

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

Doutorado em Saúde Pública

ANDREZZA RAPOSO BORGES

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE BRASILEIRO SOBRE

Trypanosoma cruzi

Recife

2012

ANDREZZA RAPOSO BORGES

Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro
sobre *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
para a obtenção do grau de doutor em
Ciências.

Orientadora: Regina Celia Bressan Q. de Figueiredo

Recife

2012

B732e Borges, [Andreza Raposo](#).
Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro sobre *Trypanosoma cruzi* / [Andreza Raposo Borges](#). - Recife: s.n, 2012.
117 p.; ilus. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em saúde pública) - Centro de Pesquisas [Aggeu Magalhães](#), Fundação Oswaldo Cruz, 2012

Orientador: Regina Célia [Bressan Queiroz](#) de Figueiredo.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Óleos essenciais - uso terapêutico. 3. Óleos essenciais - toxicidade. 4. Citotoxicidade. 5. [Tripanossomicidas](#). I. Figueiredo, Regina Célia [Bressan Queiroz](#) de. II. Título.

ANDREZZA RAPOSO BORGES

Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro
sobre *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
para a obtenção do grau de doutor em
Ciências.

Aprovado em: 09 / 04 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Dra. Regina Celia Bressan Q. de Figueiredo (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ

Dra. Adriana Fontes
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Ana Paula Pimentel Cassilhas
Universidade de Pernambuco - UPE

Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/FIOCRUZ

Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

À minha filha Ana Veruska,
que traz tanta luz e felicidade para minha vida,
um amor especial.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente e ao Senhor do Bonfim, que me guiaram para realização deste trabalho, proporcionando-me saúde, força e sabedoria para tornar esse sonho possível;

À minha orientadora Dra. Regina Figueiredo pela sua valiosa orientação, que durante esses 12 anos de convívio, ensinou-me com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas;

À pessoa mais importante da minha vida, minha filha Ana Veruska, pela compreensão e ternura sempre manifestadas, apesar da minha falta de atenção e ausências em alguns momentos, sem você seria impossível ter chegado até aqui;

Aos meus pais Vera Borges e Adelson Borges que sempre presentes e com muito apoio e dedicação não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida, um amor incondicional;

Ao meu marido Roberto Melo por respeitar minhas escolhas e estar presente em minha vida, dando-me todo amor, carinho, força e apoio indispensáveis para a realização deste trabalho;

Ao meu irmão Anderson Borges, minha cunhada Érika Borges pela força e convivência e ao meu sobrinho Henrique Borges pela felicidade que me proporciona com o seu sorriso;

Ao meu irmão Daniel Borges e minha cunhada Adriana Borges, que mesmo de longe me incentivaram nessa caminhada, e ainda de “quebra” me auxiliaram no entendimento da química;

À Taciana Higino que foi minha estagiária de iniciação científica, uma grande conselheira, uma “ninja” nas análises estatísticas e acima de tudo, tornou-se uma grande amiga;

À Juliana Aires, minha estagiária de iniciação científica, pela contribuição no desenvolvimento dos experimentos, bem como pela sua amizade;

À Aline Caroline, Amanda Aliança, Divar Fernandes, Jana Sandes, Neyla Alves, Keicyanne Fernanda, Karla Ribeiro, Lívia Bandeira e Luis Cláudio pelos momentos de descontração dentro do laboratório e amizade nos momentos mais difíceis;

Ao pessoal da UFPI por terem cedido os óleos essenciais, bem como pela análise química dos mesmos, em especial à grande amiga Graça Medeiros;

À querida Janaína Miranda pela doce convivência e pelas palavras certas na hora certa;

Ao amigo Mineo Nakazawa pela dedicação, ensinamentos e prestatividade no decorrer deste curso;

À Carolina Accioly (Nina) pelas análises no citômetro de fluxo;

Aos amigos Luiz Alves e Fábio Brayner a quem tenho grande admiração. Obrigada pelo companheirismo, amizade e pela ajuda nessa fase final com as análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura;

Às amigas “badas” Karla Patrícia e Fábria Cristiane pelo grande carinho, amizade de longas datas e pelos momentos de descontração;

Ao amigo Raimundo Nazareno pela confecção das micrografias eletrônica de transmissão, no microscópio óptico e pela sua amizade sempre tão presente;

A Rafael Padilha pela ajuda no processamento da microscopia eletrônica de varredura;

A todos da secretaria acadêmica do NESC/CPqAM, pelo apoio e ajuda prestada durante estes anos, em especial a Deth por ser tão prestativa e sempre pronta a ajudar;

A todos do Departamento de Microbiologia especialmente à Fernanda por todo seu apoio;

Aos colegas do doutorado, pela convivência e amizade durante estes longos anos;

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante esses anos;

E finalmente, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o andamento e conclusão desta tese.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas eu não teria saído do lugar”.*

(Chico Xavier)

