rato (linhagem H9C2), cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foram distribuídas em uma placa de microtitulação de 96 poços usando uma densidade de 5×10^5 células/poço e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24h. As células foram tratadas com amostras dissolvidas em RPMI 1% DMSO por 24h, em concentrações variando de 3,91 a 250,00 µg/mL para o extrato bruto (EB), e Benznidazol (BZ). Já para as formulações branco (Branco), e formulação extrato bruto (FEB), as células foram tratadas em concentrações variando de 1,000 a 0,016% v/v. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da sulforodamina B (SRB). Após 24h de incubação, o meio foi removido e as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 20% durante 1 h a 4°C. A placa de microtitulação foi lavada com água destilada e seca. Depois disso, as células fixadas foram coradas durante 30 min com SRB a 0,1% dissolvido em ácido acético a 1%. A placa foi lavada novamente com ácido acético a 1% e deixada secar antes de serem adicionados 200µL de tampão TRIS 10mM (pH 10,5). Isto foi feito à temperatura ambiente durante ~ 30 min. A absorbância da amostra foi lida em 490 nm no espectrofotômetro Tecan i-control do laboratório multiusuário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UFOP e os resultados expressos em porcentagem de viabilidade celular utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1.

4.7 Avaliação da atividade tripanocida

Das sete concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade, foram escolhidas as últimas duas concentrações que apresentaram menos citotoxicidade ou com viabilidade próxima ou acima de 70%.

As células H9C2 foram usadas como modelo de infecção para avaliação de inibição de amastigotas intracelulares. E para tal, foram distribuídas em placas de 16 poços (*chamber slides*), numa densidade de 1×10^4 células/poço e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24h.

Após o período de adesão das células, os parasitos na forma tripomastigota de cultura da cepa Y foram quantificados utilizando a câmara de Neubauer, garantindo uma taxa de infecção de 30:1 (trinta parasitos por célula). O meio de cultura foi removido e substituído por meio

contendo os parasitos na proporção estabelecida, seguido de incubação por 48h nas mesmas condições.

Após a infecção, o meio foi removido e substituído por meio RPMI contendo as amostras dissolvidas em DMSO a 1% v/v. As células foram tratadas por 24h, partindo das duas concentrações menos citotóxicas e mais quatro (4) concentrações de divisor 2 (diluição seriada com fator $\frac{1}{2}$) para as nanoemulsões Branco e FEB (concentrações variando de 0,03125 a 0,00098%v/v).

Fim do período de incubação, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X e deixadas secar. Após a secagem, as lâminas do *chamber slide* foram coradas com panóptico rápido por 10 s; 30 s e 2 s para os corantes 1, 2 e 3 respetivamente em ordem de corante 1 a corante 3.

Após a coloração, foram montadas as lâminas e em seguida fez-se a contagem de células infectadas por 100 células viáveis para determinar a taxa de infectividade e a contagem do número de amastigotas nas células infectadas em 100 células para determinar a taxa de inibição de crescimento, utilizando o microscópio ótico na objetiva de 100x, com óleo de imersão e os resultados foram tabulados e posteriormente analisados no software GraphPad Prism 8.0.1.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o apoio instrumental do software GraFHPad Prism 8.0.1®. (Prism Software, Irvine, CA, USA). Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, Shapiro-Wilk, sendo os dados considerados paramétricos. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados, foram utilizados o teste de variância Anova OneWay e pós-teste de Dunnet. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram inferiores à 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica

Para avaliação dos compostos metabólicos secundários, foi feita uma análise fitoquímica do EB. Esta análise se baseou nas mudanças de cor do extrato e suas partições em contato com os reagentes padrão. O estudo fitoquímico qualitativo revelou a presença de fenóis/taninos, flavonóides e terpenóides no EB, como descrito na Tabela 1. De acordo com Leite et al. (2023), o extrato etanólico obtido das sementes e cascas de *S. terebinthifolia* também apresentou compostos secundários, como flavonoides e taninos. Outro estudo envolvendo extrato hidroalcoólico de folhas e frutos de *S. terebinthifolia* evidenciaram predominância de flavonoides e terpenoides (OLIVEIRA et al. 2020). Nossos dados, corroboram com dados encontrados na literatura, no qual, o EB apresentou positivo para flavonoides, taninos e terpenoides.

Tabela 1: Análise fitoquímica do extrato bruto etanólico de *S. terebinthifolia*

Teste fitoquímico	EB
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Carboidrato	-
Fenóis/Taninos	+
Flavonoides	+
Saponinas	-
Terpenoides	+

+ detectado; – não detectado

5.2 Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular do EB, foi definido como referência a diretriz da normal ISO 10993-5:2009, no qual preconiza que as amostras sejam consideradas

citotóxicas quando a viabilidade celular apresenta valor inferior a 70%. Assim, foi possível determinar dosagens seguras para aplicação deste trabalho. Foram estabelecidas as seguintes concentrações: 1000µg/mL; 500µg/mL; 250µg/mL; 125µg/mL; 62,50µg/mL; 31,25µg/mL; 15,62µg/mL; 7,81µg/mL. Os testes de viabilidade foram feitos em células H9C2 nos tempos de 24 e 48h após tratamento.

Para as células H9C2, no tempo de 24h após tratamento, os resultados indicaram uma baixa citotoxicidade em todas as concentrações testadas (Figura 3A). Já no tempo de 48h após tratamento, apenas as concentrações de 62,50µg/mL; 31,25µg/mL; 15,62µg/mL; 7,81µg/mL apresentaram baixa citotoxicidade (Figura 3B).

