

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

Maria Antônia Bastos de Oliveira

**Avaliação do efeito da combinação entre protolimonoides, provenientes do extrato etanólico de *Guarea kunthiana*, frente a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.**

**CAMPO GRANDE-MS**

**2021**

Maria Antônia Bastos de Oliveira

**Avaliação do efeito da combinação entre protolimônoides, provenientes do extrato etanólico de *Guarea kunthiana*, frente a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal de Mato Grosso do  
Sul, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria  
Teixeira Ferreira

**CAMPO GRANDE-MS**

**2021**

## **Sumário**

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                     | <b>4</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                | <b>6</b>  |
| <b>Objetivo.....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>METODOLOGIA .....</b>                               | <b>8</b>  |
| <b>Cultura de Trypanosoma cruzi.....</b>               | <b>8</b>  |
| <b>Ensaio de Viabilidade Celular .....</b>             | <b>8</b>  |
| <b>Ensaio de Combinação.....</b>                       | <b>8</b>  |
| <b>Determinação do Índice de Combinação (IC) .....</b> | <b>9</b>  |
| <b>Análise Estatística.....</b>                        | <b>9</b>  |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                 | <b>9</b>  |
| <b>Ensaio de Viabilidade .....</b>                     | <b>9</b>  |
| <b>Índice de Combinação .....</b>                      | <b>10</b> |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                                 | <b>12</b> |
| <b>CONCLUSÃO .....</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                             | <b>14</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                 | <b>15</b> |

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), é um protozoário parasita pertencente à Família Tripanosomatidae, e é o agente etiológico da Doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana (Coura, 2002). Segundo a *Pan American Health Organization* (2021), a DC, uma doença negligenciada, ainda afeta de 6 a 8 milhões de pessoas nas Américas. No Brasil, o tratamento referência é feito com o Benznidazol, o qual, no entanto, não apresenta boa eficácia, principalmente, na fase crônica da doença (Andrade, 1996; Coura, 2002). Dessa maneira, percebe-se a necessidade de se buscar novos compostos ativos com potencial para inviabilizar tais parasitas. Nesse sentido, sabe-se da existência de atividade biológica relacionada com limonoides e protolimonoides encontrados em grupos pertencentes a Família Meliaceae, como a espécie *Guarea kunthiana*. (Roy & Saraf, 2006; Da Cruz, 2020). Assim, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito da combinação de dois protolimonoides (3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol e Melianol) provenientes do extrato etanólico dos frutos dessa planta, sobre o crescimento *in vitro* de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Para isso, foi realizado um ensaio de combinação com quatro concentrações de cada protolimonóide, as quais foram definidas com base na CI<sub>50</sub> individual dos compostos. A viabilidade celular dos parasitas foi determinada por meio de um ensaio de MTS (Henriques et. al, 2011), durante 24h. Além disso, foi feita a determinação do índice de combinação (IC) dos compostos, para posterior classificação de sinergismo segundo Chou (2006). Então, foi visto que os protolimonoides 3 e 5 apresentam efeito sinérgico em combinação, o qual potencializa a atividade de cada composto sobre o crescimento *in vitro* de *T. cruzi*. Os resultados obtidos por esse estudo são novidade na literatura, e com certeza, podem contribuir com a busca de novas possibilidades de tratamentos para a Doença de Chagas.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) is a parasitic protozoan belonging to the Tripanosomatidae family and is the etiological agent of Chagas Disease or American Trypanosomiasis (Coura, 2002). According to the Pan American Health Organization (2021), CD, a neglected disease, still affects 6 to 8 million people in the Americas. In Brazil, the reference treatment is made with Benznidazole which, however, is not highly effective, especially in the chronic phase of the disease (Andrade, 1996; Coura, 2002). Thus, there is a need to look for new active compounds with the potential to make the parasites unfeasible. This way, it is known of the existence of biological activity related to limonoids and protolimonoids found in groups belonging to Meliaceae, such as the species *Guarea kunthiana*. (Roy & Saraf, 2006; Da Cruz, 2020). Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of the combination of two protolimonoids (3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol and Melianol) from the ethanol extract of the fruits of this plant, at in vitro growth of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Thus a combination assay was performed with four concentrations of each protolimonoid which were defined based on the individual IC<sub>50</sub> of the compounds. The cell viability of the parasites was determined employing an MTS assay (Henriques et. al, 2011) for 24h. In addition, the combination index (CI) of the compounds was determined, for later classification of synergism according to Chou (2006). Then, it was seen that protolimonoids 3 and 5 have a synergistic effect in combination, which enhances the activity of each compound on the in vitro growth of *T. cruzi*. The results obtained by this study are new in the literature, and they can certainly contribute to the search for new treatment possibilities for Chagas disease.

## INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) é um protozoário flagelado parasita, pertencente a Ordem Kinetoplastida e a Família Trypanosomatidae. Além disso, é o agente etiológico da Doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana (Coura, 2002). Segundo a *Pan American Health Organization* (2021), a DC afeta de 6 a 8 milhões de pessoas nas Américas, sendo a causa da morte de mais de 10.000 pessoas por ano.

O tratamento para a DC, no Brasil, é feito com o Benzonidazol até hoje, o qual apresenta uma boa eficácia na fase aguda da doença, no entanto não se mostra tão efetivo durante a fase crônica. Além disso, é um medicamento que costuma provocar muitas reações adversas, como erupções cutâneas, dores articulares e musculares, febre, edemas, entre outros. (Andrade, 1996; Coura, 2002).

Dessa maneira, percebe-se a necessidade de se buscar novos compostos ativos com potencial para inviabilizar os parasitas. Em vista disso, sabe-se também que as plantas vasculares são capazes de produzir uma série de compostos potencialmente ativos contra uma diversidade de parasitas, incluindo o *T. cruzi* (Phillipson & Wright 1991). Assim, diversos estudos com compostos derivados de extratos vegetais já demonstraram boa atividade anti-tripanosomatídeos, *in vitro* e *in vivo* (Mafezoli et. al, 2000; Cordeiro et. al, 2017; Gonçalves-Santos, 2019).

Nessa perspectiva, é válido considerar o fato de o Brasil possuir um dos *hotspots* globais de biodiversidade, o Cerrado, por ser um bioma que comporta aproximadamente 4.800 espécies de plantas e animais vertebrados endêmicas, isto é, que não ocorrem em nenhum outro lugar. Isso implica, em um bioma capaz de oferecer uma infinidade de serviços ecossistêmicos que beneficiam os seres humanos, dentre eles, a possibilidade de se encontrar compostos com potencial terapêutico (Strassburg et al, 2017).

Dessa forma, a Família Meliaceae é um grupo botânico - que pode ser encontrado no Cerrado – o qual, têm apresentado compostos com resultados promissores contra o *Trypanosoma cruzi* (Ambrozin, 2004; Leite et al, 2010). Tal bioatividade tem sido relacionada a classes de compostos denominadas protolimonoides e limonoides, que ocorrem em abundância nessa família (Roy & Saraf, 2006).

Nesse sentido, nosso grupo vem estudando a espécie *Guarea kunthiana*, pertencente a essa família, e verificou que o extrato etanólico dos frutos dessa planta possui uma atividade biológica frente as formas replicativas e infectivas de *T.cruzi*, atividade essa concentrada nas fases hexânica e diclorometânica, o que resultou no isolamento de seis protolimonoides. A partir disso, Da Cruz (2020) realizou ensaios com os protolimonoides ativos, sobre formas replicativas do parasito. Os dados do referido ensaio mostraram que todos os compostos testados foram ativos, sendo o Melianol (protolimonóide 5) o mais ativo sobre formas epimastigotas e tripomastigotas. Enquanto, o 3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol (protolimonóide 3), apesar de ser efetivo contra *T. cruzi*, apresentou umas das mais baixas atividades entre os demais e foi considerado possivelmente hepatotóxico, a partir de ensaios *in silico* (Da Cruz, 2020).

Então, tais resultados estimularam nosso interesse em investigar um possível efeito sinérgico entre os compostos 3 e 5, visto que vários estudos têm mostrado bons resultados derivados da combinação entre drogas. Algumas das vantagens apresentadas, decorrentes do uso do sinergismo entre os compostos - considerando que esses possam vir a ser opções para o desenvolvimento de futuras drogas - são o aumento das taxas de cura, diminuição de efeitos colaterais e um menor tempo de tratamento (COGO et. al, 2012; Strauss, 2018; Gonçalves-Santos et. al, 2019).