BORGES, Andrezza Raposo. **Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro sobre *Trypanosoma cruzi***. 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada um problema de saúde pública. A quimioterapia usada causa efeitos colaterais graves e sua utilização na fase crônica ainda é controversa. Neste sentido, a investigação de novas estratégias terapêuticas continua a ser uma prioridade. Os óleos essenciais (OEs) de plantas aparecem como fonte promissora de compostos bioativos. Neste trabalho investigamos as atividades tripanocida e citotóxica de OEs de *Lippia sidoides* (LS), *Lippia origanoides* (LO), *Chenopodium ambrosioides* (CA), *Justicia pectoralis* (JP), *Ocimum gratissimum* e *Vitex agnus-castus* (VAC). A caracterização química dos Oes, através da espectrometria de massa, mostrou que o timol e carvacrol foram os principais componentes do LS e LO, enquanto que, o eugenol e 1,8-cineol foram os principais compostos de OG e VAC. Terpinoleno foi o principal constituinte de JP e CA. Todos os OEs foram ativos apresentando baixa toxicidade em macrófagos e alta seletividade para os parasitas. OEs de LS, LO, CA e OG foram os mais eficazes contra tripomastigota e inibiram eficientemente a sobrevivência de amastigotas no interior dos macrófagos. Nenhum destes OEs foi capaz de induzir alterações na produção de óxido nítrico. O tratamento com os OEs de LS, LO, OG e CA induziu alterações morfológicas compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular. LS e LO causaram perda de viabilidade celular e da integridade da membrana, demonstrado pela redução da marcação com calceína e o aumento na proporção de células HE-positivas. Uma diminuição considerável na Rodamina 123 e aumento na intensidade de fluorescência do MitoSox foram indicativos de perda do potencial mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio, o que em última instância conduzem à morte do parasita. Em conjunto nossos resultados apontam os OEs de LS, LO, CA e OG agentes promissores contra doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, óleos essenciais, citotoxicidade

BORGES, Andrezza Raposo. **Study of the biological activity of essential oils of medicinal plants northeastern Brazil on *Trypanosoma cruzi***. 2012. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is considered a public health problem. The chemotherapy used cause serious side-effects and its use in chronic phase is still controversial. In this sense, the investigation of novel therapeutic strategies remains a priority. Essential oils (OEs) plants appear as promising source of bioactive compounds. In this work we investigated the trypanocidal and cytotoxic activities of *Lippia sidoides* (LS), *Lippia origanoides* (LO), *Chenopodium ambrosioides* (CA), *Justicia pectoralis* (JP), *Ocimum gratissimum* (OG) and *Vitex agnus-castus* (VAC). The chemical characterization of OEs by mass spectrometry showed that the thymol and carvacrol were the major components of the LO and LS, while, eugenol and 1,8-cineole were the main compounds OG and VAC. Terpinolene was the main constituent of PG and CA. All OEs were active in macrophages presenting low toxicity and high selectivity for parasites. OEs LS, LO, CA and OG were the most effective against trypomastigote and efficiently inhibited the survival of amastigotes inside macrophages. None of these OEs was able to induce changes in nitric oxide production. The treatment with the OEs LS, L, GL and CA induced morphological changes consistent with loss of viability and cell death. LS LO caused loss of cell viability and membrane integrity demonstrated by reduced staining with calcein and the increase in the proportion of HE-positive cells. A considerable decrease in Rhodamine 123 and increase in fluorescence intensity of MitoSox were indicative of loss of mitochondrial potential and generation of reactive oxygen species, which ultimately lead to death of the parasite. Together our results indicate the OEs of LS, LO, CA and OG promising agents against Chagas disease.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, Essential oils, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Municípios com casos registrados da doença de Chagas aguda por município no período de 2000 a 2010.	21
Figura 2 - Número estimado de imigrantes infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> vivendo em países não endêmicos.	21
Figura 3 - Principais vetores da doença de Chagas na América do Sul e América Central.....	22
Figura 4 - Fases clínicas da Doença de Chagas.....	23
Figura 5 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 6 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 7 - Ilustração da forma Epimastigota do <i>T. cruzi</i> em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares.....	32
Figura 8 Principais vias do metabolismo secundário das plantas.....	39
Figura 9 - Estrutura química de terpenóides e fenilpropanóides.....	39
Figura 10 - <i>Lippia sidoides</i>	41
Figura 11 - <i>Lippia origanoides</i>	41
Figura 12 - <i>Ocimum gratissimum</i>	42
Figura 13 - <i>Chenopodium ambrosioides</i>	43
Figura 14 - <i>Justicia pectoralis</i>	44
Figura 15 - <i>Vitex agnus-castus</i>	44
Figura 16 - Sistema de hidrodestilação aparelho de Clevenger.....	48
Figura 17 - Cromatográfico gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/MS)	49
Figura 18 - Obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	50