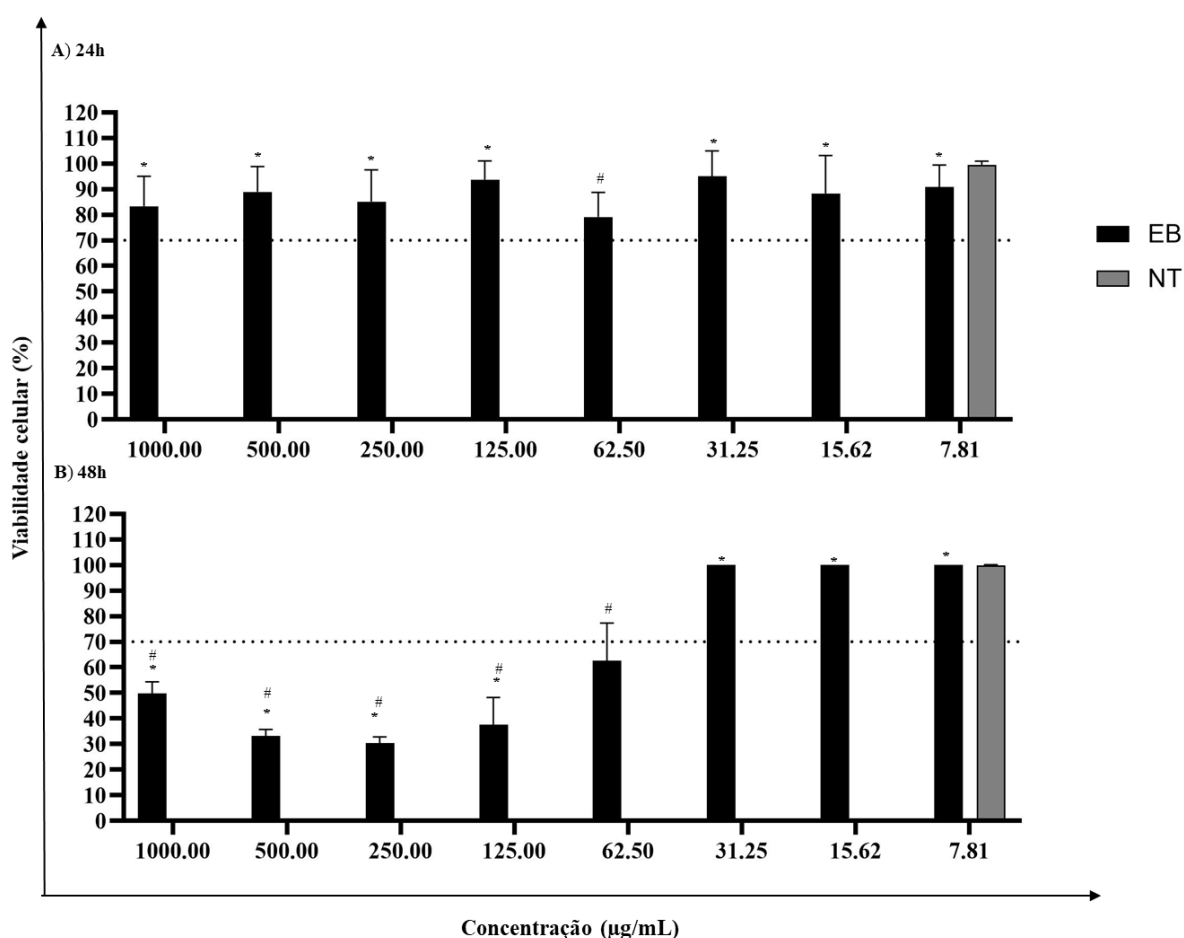


Figura 3: Avaliação da viabilidade celular em células H9C2 tratadas no tempo de 24h. Extrato bruto etanólico 95% de frutos de *S. terebinthifolia* (EB). A) 24h após tratamento; B) 48h após tratamento. Linha pontilhada representação uma viabilidade de 70% (ISO 10993-5:2009). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. *diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a linha pontilhada (70%); # diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NT.

Embora não exista um padrão específico para testes *in vitro*, foram utilizadas células H9c2, cardiomiócitos de origem murina, por representarem de forma mais fiel o tecido cardíaco, principal órgão acometido na doença de Chagas. Diferentemente das células VERO, derivadas do epitélio renal de macaco e amplamente empregadas em estudos por sua fácil manutenção, as H9C2 oferecem maior especificidade para o contexto da infecção. Os resultados de citotoxicidade mostraram que concentrações do extrato bruto (EB) iguais ou inferiores a 62,50 µg/mL apresentaram baixa toxicidade, mantendo alta viabilidade celular, o que indica um bom índice de seletividade do extrato.

5.3 Taxa de infectividade

Com base nos resultados obtidos de viabilidade foram escolhidas as seguintes concentrações: 62,50µg/mL; 31,25µg/mL; 15,62µg/mL; 7,81µg/mL, para análise de infectividade em cepa Y do *T. cruzi*, com EB nos tempos de 24 e 48 horas após tratamento. Foram feitas duas análises: número de células infectadas em 100 células avaliadas e o número de amastigotas encontradas. No tempo de 24h foi observado uma redução significativa do número de células infectadas tratadas com EB em relação ao grupo de células infectadas não tratadas (NT) em todas as concentrações avaliadas (Figura 4A). O mesmo perfil foi observado no tempo de 48h após tratamento (Figura 4B).

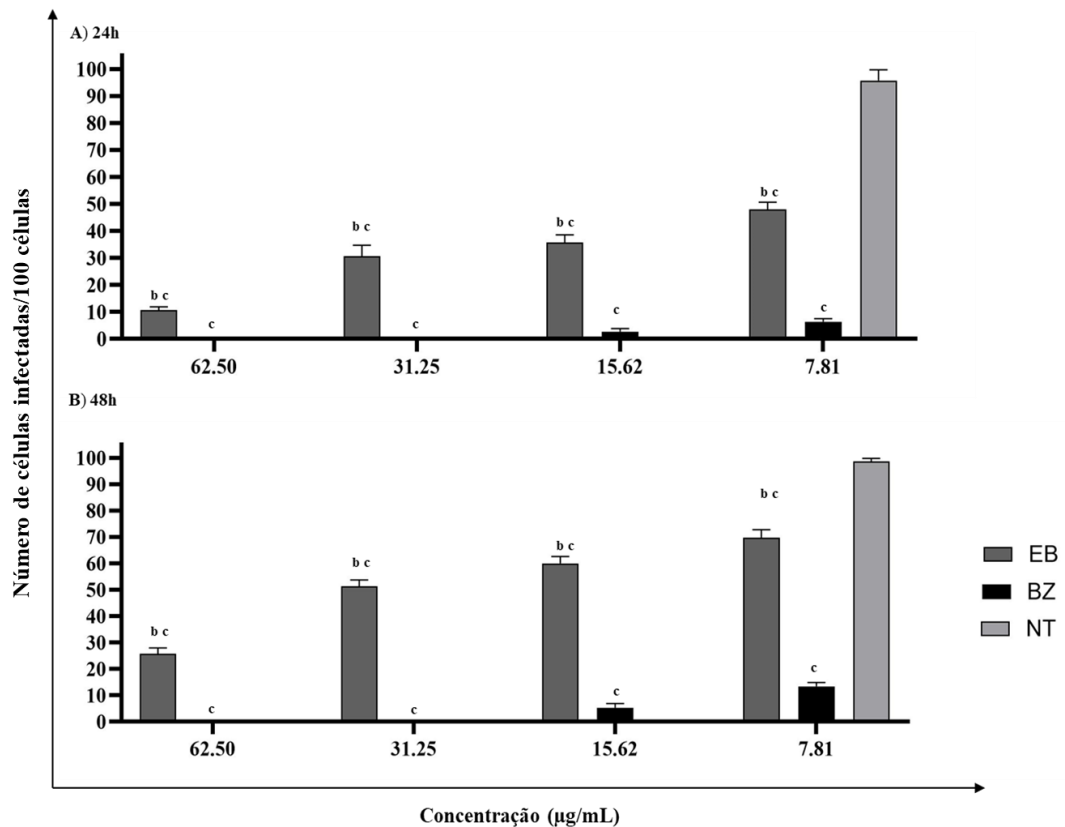


Figura 4: Avaliação da infectividade de células H9C2 com cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. A) 24 horas. B) 48 horas. Extrato bruto etanólico 95% de frutos de *S. terebinthifolia* (EB). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. (a) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a EB; (b) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a BZ; (c) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a NT.