Isso posto, o presente estudo irá avaliar o efeito da combinação dos protolimonoides 3 e 5, sobre o crescimento *in vitro* de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

## Objetivo

- Avaliar o efeito *in vitro* da combinação entre os compostos 3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol e o Melianol, sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

## METODOLOGIA

### Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Os experimentos foram realizados com formas epimastigotas de *T. cruzi*, pertencentes a cepa Dm28c, cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal), em temperatura constante de 28 °C. A fim de manter o crescimento exponencial dos parasitas, foram feitos repiques da cultura utilizada a cada três dias.

### Ensaio de Viabilidade Celular

Foi realizado um ensaio de viabilidade celular com MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium bromide) (Henriques et. al, 2011), num período de 24h, a fim de obter a viabilidade dos parasitas tratados com os dois compostos, separadamente e obter o valor da  $CI_{50}$  desses. Para isso, cada protolimonóide foi diluído em PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*) para obtenção das concentrações a serem utilizadas – 133; 66; 33; 16,6; 8,3 µg/mL. Foram usados então, um total de cinco concentrações de cada composto, sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, a uma concentração de  $1 \times 10^7$  parasitas/mL, em uma placa de 96 poços. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

### Ensaio de Combinação

O ensaio de combinação foi realizado utilizando três concentrações de cada protolimonóide, as quais foram definidas com base na  $CI_{50}$  individual dos compostos. A viabilidade celular dos parasitas foi determinada por meio do ensaio de MTS.

Cada composto foi previamente diluído em DMSO 100% e, em seguida, em PBS 1X, para obtenção das concentrações finais – 133, 66 e 33 µg/mL para cada protolimonóide - que foram combinadas nas proporções 1:1, 1:3 e 3:1 (PROTOLIMONOIDE 3:PROTOLIMONOIDE 5), e testadas sobre o crescimento *in vitro* de *T. cruzi*.



Para isso, foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial, incubadas em meio LIT em uma placa de 96 poços, a uma concentração igual a  $1 \times 10^7$  parasitas/mL. Então, os compostos em combinação foram adicionados e a cultura foi mantida a 28° C durante 24h. O controle foi feito com os parasitas também em meio LIT e PBS 1X, porém, sem a adição dos compostos combinados. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata.

### **Determinação do Índice de Combinação (IC)**

O índice de combinação (IC) foi calculado pela razão entre a concentração de um composto na combinação e em tratamento isolado. A partir dos valores de  $CI_{25-75}$  obtidos anteriormente, foram calculadas as concentrações dos protolimonoides 3 e 5 presentes em cada combinação. Para tanto, cada valor de CI foi multiplicado pelo número de partes correspondente a um dos compostos ( $P^{prot.3}$  ou  $P^{prot.5}$ ), nas diferentes proporções utilizadas, e dividido pelo número total de partes da combinação.

A média dos valores de IC obtidos foi calculada para cada combinação, com o intuito de fazer a classificação segundo Chou (2006), em: 0,1-0,3 (forte sinergismo); 0,3-0,7 (sinergismo); 0,7-0,85 (sinergismo moderado); 0,9-1,1 (quase aditivo). Por fim, os dados foram demonstrados em um isoblograma.

### **Análise Estatística**

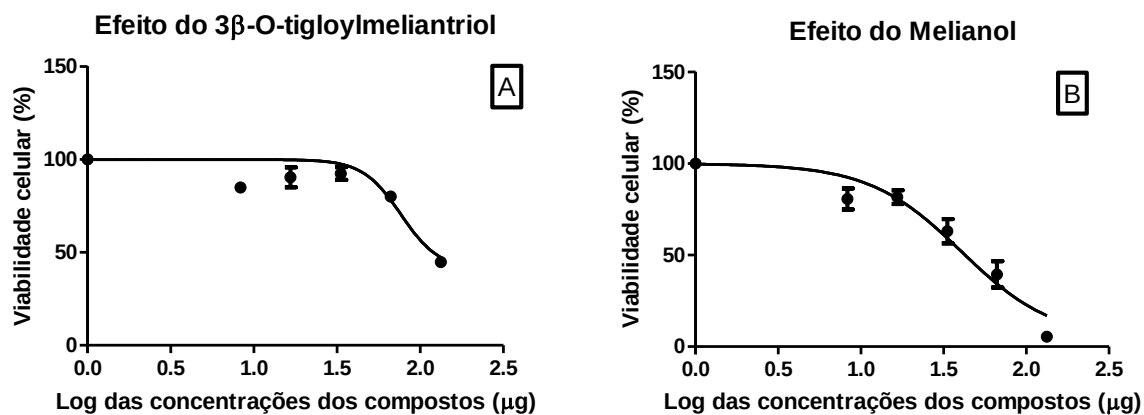
A determinação dos valores de  $CI_{25-75}/24h$  foi realizada por meio da curva de regressão não linear pelo software GraphPad Prism 7.04.