Figura 19 – Método do MTT.....	52
Figura 20 - Reação de Griess.....	53
Figura 21 - Estrutura química dos constituintes majoritários dos OEs.....	56
Figura 22 - Efeito tripanocida dos óleos essenciais de LS, LO, OG, CA, JP e VAC.....	40
Figura - 23 Efeito dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre a sobrevivência das amastigotas intracelulares.....	62
Figura 24 - Efeito dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre a infecção dos macrófagos por amastigotas de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 25 - Produção de óxido nítrico por macrófagos tratados com os OEs	64
Figura 26 - Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com os OEs de LS e LO.....	66
Figura 27 - Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com os OEs de OG e CA	67
Figura 28 – Fotomicrografias eletrônicas de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com LS, LO, CA e OG.....	69
Figura 29 - Marcação do Live/Dead de formas epimastigotas e <i>T. cruzi</i> , através da microscopia confocal a laser.....	72
Figura 30 - Gráficos de marcação da calceína e Homodímero de Etídio de formas epimastigotas e <i>T. cruzi</i> , através da microscopia confocal a laser.....	73
Figura 31 - Microscopia eletrônica e varredura de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	74
Figura 32 - Marcação do MitoSox de formas epimastigotas e <i>T. cruzi</i> , através da microscopia confocal a laser.....	76
Figura 33 - Marcação do Mitosox em formas epimastigotas e <i>T. cruzi</i> , através da microscopia confocal a laser.....	77
Figura 34 - Espectro de emissão de fluorescência normalizada de calceína e do homodímero de etídio-1.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de efeitos colaterais em adultos associado ao uso do nifurtimox e benzinidazol.....	33
Tabela 2 - Quantidade relativa dos constituintes encontrados nos Oes	57
Tabela 3 - Efeito tripanocida dos OEs de LS, LO, CA, OG e JP sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> , citotoxicidade em macrófagos e índice de seletividade (SI).....	60
Tabela 4 - Efeito tripanocida dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> e o índice de seletividade (SI).	61
Tabela 5 - Índice de variação da intensidade da marcação (IV) nas células não tratadas e tratadas com o óleos essencial de LS e LO e incubadas com o MitoSox.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA%	Percentual da atividade anti-amastigota
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca	Calceína
CA	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CC ₅₀	Concentração Citolóxica em 50% das células de mamíferos
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CL ₅₀	Concentração capaz de causar lise em 50% das formas tripomastigotas
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Homodímero de Etídio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% crescimento das formas epimastigotas/amastigotas
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
IP	Iodeto de Propídio
IS	Índice de sobrevivência
JP	<i>Justicia pectoralis</i>
kDNA	DNA mitocondrial
KI	Índice de retenção de Kowats
LAFEPE	Laboratório farmacêutico do estado de Pernambuco

LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LO	<i>Lippia origanoides</i>
LS	<i>Lippia sidoides</i>
NO	Óxido Nítrico
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OEs	Óleos essenciais
OG	<i>Ocimum gratissimum</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato-salino
Rh 123	Rodamina 123
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Índice de seletividade
pH	Potencial hidrogeniônico
UFPI	Universidade Federal do Piauí
WHO	World health organization
VAC	<i>Vitex agnus-castus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Doença de Chagas	20
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.3 Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
1.3.1 Superfície Celular.....	26
1.3.2 O Flagelo e a Bolsa Flagelar.....	27
1.3.3 Os Reservossomos.....	28
1.3.4 Glicossomos e Acidocalcisomas.....	29
1.3.5 Mitocôndria e Cinetoplasto.....	29
1.3.6 Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi.....	30
1.3.7 Inclusões Lipídicas.....	31
1.3.8 O Núcleo.....	31
1.4 Quimioterapia da doença de Chagas	32
1.4.1 Produtos naturais.....	36
1.4.1.1 Óleos essenciais.....	38
1.4.1.1.1 <i>Lippia sidoides</i>	40
1.4.1.1.2 <i>Lippia origanoides</i>	41
1.4.1.1.3 <i>Ocimum gratissimum</i>	42
1.4.1.1.4 <i>Chenopodium ambrosioides</i>	42
1.4.1.1.5 <i>Justicia pectoralis</i>	43
1.4.1.1.6 <i>Vitex agnus-castus</i>	44
2 JUSTIFICATIVA	45
3 PERGUNTA CONDUTORA	46
4 OBJETIVOS	47

4.1 Objetivo geral.....	47
4.2 Objetivos específicos.....	47
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1 Plantas e extração dos óleos essenciais.....	48
5.2 Análise química dos óleos essenciais.....	49
5.3 Parasitas.....	50
5.4 Atividade tripanocida dos OEs.....	51
5.5 Citotoxicidade em células de mamíferos.....	51
5.6 Produção de óxido nítrico.....	52
5.7 Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal a Laser.....	53
5.8 Estudo ultraestrutural.....	54
5.9 Animais.....	54
5.10 Análises estatísticas.....	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 Análise química dos óleos essenciais.....	56
6.2 Atividade tripanocida dos Óleos essenciais.....	58
6.3 Citotoxicidade dos óleos essenciais sobre células de mamíferos.....	60
6.4 Efeito dos óleos essenciais de LS, LO, CA e OG sobre formas amastigotas de <i>T. Cruzi</i>	60
6.5 Produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos tratados com OEs	64
6.6 Análise ultraestrutural do <i>T. cruzi</i> após tratamento com OEs	65
6.7 Análise do modo de ação dos óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> e <i>L. sidoides</i> através da microscopia confocal a laser, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura.....	70
7 DISCUSSÃO.....	78
7.1 Caracterização química dos Óleos essenciais.....	78