Em relação a análise do número de amastigotas, no tempo de 24h foi observado uma redução significativa nos grupos tratados com EB em relação ao grupo de células infectadas e não tratadas (NT) em todas as concentrações avaliadas (Figura 4A). O mesmo perfil foi observado para o tempo de 48h (Figura 4B).

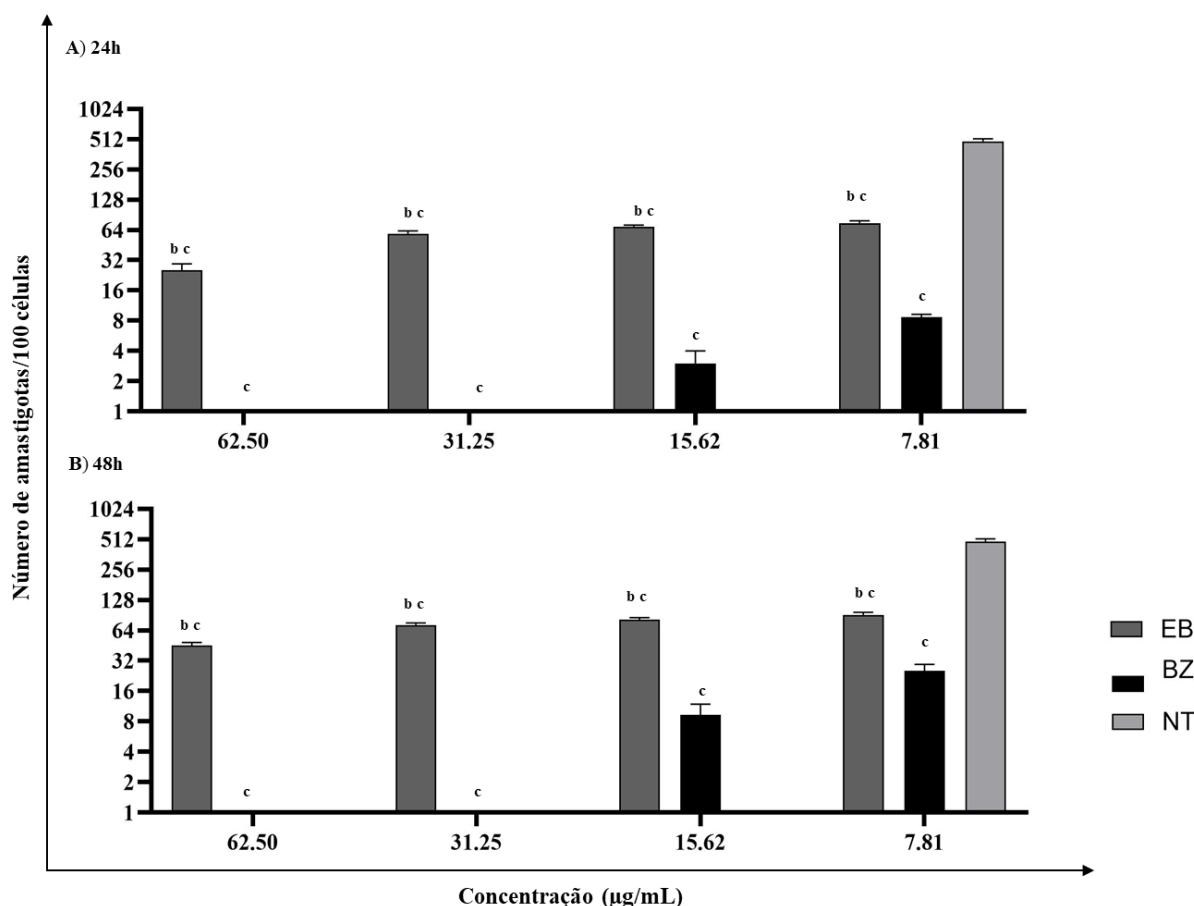


Figura 5: Avaliação número de amastigotas em células H9C2 com cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. A) 24 horas. B) 48 horas. Extrato bruto etanólico 95% de frutos de *S. terebinthifolia* (EB). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. (a) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a EB; (b) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a BZ; (c) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a NT.

Esses achados corroboram com resultados prévios da literatura, como o estudo de MORAIS et al. (2014), que identificou atividade antiparasitária significativa para triterpenoides isolados e derivados semi-sintéticos de pimenta rosa em modelos *in vitro* de *Leishmania* e *T. cruzi*, apontando esses compostos como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. SARTORELLI et al. (2012) também demonstraram que terpenos de óleo essencial de frutos maduros de *S. terebinthifolia* apresentaram atividade tripanocida comparável à do BZ em formas tripomastigotas.

A avaliação da atividade tripanocida e da citotoxicidade dos compostos EB, juntamente com o controle positivo BZ, permitiu uma análise comparativa da eficácia e seletividade dessas substâncias frente à cepa Y. Os parâmetros analisados foram a concentração inibitória média

(IC₅₀), a concentração citotóxica média (CC₅₀) e o índice de seletividade (IS), calculado pela razão entre CC₅₀ e IC₅₀ (tabela 2).

Tabela 2: Valores de CC₅₀, IC₅₀ e índice de seletividade (IS) dos compostos EB e do controle Benznidazol (BZ)

	Tempo (h)	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS (CC ₅₀ / IC ₅₀)
EB	24 h	1000	7,517	132,99
	48 h	190,6	24,49	7,78
BZ	24 h	135,00	1,541	87,58
	48 h	135,00	2,73	49,45

O EB apresentou excelente seletividade no tempo de 24 horas, com um CC₅₀ de 1000 µg/mL e IC₅₀ de 7,517 µg/mL, resultando em um índice de seletividade (IS) de 132,99. No tempo de 48 horas, embora tenha ocorrido uma redução na viabilidade celular (CC₅₀ = 190,6 µg/mL), o composto ainda manteve um IS de 7,78 com IC₅₀ de 24,49 µg/mL. Já o BZ apresentou CC₅₀ em ambos os tempos de 135 µg/mL, sendo IC₅₀ de 1,541 µg/mL em 24h e 2,73 µg/mL em 48h. Com isso, o IS do BZ reduziu em relação ao tempo avaliando, sendo de 87,58 em 24h e 49,45 em 48h.