## **RESULTADOS**

### **Ensaio de Viabilidade**

Os dois protolimonoides apresentaram atividade contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*. No entanto, o Melianol (protolimonóide 5) foi o mais ativo

( $Cl_{50}/24h = 40,51\mu g/mL$ ), em relação ao 3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol ( $Cl_{50}/24h = 76,63\mu g/mL$ ).



**Figura 1.** Efeito dos protolimonoides 3 e 5 em diferentes concentrações sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (A) 3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol (protolimonóide 3), com  $Cl_{50}/24h = 76,63\mu g/mL$  ( $R^2 = 0,90$ ); (B) Melianol (protolimonóide 5), com  $Cl_{50}/24h = 40,51\mu g/mL$  ( $R^2 = 0,80$ ).

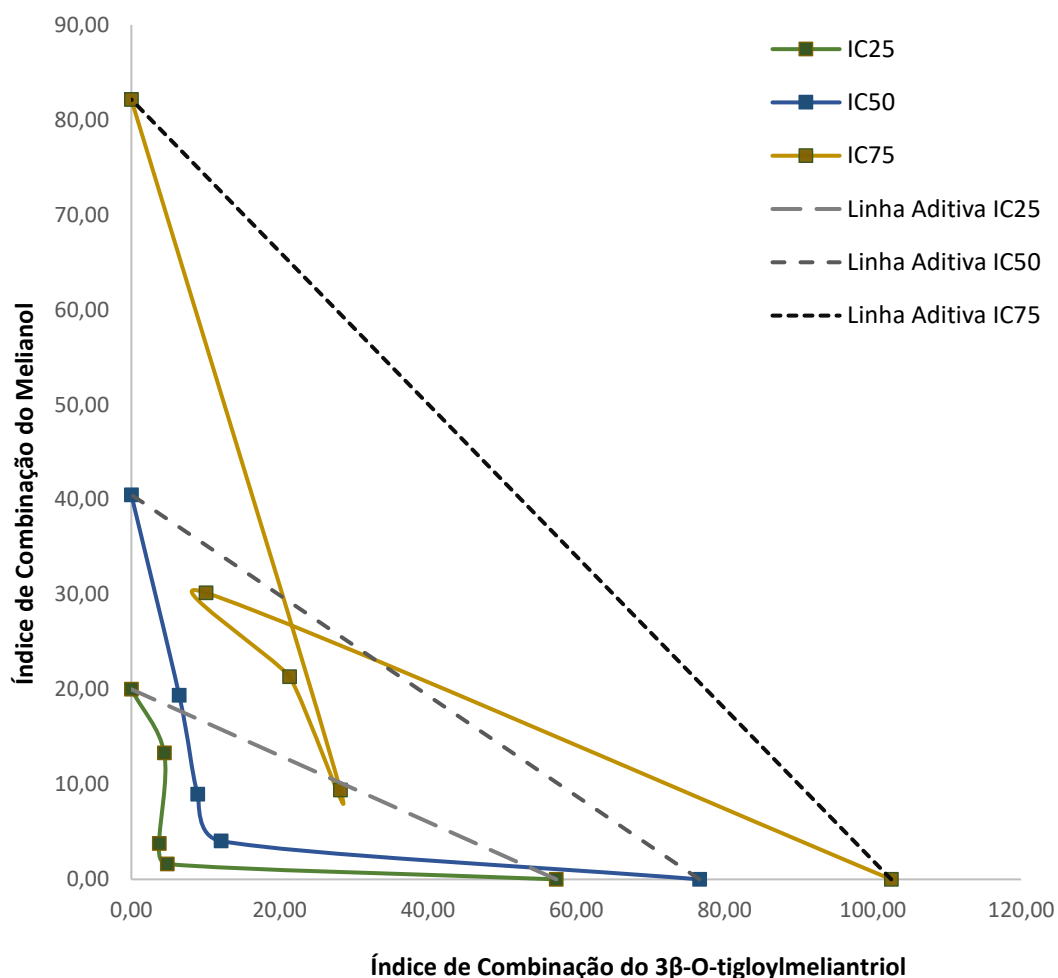
## Índice de Combinação

O ensaio de combinação mostrou efeito sinérgico entre os dois compostos, em todas as proporções utilizadas e para cada uma das CIs. Sendo que, o maior efeito sinérgico foi observado na proporção 3:1 (PROTOLIMONOIDE 3:PROTOLIMONOIDE 5), na  $Cl_{25}$  (IC = 0,16 – forte sinergismo). Os