7.2 Atividade dos óleos essenciais sobre formas epimastigotas e tripomastigotas.....	81
7.3 Citotoxicidade dos Óleos essenciais.....	81
7.4 Atividade dos OEs essenciais de <i>L. sidoides</i>, <i>L. organoides</i>, <i>C. ambrosioides</i>, <i>O. gratissimum</i> sobre formas intracelulares de <i>T. cruzi</i>.....	82
7.5 Efeitos dos óleos essenciais na produção de óxido nítrico.....	83
7.6 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão.....	84
7.7 Mecanismo de ação dos OEs de <i>L. sidoides</i> e <i>L. organoides</i>.....	85
8 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A - Artigo Publicado.....	110
Artigo Científico.....	111
ANEXO A - Parecer do CEUA/CPqAM.....	117

1 INTRODUÇÃO

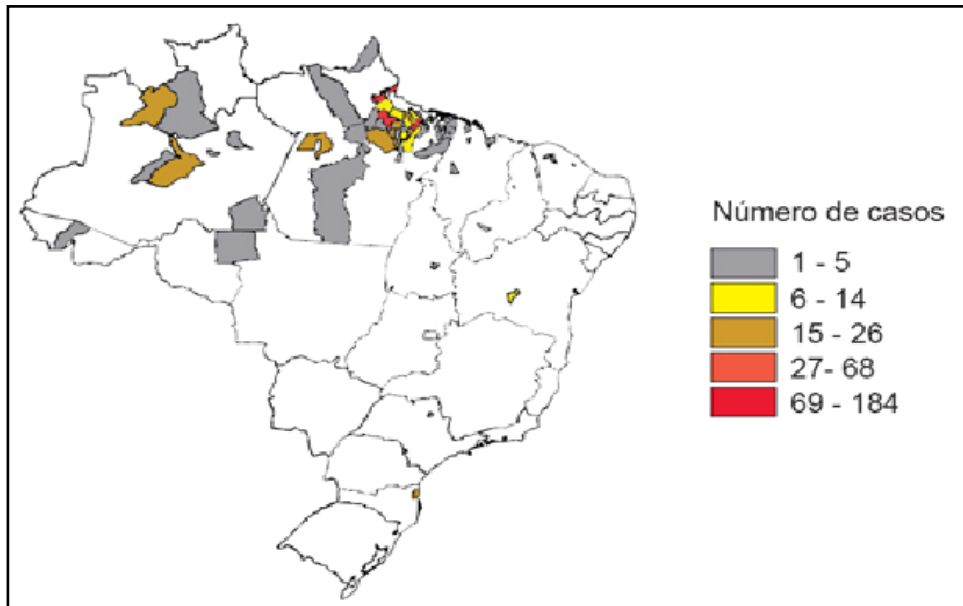
1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, enviado à frente da construção da estrada de ferro Central do Brasil, em Lassance/MG, para estudar uma doença que acometia os trabalhadores, incapacitando-os. De maneira notável, ele descreveu detalhadamente o parasita causador da doença, o vetor, o ciclo de vida do parasita e da transmissão e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais da doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

Antes mesmo da descoberta de Carlos Chagas, durante uma expedição pela América do sul em 1835, Charles Darwin pode ter contraído a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que ele descreveu o contato com insetos triatomíneos, além de conviver com determinados sintomas desta doença ao longo de sua vida (BERNSTEIN, 1984). Mais recentemente, estudos paleoparasitológicos foram capazes de recuperar o DNA do *T. cruzi* em múmias humanas mostrando que esta enfermidade acomete os homens há mais de 9000 anos (AUFDERHEIDE et al., 2004). Há milhares de anos atrás a doença de Chagas era uma doença enzoótica de animais silvestres, que se estabeleceu como uma zoonose quando o homem invadiu os ecótopos naturais destes animais, através do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, promovendo desta forma, a adaptação dos insetos silvestres ao ambiente domiciliar na procura de novas fontes de alimentos (ZINGALES, 2011).

A doença de Chagas é uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a qual apresenta uma larga distribuição geográfica, sendo endêmica na América do Sul e América Central, afetando 18 países (ROCHA et al., 2007), tornando-se um dos principais problemas de saúde pública nesta região, com elevados índices de morbidade e mortalidade. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, surgindo cerca de 50 mil novos casos a cada ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2010, foram registrados em vários municípios do Brasil 945 casos de doença de Chagas aguda (**Figura 1**). Estima-se que existam no Brasil em torno de dois milhões de indivíduos infectados (BRASIL, 2010).

Figura 1 - Municípios com casos registrados da doença de Chagas aguda por município no período de 2000 a 2010