5.4 Caracterização das formulações

5.4.1 Tamanho da partícula, Potencial Zeta e Índice de polidispersão

A escolha pela formulação nanoemulsionada permite aumentar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade dos compostos ativos deste estudo, facilitando sua aplicação e potencializando sua atividade biológica. Após o desenvolvimento das formulações: BRANCO (excipientes) e FEB (extrato bruto de pimenta rosa). Ao avaliar estabilidade da formulação, os resultados mostraram que o tamanho médio das partículas permaneceu estável durante o período avaliado, indicando manutenção da integridade física da formulação. O índice de polidispersão manteve-se abaixo de 0,3 em todas as análises, o que indica uma distribuição homogênea e monodispersa das partículas, enquanto valores acima de 0,7 indicam ampla dispersão no tamanho das partículas (CHANG et al., 2015; MIRSHARIFI et al., 2023). O potencial zeta apresentou valores absolutos superiores a 30 mV, sugerindo alta estabilidade eletrostática da nanoemulsão, o que minimiza a tendência de agregação e floculação das partículas. As formulações nanoemulsionadas apresentaram características físico-químicas desejáveis, como diâmetro médio de partícula inferior a 150nm, índice de polidispersão (PDI) inferior a 0,3 e potencial zeta absoluto superior a 30mV após 60 dias de armazenamento, indicando elevada estabilidade, assim como previamente demonstrado por Lin et al. (2021) em nanoemulsões de óleos essenciais. Tal estabilidade é requisito fundamental para aplicação farmacêutica, conforme discussão de Donsì e Ferrari (2016), que enfatizam a importância dessas propriedades para garantir consistência biológica e segurança das formulações.

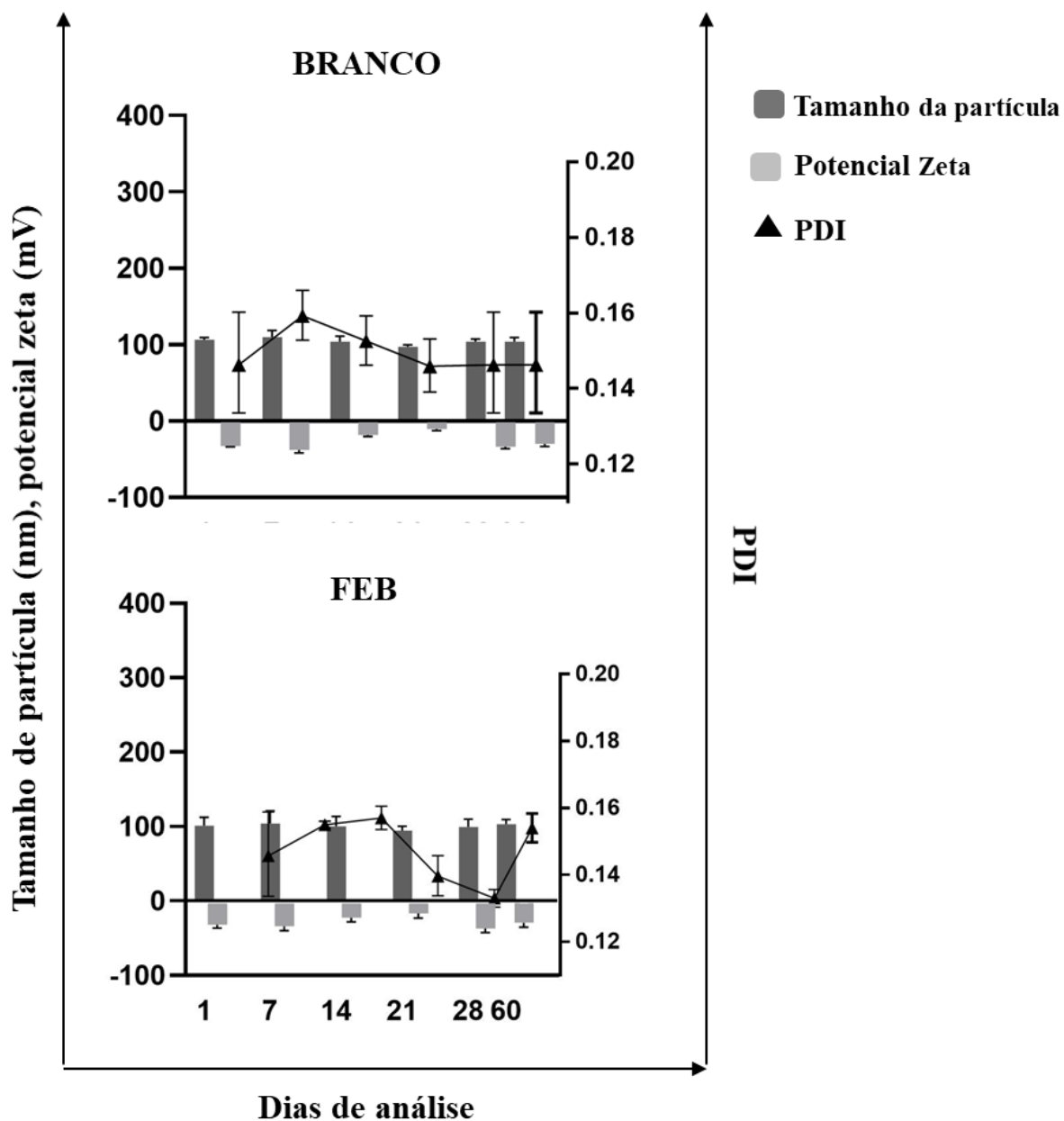


Figura 6: Análise de tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. A) Formulação branco; B) Formulação com extrato bruto 95% de pimenta rosa (FEB). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão.