demais índices variaram entre forte sinergismo, sinérgico e moderadamente sinérgico, segundo a classificação de Chou (2006) (Tabela 1). Nenhuma combinação apresentou efeito quase aditivo ou antagônico.

**Tabela 1.** Índices de Combinação encontrados em cada proporção para cada  $Cl_{25-75}$ . De forma que, \*\*\*\*(forte sinergismo); \*\*\*(sinergismo); \*\*(sinergismo moderado); \*(quase aditivo).

### Valores dos Índices de Combinação

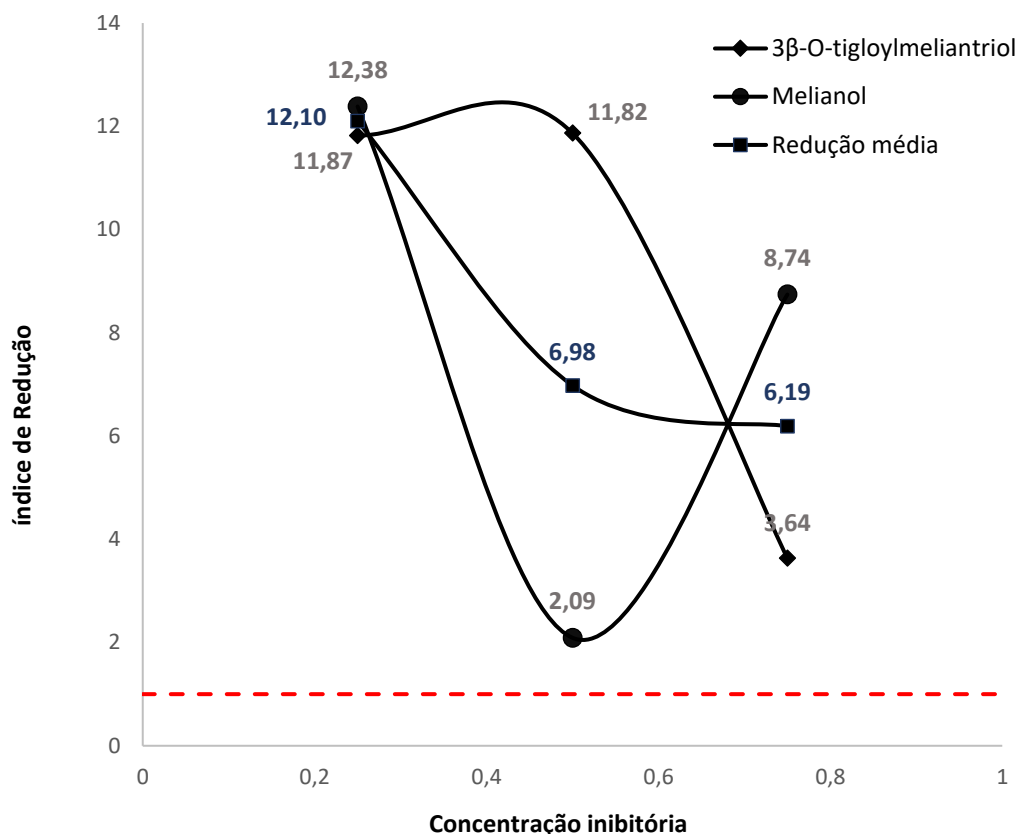
| Combinações | 1:3     | 1:1      | 3:1      |
|-------------|---------|----------|----------|
| $Cl_{25}$   | 0,74**  | 0,25**** | 0,16**** |
| $Cl_{50}$   | 0,56*** | 0,33***  | 0,25**** |
| $Cl_{75}$   | 0,39*** | 0,47***  | 0,46***  |



**Figura 2.** Isobolograma que ilustra o efeito sinérgico encontrado entre o Melianol (composto 5) e o 3β-O-tigloylmeliantriol (composto 3). Cada ponto representa uma concentração utilizada nos ensaios. Todas as linhas ficaram abaixo das linhas aditivas, demonstrando o efeito sinérgico encontrado em todas as combinações.