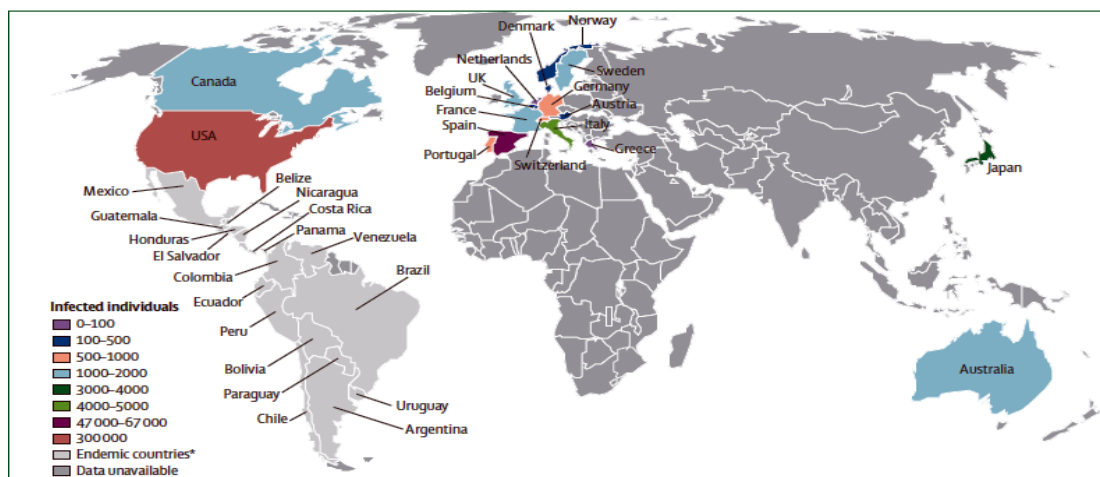


Fonte: Brasil (2010).

Por outro lado, a doença de Chagas não está confinada à América Latina, sendo detectados casos na Europa, Estados Unidos e Canadá relacionados ao risco de transmissão por transfusão sanguínea e transplantes de órgãos, a partir de um grande número de imigrantes provenientes de países endêmicos nestes países (FLORES-CHAVEZ et al., 2008; FORÉS et al., 2007) (**Figura 2**).

No Brasil, Minas Gerais é considerado um dos estados com maior prevalência da endemia chagásica, tendo sido coincidentemente o palco da descoberta desta doença (OMS, 2009). A região Amazônica apresenta um crescente risco da enfermidade de Chagas se tornar endêmica, relacionado principalmente pela adaptação de vetores e animais silvestres (infectados com o *T. cruzi*) ao domicílio humano, em consequência do desflorestamento incontrolado na região (AGUILAR et al., 2007).

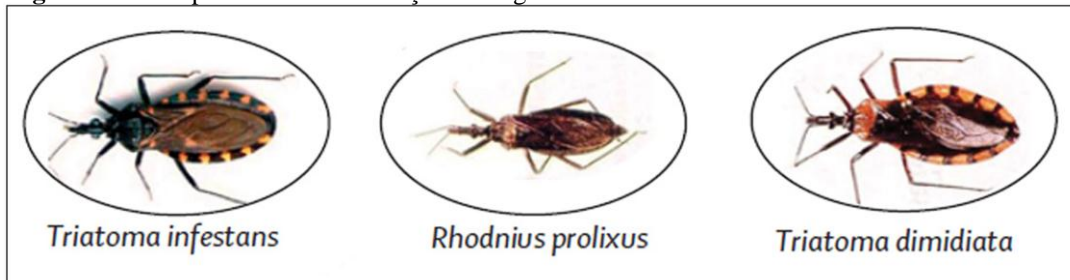
Figura 2 - Número estimado de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* vivendo em países não endêmicos.



Fonte: Rassi et al., (2010).

A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, através de insetos triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos sejam conhecidas, apenas algumas são vetores competentes para o *T. cruzi* (GALVÃO et al., 2003). Na América Central *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as principais espécies implicadas na transmissão vetorial (**Figura 3**). Todos os estágios de desenvolvimento dos triatomíneos são capazes de transmitir o protozoário, porém sua capacidade de infecção aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos, sendo os insetos adultos os que apresentam as maiores taxas de infecção (RASSI et al., 2010).

Figura 3 - Principais vetores da doença de Chagas na América do Sul e América Central



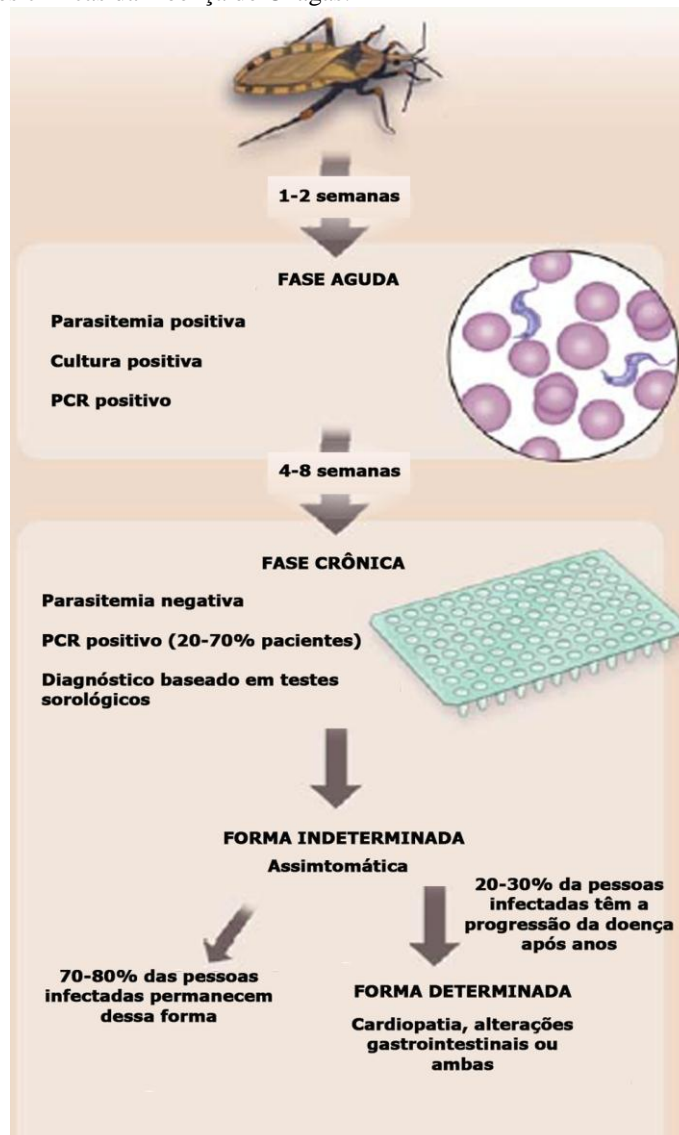
Fonte: Adaptado de Rassi et al., (2010)