5.4.2 Comportamento reológico da formulação

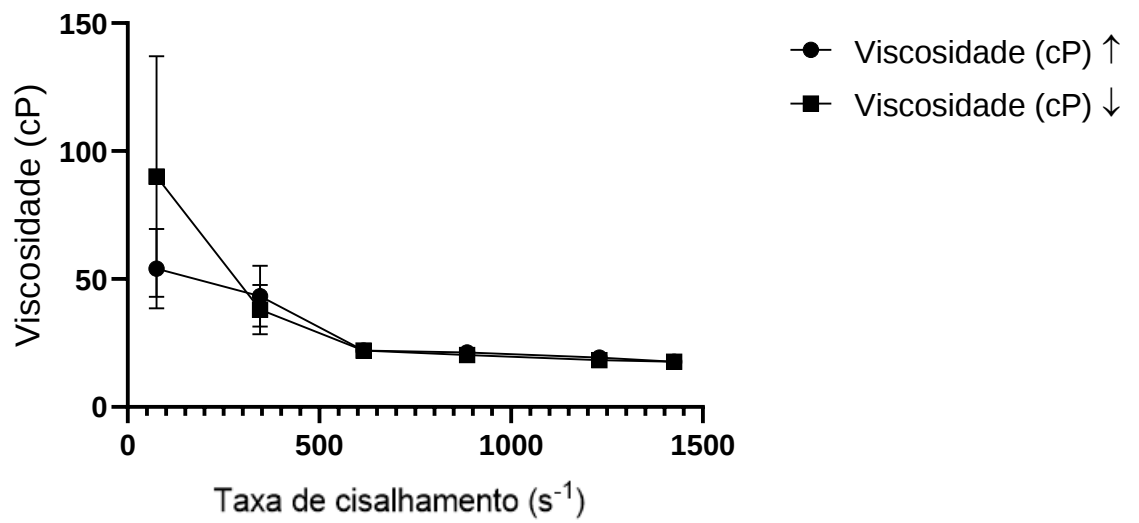
A avaliação do comportamento reológico permitiu identificar o comportamento pseudoplástico das formulações, além de monitorar possíveis alterações na viscosidade ao longo do tempo de estocagem, indicando a estabilidade física da nanoemulsão.

As análises reológicas realizadas nas duas formulações de nanoemulsões (Branco e FEB) – evidenciaram que todas apresentaram comportamento pseudoplástico, caracterizado pela diminuição da viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumentava. Esse perfil é típico de sistemas coloidais como as nanoemulsões (SOUSA et al., 2024). Observou-se que FEB apresentou viscosidades iniciais mais elevadas, com valores variando aproximadamente de 118 a 360 mPa·s nas menores velocidades, indicando maior resistência ao fluxo. Esse aumento da viscosidade pode ser atribuído à presença de compostos bioativos e partículas do extrato, que promovem interações mais intensas entre as fases da nanoemulsão (SOLANS; SOLÉ, 2012) (SILVA; CUNHA, 2017). A formulação controle Branco exibiu viscosidades iniciais intermediárias, variando de 17 a 122 mPa·s, com valores geralmente inferiores aos observados na FEB.

De modo geral, a viscosidade mais elevada da FEB sugere que os componentes do extrato influenciam de forma significativa a estrutura interna do sistema, aumentando sua resistência ao fluxo em baixas taxas de cisalhamento. A Branco apresentou viscosidade menor, indicando menor interação entre as fases. Assim, os resultados apontam que a adição do extrato bruto confere maior viscosidade e estrutura à nanoemulsão, o que pode impactar positivamente a estabilidade e a aplicação do produto final. Os dados reológicos obtidos demonstram, portanto, a influência dos componentes da formulação sobre as propriedades físicas das nanoemulsões, sendo fundamentais para o desenvolvimento e otimização do sistema proposto.