Além disso, a partir do cálculo do índice de redução de um composto sobre o outro, o DRI (*Drug Reduction Index*), foi possível observar uma redução muito significativa na quantidade de protolimonides necessária para atingir a Concentração Inibitória de 50% da cultura de epimastigotas quando combinados, em relação a quantidade necessária para chegar a  $CI_{50}$  quando utilizados isoladamente (Figura 3).

Assim, considerando que nos ensaios individuais obtivemos uma  $CI_{50}$  de 76,63 para o protolimonóide 3 e uma  $CI_{50}$  40,51 para o protolimonóide 5, em combinação foi possível diminuir esses valores em 79% e 60,19%, respectivamente.



**Figura 3.** Índice de Redução das Drogas/Compostos utilizados no ensaio de combinação. Cada ponto representa uma Concentração Inibitória (25-75% da esquerda para a direita).

## DISCUSSÃO

Alguns outros estudos já investigaram compostos provenientes do extrato de plantas pertencentes a Família Meliaceae e identificaram atividade antiparasitária desses, tanto em ensaios *in vitro* como em ensaios *in vivo* (Ambrozin, 2004; Leite et al, 2008; Leite et al, 2010; Mohammed et al, 2013; Da Cruz, 2020).

Da Cruz (2020), em específico, foi o primeiro estudo que demonstrou a atividade anti-*T. cruzi* de 6 protolimonoides isolados do extrato etanólico dos frutos de *Guarea kunthiana*, dentre eles o Melianol (protolimonóide 5) e 3β-O-tigloylmeliantriol (protolimonóide 3). No entanto, esses compostos foram avaliados individualmente em ensaios *in vitro*, e o Melianol foi o mais ativo contra formas replicativas.

Nesse estudo, o composto 5 também se mostrou mais ativo em relação ao composto 3. Contudo, quando em combinação conseguimos mostrar que esses protolimonoides apresentam um efeito sinérgico, de forma que com uma menor quantidade de cada composto em combinação, é possível aumentar o efeito anti-*Trypanosoma cruzi*, em formas epimastigotas da cepa Dm28c.

Nesse estudo não foi possível realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos protolimonoides em combinação sobre células Vero, mas Da Cruz (2020) apresentou em seus resultados uma moderada citotoxicidade desses protolimonoides individualmente sobre células Vero ( $CC_{50}/24h$  prot. 3 = 93;  $CC_{50}/24h$  prot. 5 = 83,27), enquanto em estudos *in silico*, foi visto que o protolimonóide 3 possivelmente seja capaz de produzir um efeito hepatotóxico.

Entretanto, apesar disso, o composto 3 ainda se demonstra muito promissor, especialmente em combinação com o composto 5, o qual foi capaz de potencializar a ação do dele, permitindo dessa forma que a quantidade de ambos seja reduzida contra *T. cruzi*, e com isso é esperado que tal citotoxicidade seja amenizada. Nesse sentido, seria interessante também a realização de novos ensaios de citotoxicidade *in vitro* com células Vero, dessa vez utilizando os protolimonoides em combinação.

Apesar de ser uma pesquisa inicial, tais resultados podem ser considerados muito promissores, visto que esses compostos apresentaram grande atividade antiparasitária e possuem baixo nível de citotoxicidade, principalmente em comparação ao Benznidazol. Ademais, o efeito sinérgico apresentado é especialmente interessante e deve ser levado em consideração ao pensar em estudos futuros para o desenvolvimento de possíveis novas drogas, devido ao fato de vários autores já terem mencionado na literatura sobre diversas vantagens decorrentes do uso de compostos sinérgicos no desenvolvimento de novos tratamentos, tais como: o aumento das taxas de cura, diminuição de efeitos colaterais e um menor tempo de tratamento (COGO et. al, 2012; Strauss, 2018; Gonçalves-Santos et. al, 2019; Mazzeti et al, 2019).