Outras formas não convencionais de infecção também podem ser encontradas tais como: transfusão sanguínea, transplacentária, transplante de órgãos, acidente de laboratório. Mais recentemente, a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com excretas dos triatomíneos, passou a ocupar um importante papel na disseminação da doença (AUFDERHEIDE et al., 2004; DIAS, 2006), visto que foi responsável por surtos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados. Esta via de infecção resulta em um quadro clínico agudo grave associado à uma infecção parasitária maciça com altas taxas de mortalidade (PEREIRA et al., 2009).

A doença de Chagas apresenta duas fases bem caracterizadas e distintas (**Figura 4**): uma fase aguda e uma crônica. A fase aguda se inicia logo após a infecção podendo durar de 4 a 8 semanas, e é caracterizada por uma alta parasitemia e pela presença de infiltrados inflamatórios em diversos tecidos. Geralmente é assintomática ou pode apresentar sintomas menos específicos tais como febre e edema no local da inoculação (chagoma de inoculação ou sinal de Romana). A mortalidade nesta fase ocorre ocasionalmente (<5-10% dos casos sintomáticos) como resultado de uma miocardite ou meningoencefalite grave (BRENER et al.,

1997; PINTO et al., 2009). Estudos mostram que 60 a 70% dos pacientes não irão desenvolver clinicamente a doença, caracterizando a forma indeterminada da doença de Chagas, a qual apresenta positividade para exames sorológicos com exames radiológicos e eletrocardiograma normais. Na ausência de um tratamento específico, 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica determinada, que é caracterizada por lesões irreversíveis em alguns órgãos tais como o coração, esôfago e cólon (COURA; DE CASTRO, 2002).

Figura 4 - Fases clínicas da Doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Bern (2011)

Na fase crônica cardíaca, que é mais séria e mais frequente, ocorre uma miocardite lentamente progressiva com o comprometimento da função contrátil do músculo cardíaco, além de outras anomalias semelhantes àsquelas observadas em doenças coronarianas (ACQUATELLA, 2007). A fase crônica digestiva é causada pela destruição dos gânglios autonômicos intramural que afeta o esôfago e o cólon causando a sua dilatação e

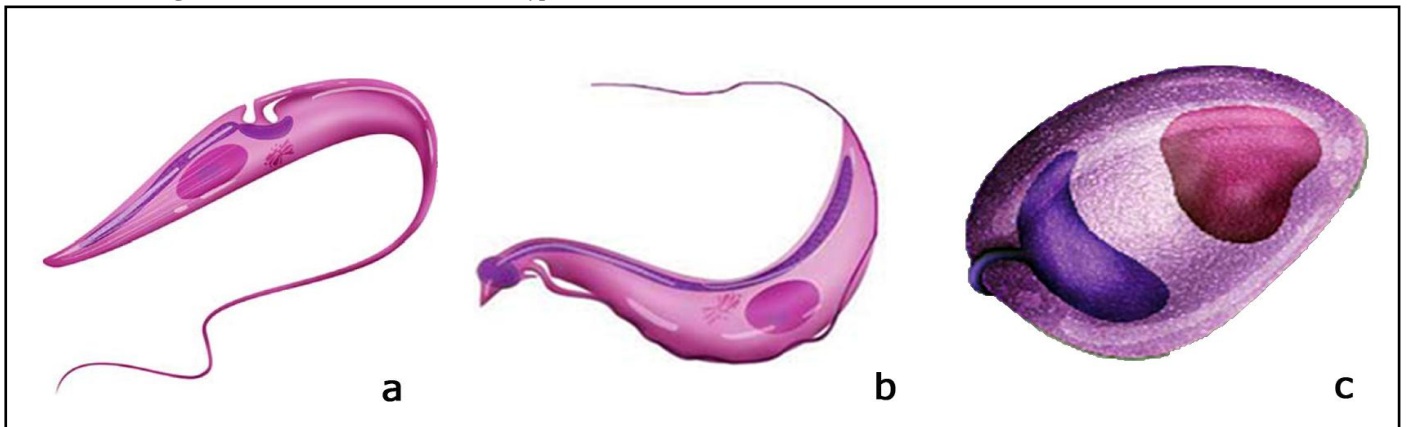
caracterizando assim as síndromes dos “megas”: megacólon e megaesôfago. A associação da doença cardíaca com o megacólon e megaesôfago define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas, que é menos freqüente (MARIN-NETO et al., 2007).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), é um protozoário hemoflagelado pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae.