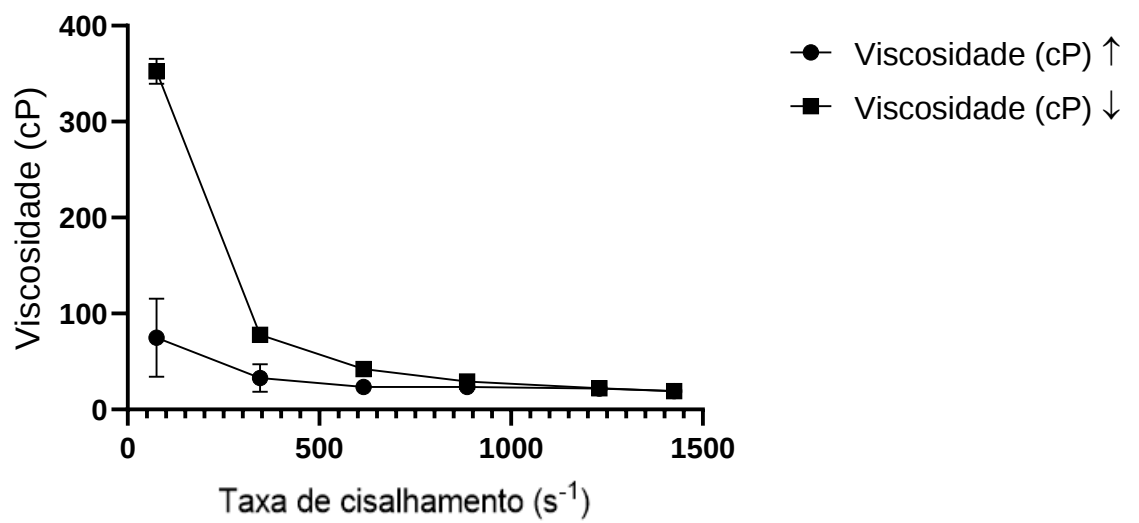
A

Viscosidade Formulação Branco



B

Viscosidade Formulação Extrato bruto



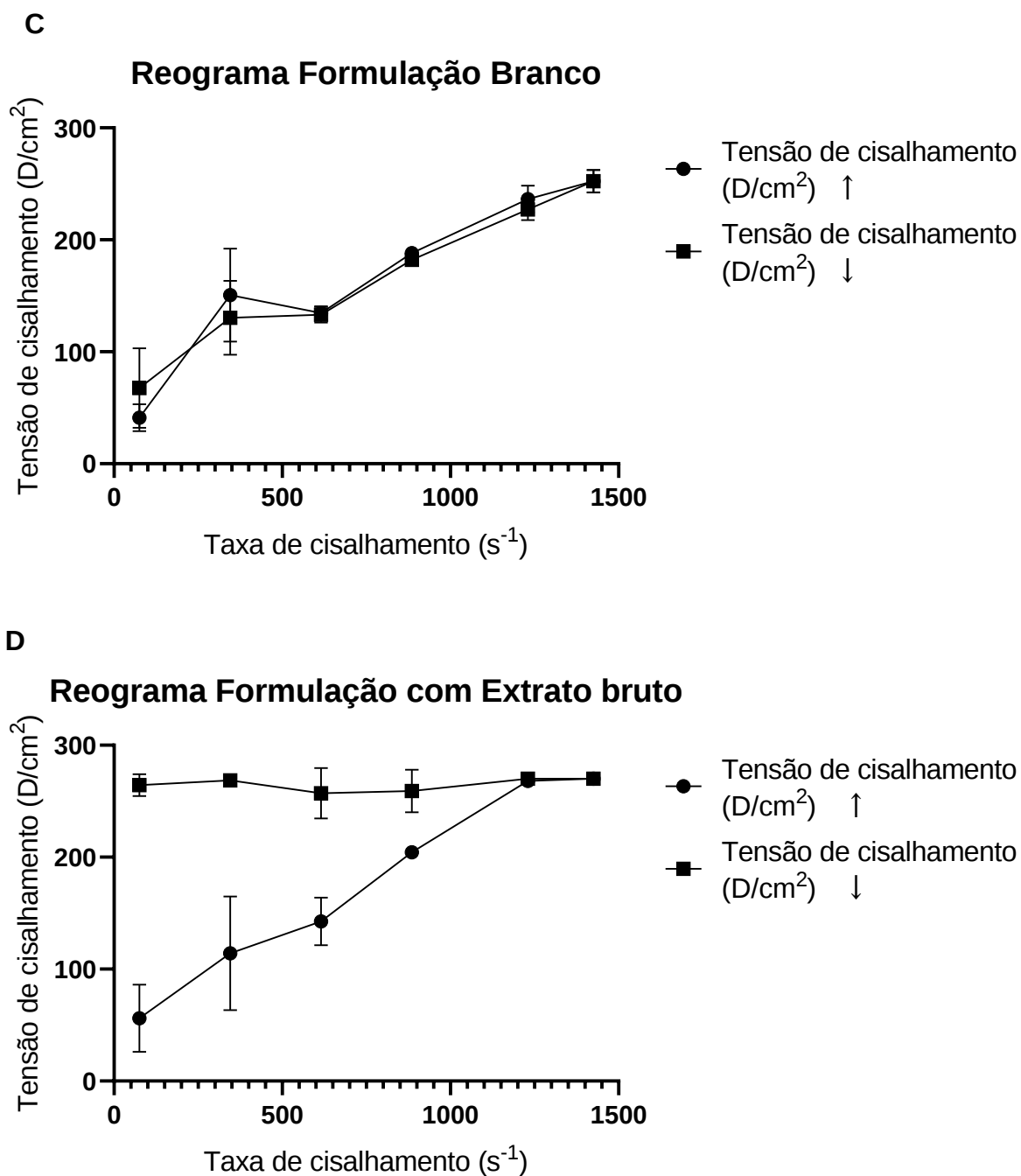


Figura 7: Curva de fluxo de cisalhamento constante representativa da formulação Branco (A) e da FEB (B); reograma representativo da formulação Branco (C) e do FEB (D). Setas indicam a direção do fluxo da leitura, indo e voltando. Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão.

5.5 Viabilidade Celular

Para a interpretação dos resultados, foi adotado como referência o critério estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009, que considera amostras citotóxicas quando a viabilidade celular é inferior a 70%. Com base nesse parâmetro, foi possível determinar concentrações seguras para aplicação, estabelecendo-se as seguintes faixas para os ensaios:

Com relação as formulações, tanto a nanoemulsão contendo extrato bruto FEB quanto a nanoemulsão controle Branco apresentaram perfis de viabilidade celular semelhantes. Conforme ilustrado na Figura 8, observou-se que, nas concentrações mais baixas ($\leq 0,016\%$ v/v), as formulações tenderam a viabilidade celular acima de 70%, não sendo consideradas citotóxicas segundo a norma ISO. Sendo citotóxicas nas concentrações mais elevadas ($>0,031\%$ v/v). Os dados mostram assim, um perfil citotóxico da nanoemulsão de maneira geral.

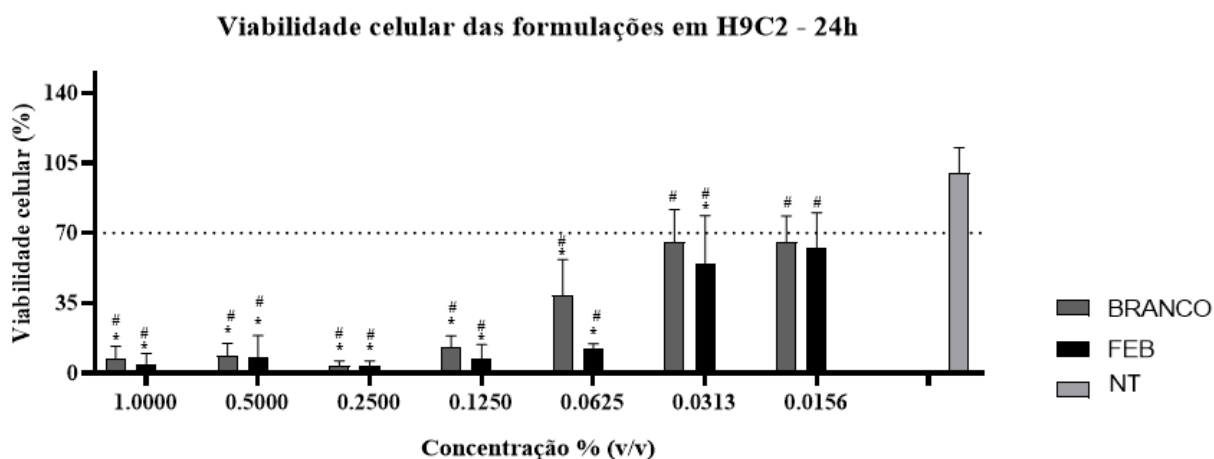


Figura 8: Avaliação da viabilidade celular em células H9C2 tratadas no tempo de 24h com as diferentes formulações. Nanoemulsão do extrato bruto etanólico 95% de frutos de *S. terebinthifolia* (FEB); Nanoemulsão branco (Branco). Linha pontilhada representação uma viabilidade de 70% (ISO 10993-5:2009). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. *diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a linha pontilhada (70%); # diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NT.

5.6 Atividade tripanocida

A seleção das concentrações testadas para a avaliação da atividade tripanocida foi fundamentada nos resultados do ensaio de viabilidade celular em cardiomiócitos H9C2,

conforme recomenda a norma ISO 10993-5:2009. Assim, partindo das duas concentrações menos citotóxicas de 0,03125 e 0,01563% v/v, e mais quatro (4) concentrações de divisor 2 (diluição seriada com fator $\frac{1}{2}$) de 0,00781; 0,00391; 0,00195 e 0,00098% v/v das nanoemulsões de FEB e BRANCO foram escolhidas por estarem mais próximas da viabilidade celular adequada.