Por fim, é válido mencionar também que os resultados desse estudo contribuem para evidenciar a importância da conservação e proteção da biodiversidade encontrada nos biomas brasileiros, em especial o Cerrado, o qual, como já mencionado, configura-se em um *hotspot* global de diversidade biológica e tem se mostrado como uma ferramenta indispensável na descoberta de novos compostos para doenças negligenciadas, como a Doença de Chagas e muitas outras que ainda afetam de forma drástica a população, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

## CONCLUSÃO

O Melianol e o 3 $\beta$ -O-tigloylmeliantriol, isolados do extrato dos frutos de *Guarea kunthiana*, em combinação apresentaram forte efeito sinérgico em atividade anti-*T. cruzi*, particularmente sobre formas epimastigotas da cepa Dm28c. Ainda há necessidade de se avaliar a citotoxicidade dos protolimonoides em combinação, apesar de esses já terem apresentado toxicidade moderada e inferior ao Benznidazol, em ensaios individuais. Os resultados obtidos por esse estudo são novidade na literatura, e com certeza, podem contribuir com a busca de novas possibilidades de tratamentos para a Doença de Chagas.

## AGRADECIMENTOS

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Alda Maria pela orientação e todos os ensinamentos, não somente científicos, mas também como pessoa. Muito obrigada por toda atenção e carinho. A senhora é um exemplo e uma inspiração!

Aos Professores Dr. Vagner Fiuza e Dra. Ana Paula da Costa Marques por aceitarem o convite para participação na Banca de Defesa desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios, em especial a Bruninha e Carol, por toda ajuda com os ensaios, pela paciência, colaboração e por todos os ensinamentos.

A toda minha família: mãe (Rosires), pai (Antônio Marcos), irmã (Marina), tios, tias e avós, por todo o apoio e incentivo. Amo vocês!

Aos meus amigos que estão presentes desde o ensino fundamental e médio, Thata e Bruninho. E aos amigos que fiz durante a graduação (Alexia, Rafa, Vitória, Amanda, Robson, Pedro Isaac). Obrigada por estarem sempre presentes, vocês foram muito importantes!

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROZIN, Alessandra Regina Pepe et al. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 227-231, 2004.

CHOU, Ting-Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

COGO, Juliana et al. Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benznidazole. **Phytomedicine**, v. 20, n. 1, p. 59-66, 2012.

COURA, José Rodrigues; DE CASTRO, Solange L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

DE ANDRADE, Ana Lucia S. Sgambatti et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **The Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, 1996.

GONÇALVES-SANTOS, Elda et al. Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-*Trypanosoma cruzi* specific chemotherapy. **International immunopharmacology**, v. 77, p. 105961, 2019.

HENRIQUES, Cristina et al. Tetrazolium salt-based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. **Analytical Methods**, v. 3, n. 9, p. 2148-2155, 2011.

LEITE, Ana Cristina et al. Trypanocidal activity of limonoids and triterpenes from *Cedrela fissilis*. *Planta médica*, v. 74, n. 15, p. 1795-1799, 2008.

LEITE, Ana C. et al. Atividade tripanocida de flavonoides e limonoides isolados de extratos ativos de plantas de Myrsinaceae e Meliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 01-06, 2010.

MAFEZOLI, Jair et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 335-340, 2000.

MAZZETI, Ana Lia et al. Synergic effect of allopurinol in combination with nitroheterocyclic compounds against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 63, n. 6, p. e02264-18, 2019.

MOHAMMED, A.; IBRAHIM, Aliyu M.; MUSA, Abubakar B. Aliyu; HANNAH S. Mayaki.; ABIMBOLA, Gideon & MD, Shahidul Islam. Phenolics-rich fraction of *Khaya senegalensis* stem bark: Antitrypanosomal activity and amelioration of some parasite-induced pathological changes. *Pharmaceutical Biology*, 51:7, 906-913, 2013. DOI: 10.3109/13880209.2013.771191

Pan American Health Organization. *70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas*. Disponível em < <https://www.paho.org/en/news/13-4-2021-70-people-chagas-dont-know-theyre-infected> > Acesso em 24 de outubro de 2021.

PHILLIPSON, J. David; WRIGHT, Colin W. Antiprotozoal agents from plant sources. **Planta médica**, v. 57, n. S 1, p. S53-S59, 1991.

ROY, Amit; SARAF, Shailendra. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.

STRASSBURG, Bernardo BN et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1-3, 2017.

STRAUSS, Mariana et al. In vitro and in vivo drug combination for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection: a multivariate approach. **Experimental parasitology**, v. 189, p. 19-27, 2018.