Esse parasita desenvolve o seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), assumindo diferentes estágios evolutivos. Como os ambientes apresentados ao *T. cruzi* são muito diferentes em suas características físico-químicas, este desenvolveu ao longo da sua evolução estratégias que o tornaram capazes de lidar com tais diferenças. Características do parasita como ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente. Além das mudanças fisiológicas estas formas se diferenciam morfolologicamente pela posição do flagelo e a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Com base nestas características, o *T. cruzi* possui em seu ciclo de vida três estágios evolutivos: epimastigota, tripomastigota e amastigota (**Figura 5**) (BRENNER et al., 2000).

Figura 5 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Eschenaze (2010)

Legenda: (a) Epimastigota, (b) Tripomastigota, (c) Amastigota.

As formas epimastigotas (**Figura 5a**) são alongadas e medem entre 20 e 40 μm , com o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo à bolsa flagelar e anterior ao núcleo, e

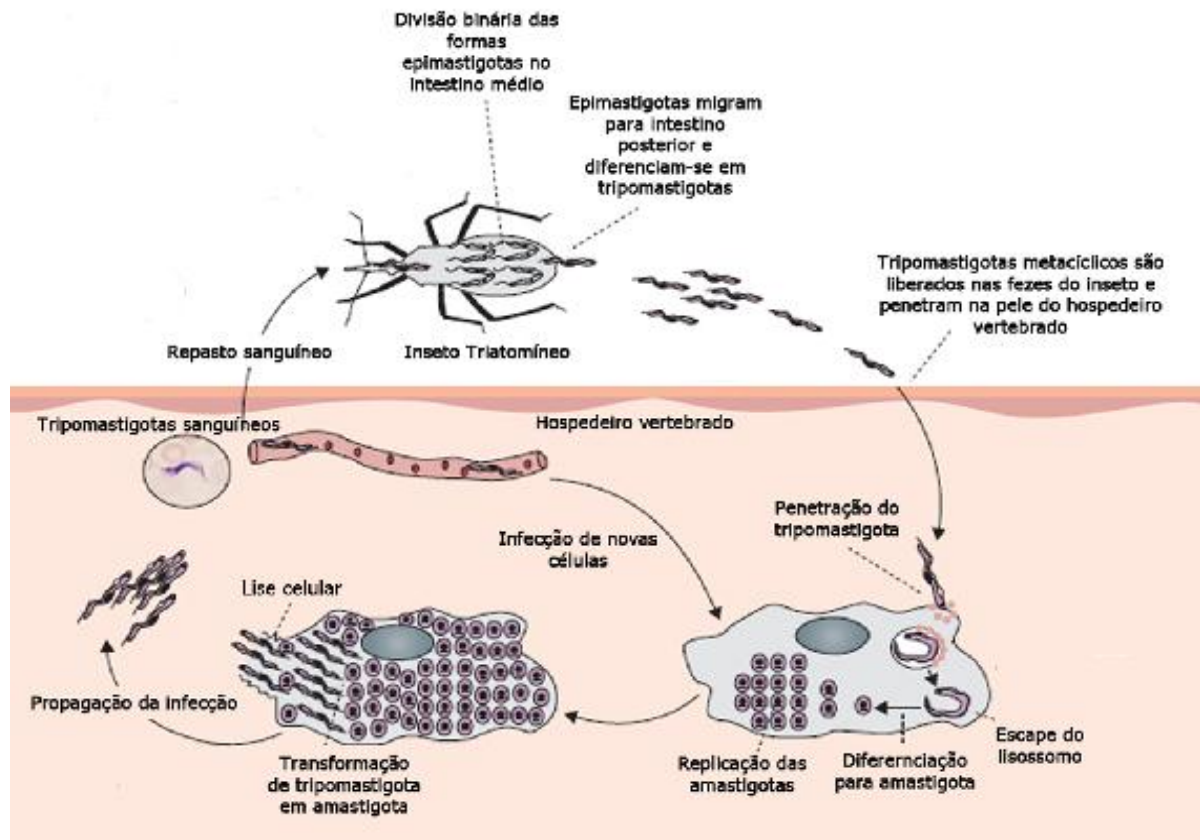
possui o flagelo livre. São formas replicativas, não-infectantes encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado e predominantes em culturas axênicas.

As formas tripomastigotas (**Figura 5b**) são fusiformes, levemente achatadas e medem aproximadamente 25 μm , apresentam o cinetoplasto arredondado e posterior ao núcleo, o flagelo emerge da região posterior aderindo-se a membrana plasmática, tornando-se livre na região anterior. Não apresentam capacidade de multiplicação e são as formas infectantes para ambos os hospedeiros. No hospedeiro vertebrado essas formas são encontradas no sangue (tripomastigotas sanguíneas) enquanto que no hospedeiro invertebrado são encontradas na porção final do intestino (tripomastigotas metacíclicas).