Após definição dessas concentrações, procedeu-se à análise da atividade tripanocida das formulações. A avaliação considerou dois parâmetros. O primeiro, percentual de células infectadas em 100 células avaliadas, refletindo a taxa de infectividade. O segundo, número de amastigotas por célula infectada em cada amostra, indicador de replicação intracelular do parasito.

No intervalo de 48h, observou-se que as formulações de FEB e BRANCO apresentaram um número significativamente menor de células infectadas em relação ao controle de células infectadas não tratadas (NT), com diferença estatística relevante.

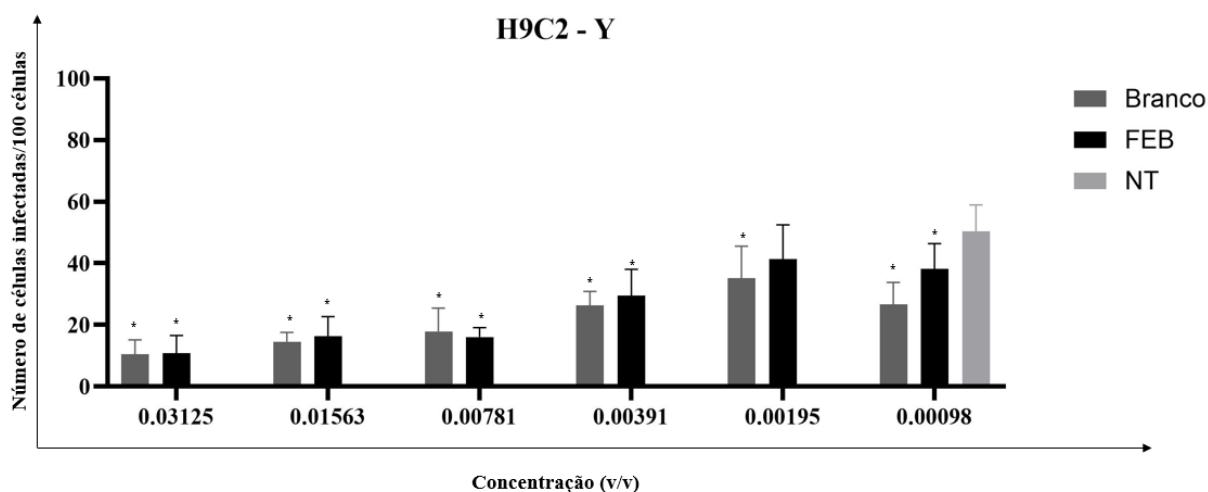


Figura 9: Avaliação da infectividade de células H9C2 com cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Formulação contendo extrato bruto etanólico 95% de frutos de pimenta rosa (FEB) Formulação contendo polímeros (BRANCO). Células infectadas e não tratadas (NT). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. (*) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NT.

Em relação a análise do número de amastigotas, foi observado um padrão semelhante para o número de amastigotas nos grupos tratados com FEB e BRANCO em relação às células infectadas não tratadas (NT), no tempo de 24h.

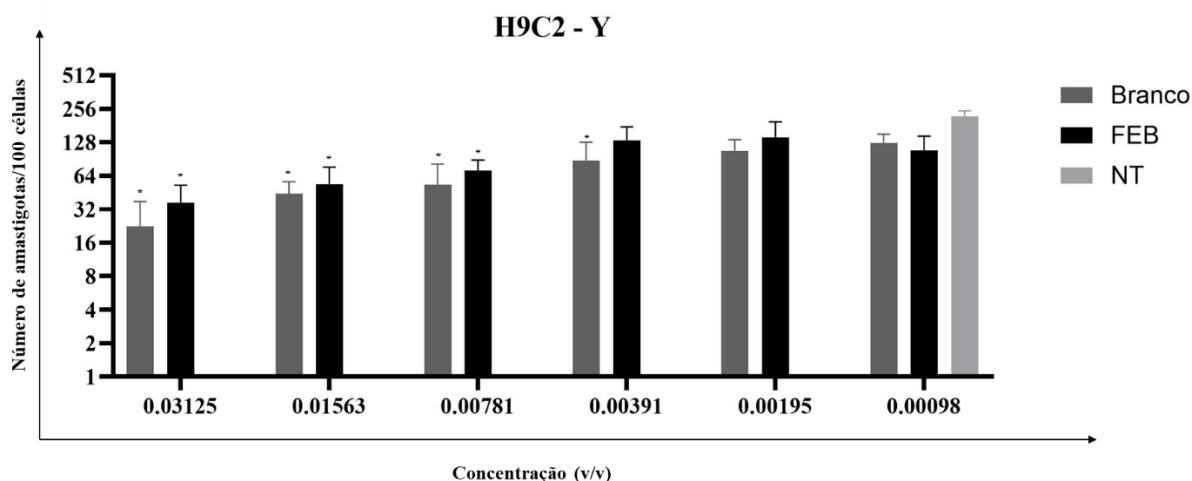


Figura 10: Avaliação do número de amastigotas por 100 células H9C2 com cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Formulação contendo extrato bruto etanólico 95% de frutos de pimenta rosa (FEB) Formulação contendo polímeros (BRANCO). Células infectadas e não tratadas (NT). Os dados estão representados como Média $\pm$ Erro Padrão. (*) diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NT

Estes resultados corroboram achados de estudos prévios que evidenciam a eficácia de extratos e frações de *S. terebinthifolia* contra diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, reforçando seu potencial como fonte de moléculas bioativas para desenvolvimento de fármacos antiparasitários. Além disso, a formulação em sistemas como nanoemulsões proporciona melhor solubilidade, estabilidade e entrega dos princípios ativos, favorecendo a seletividade contra o parasito e a redução da toxicidade às células hospedeiras (SILVA et al., 2017; DURO et al., 2022; COURA & CASTRO, 2020)

6 CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a atividade tripanocida *in vitro* do extrato bruto dos frutos de *S. terebinthifolia*, reforçando o potencial de compostos naturais como fonte de novos agentes farmacológicos, especialmente no combate ao *T. cruzi*. Os achados demonstraram que, apesar da eficácia significativa observada contra o parasita, a formulação apresentou toxicidade o que constitui uma limitação relevante para sua aplicação direta. Nesse sentido, destaca-se a necessidade de novos estudos que busquem estratégias de formulação capazes de conciliar eficácia terapêutica e segurança toxicológica, de modo a viabilizar o uso desse recurso natural como alternativa promissora no tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2023.
- AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 17, n. 1, p. 26–35, mar. 2015.
- BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 63:215-220, 1969.
- CARNEIRO, Mara Junqueira. Composição química e atividades biológicas de extratos etanólicos e óleos essenciais de "*Schinus terebinthifolius*" Raddi. 2021. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.
- CHAO, Chen; LEONE, José L.; VIGLIANO, Carlos A. Chagas disease: historic perspective. Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease, [S.L.], v. 1866, n. 5, p. 165689, maio 2020. Elsevier BV, 2020.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.
- DA ROCHA, Cláudia Quintino et al. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Journal of Natural Products, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014.
- DE SOUZA MACÊDO, Thaís Lemos et al. Análise do perfil epidemiológico da Doença de Chagas no Brasil. Período entre 2001 e 2018. Revista de Saúde, v. 12, n. 3, p. 42-49, 2021.
- DIAS, João Carlos Pinto et al. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 25, p. 87-90, 2016.

DURÃO, Raquel; RAMALHETE, Cátia; MADUREIRA, Ana Margarida; MENDES, Eduarda; DUARTE, Noélia. Plant Terpenoids as Hit Compounds against Trypanosomiasis. *Pharmaceuticals*, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 340, 10 mar. 2022

FALCÃO, M. P. M. M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 2, p. 23, 9 dez. 2015.

KRATZ, Jadel Müller. Drug discovery for chagas disease: a viewpoint. *Acta Tropica*, [S.L.], v. 198, p. 105107, Elsevier BV, 2019

LASCANO, Fernanda; BOURNISSEN, Facundo García; ALTCHER, Jaime. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, [S.L.], v. 88, n. 2, p. 383-402, 6 jan. 2021

LEMO DE SOUZA MACEDO, T.; MARQUES DOS SANTOS, S. C.; BAPTISTA DOS REIS ROSA, R.; MOREIRA VIEIRA, P.; TEIXEIRA DOS SANTOS, C.; PICONE BORGES DE ARAGÃO, I. Análise do perfil epidemiológico da Doença de Chagas no Brasil. Período entre 2001 e 2018. *Revista de Saúde*, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 42–49, 2021. Disponível em: <https://editora.univassouras.edu.br/index.php/RS/article/view/2514>. Acesso em: 23 mar. 2025.

LIMA, M. S. et al. Antitrypanosomal activity of essential oils: a review. *Parasitology Research*, v. 118, p. 1661–1678, 2019.

MACHADO, F. S., et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(6), 753–770, 2012.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.

MINISTÉRIO DA. SAÚDE (2016). Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Política e Programa nacional do SUS.

MORAIS, T. et al. Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules*, v. 19, n. 5, p. 5761–5776, 5 maio 2014.

RASSI, Anis et al. Chagas disease. *The Lancet*, Volume 375, Issue 9723, 1388 – 1402, 2010.

REY, Luís. Parasitologia, 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. E-book. p.1. ISBN 978-85-277-2027-4. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2027-4/>. Acesso em: 09 jun. 2025.

ROCHA, Cláudia Quintino da; QUEIROZ, Emerson Ferreira; MEIRA, Cássio Santana; MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhães; SOARES, Milena Botelho Pereira; MARCOURT, Laurence; VILEGAS, Wagner; WOLFENDER, Jean-Luc. Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *Journal Of Natural Products*, [S.L.], v. 77, n. 6, p. 1345-1350, American Chemical Society (ACS), 2014

SANTOS, D. O. et al. Plant-derived compounds with potential use against *Trypanosoma cruzi*: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, p. 691–727, 2020.

SILVA, A. C.; CUNHA, L. C. Nanoemulsões como sistemas de liberação de fármacos: propriedades, métodos de preparação, aplicações e desafios. *Química Nova*, v. 40, n. 4, p. 447-457, 2017.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo. Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2020. E-book. ISBN 9788527736473. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527736473/>. Acesso em: 26 set. 2024.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation, properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

SOUSA, Lucas Resende Dutra et al. Nanoemulsified Essential Oil of *Melaleuca leucadendron* Leaves for Topical Application: *In Vitro* Photoprotective, Antioxidant and Anti-Melanoma Activities. *Pharmaceuticals*, v. 17, n. 6, p. 721, 2024.

VASCONCELOS, Priscilla Guimarães Silva et al. Biological properties of *Schinus terebinthifolia* Raddi essential oil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, p. e20417, 2022.

SOUZA, Rafaella Ribeiro; GASPAROTI, Pabline Silva; DE PAULA, Joelma Abadia Marciano. Obtenção de extratos de plantas medicinais: uma revisão de escopo dos métodos extrativos modernos em comparação ao método clássico por SOXHLET. *Movimenta*, v. 15, n. 1, p. e20220013-e20220013, 2022.

ESTEVAM, Elisângela Barbosa Borges et al. Composição química, atividades anti-*Trypanosoma cruzi* e citotóxica do óleo essencial dos frutos verdes de *Protium ovatum* (BURSERACEAE). Revista Brasileira de Fruticultura, v. 40, p. e-794, 2018.

CARNEIRO, N. S. et al. Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): composição química e atividades tripanocida e citotóxica *in vitro*. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 3, p. 1381-1392, 2017.

DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira. *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*: Revisão sistemática da classificação, e aspectos químicos, fitoquímicos, biológicos e farmacobotânicos. Brazilian Journal of Natural Sciences, v. 3, n. 3, p. 490-490, 2020.

DE VOS, Ric CH et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nature protocols, v. 2, n. 4, p. 778-791, 2007.

SARTORELLI, Patricia et al. *In vitro* trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Química Nova, v. 35, p. 743-747, 2012.

PACHECO, Luciano Vasconcellos et al. Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. Research, Society and Development, v. 10, n. 2, p. e31910212636-e31910212636, 2021.

DE MACÊDO, Penelopy Rodrigues; LEMOS, Joana Thamyres Silva; DOS SANTOS, Izabella Oliveira. Práticas terapêuticas no combate à Doença de Chagas no Brasil: um estudo atual. Brazilian Journal of Health Review, v. 6, n. 5, p. 26490-26510, 2023.

HASSLOCHER-MORENO, Alejandro Marcel. Por Que Tratar Formas Crônicas da Doença de Chagas com Benzonidazol se as Reações Adversas são Muito Frequentes? Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 121, n. 8, p. e20240426, 2024.

AZEREDO, Camila Maria O. et al. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. BMC complementary and alternative medicine, v. 14, n. 1, p. 309, 2014.

MASYITA, Ayu et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. Food chemistry: X, v. 13, p. 100217, 2022.

SILVA, Matheus L. et al. Fenilpropanoides com ação anti-*Trypanosoma cruzi* isolados de *Baccharis ligustrina* C. DC. (Asteraceae). Química Nova, v. 46, n. 1, p. 39-42, 2023.