As formas amastigotas (**Figura 5c**) são arredondadas com aproximadamente 5 μm de diâmetro, o cinetoplasto em forma de bastão situado entre o núcleo e o flagelo. Este último é muito curto, restrito ao interior da bolsa flagelar. O núcleo é relativamente grande, arredondado e excêntrico. Estas formas, são intracelulares multiplicativas, encontradas no interior das células do hospedeiro, preferencialmente em macrófagos, células musculares cardíacas e do tecido digestivo (DE SOUZA, 2002).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo e envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos triatomíneos hematófagos). No inseto, o ciclo tem início, quando durante o seu repasto sanguíneo ele ingere formas tripomastigotas sanguíneas. No estômago, estas formas se diferenciam em epimastigotas e se proliferam por divisão binária no lúmen do intestino. Na porção terminal do intestino, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, as quais serão eliminadas nas fezes do inseto durante seu repasto sanguíneo no mamífero. No hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas penetram em macrófagos e em células de tecido, escapam do vacúolo fagolisossomal e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Depois de alguns ciclos de multiplicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que serão liberadas pela ruptura da célula hospedeira, podendo então invadir novas células ou tecidos ou então serem ingeridas pelo inseto, completando assim o ciclo de vida do parasita (RASSI, 2010) (**Figura 6**).

Figura 6 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Rassi et al. (2010) (Modificado).

1.3 Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

Desde a descrição morfológica inicial das formas evolutivas de *T. cruzi* por Carlos Chagas em 1909, vários estudos vêm sendo realizados, usando diferentes técnicas de microscopia para obtenção de detalhes sobre os estágios de desenvolvimento do ciclo de vida deste parasita, organização estrutural destas formas, bem como a sua biologia celular. Este parasita possui organelas citoplasmáticas comuns a células eucarióticas, além de algumas organelas peculiares dos tripanossomatídeos. Tais detalhes são bastante relevantes para o desenvolvimento de novas drogas, com alvos mais específicos e são descritos abaixo (**Figura 7**) (DE SOUZA, 2008).

1.3.1 Superfície Celular

É composta basicamente pela membrana plasmática e por microtúbulos subpeliculares. Como em todas as células, a membrana plasmática do *T. cruzi* apresenta uma bicamada lipídica constituída por diferentes lipídeos e proteínas, tais como mucinas, transialidase,

glicoproteínas, entre outras (DE SOUZA, 2009). Na face externa da membrana plasmática encontra-se o glicocálice que é constituído pelos carboidratos associados às proteínas periféricas ou integrais, formando as glicoproteínas, e aos lipídios formando os glicolipídios. O glicocálice varia na dependência da forma evolutiva em que o parasita se encontra; mostrando-se mais evidente nas formas amastigotas e principalmente nas formas tripomastigotas. Nas formas epimastigotas, este é menos desenvolvido, exceto na região do citóstoma onde se especializa deixando a superfície mais rugosa (BRENER et al., 2000; DE SOUZA, 2008).

Em todas as formas evolutivas do *T. cruzi* existem microdomínios especializados da membrana plasmática que apresentam características distintas do resto do corpo celular e que estão envolvidas em funções vitais às células. Dentre estes, destaca-se o citóstoma, o qual é observado nas formas epimastigotas e amastigotas. Esta estrutura é constituída por uma profunda invaginação da membrana plasmática que se estende até a região do núcleo. Juntamente com a bolsa flagelar o citóstoma está envolvido na captação, através do mecanismo de endocitose, de macromoléculas do meio que são essenciais para o metabolismo do parasita (DE SOUZA, 2009; FIGUEIREDO et al., 2000).

Uma característica peculiar dos tripanossomatídeos é a presença de uma camada de microtúbulos localizada logo abaixo da membrana plasmática denominada de microtúbulos subpeliculares, os quais são os principais componentes do citoesqueleto e estão dispostos por todo corpo do parasita (exceto na região da bolsa flagelar). Os microtúbulos subpeliculares estabelecem ligações entre si, com a membrana plasmática e em determinados casos com perfis do retículo endoplasmático. Estas ligações são realizadas através de curtos filamentos de natureza desconhecida, conferindo maior rigidez e estabilidade à célula (DE SOUZA, 2009; SANT'ANNA et al., 2005). O número de microtúbulos em uma célula está relacionado com o diâmetro e com a forma evolutiva em que o parasita se encontra. Em *T. cruzi* eles estão menos concentrados na região anterior e posterior e em maior quantidade na região do núcleo e cinetoplasto (DE SOUZA, 2002).

1.3.2 O Flagelo e a Bolsa Flagelar

O *T. cruzi*, bem como todos os parasitas da família Tripanosomatidae apresenta um flagelo característico formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulo central, além de uma estrutura paraxial composta por uma rede de filamentos. O

flagelo está envolvido em processos importantes tais como, mobilidade celular e adesão do protozoário à superfície das células dos hospedeiros (DE SOUZA, 2002; 2008).

Todas as formas evolutivas deste parasita possuem flagelo, até mesmo as formas amastigotas. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas, o flagelo adere-se ao corpo do parasita em uma região denominada zona de adesão flagelar. Uma estrutura denominada paraflagelar, associada ao flagelo destas formas, é formada por um arranjo de filamentos protéicos de diferentes espessuras (BRENER et al., 2000). Além disso, o flagelo se encontra sempre associado ao corpúsculo basal e ao cinetoplasto independente da forma evolutiva do *T. cruzi* (DE SOUZA, 2009)

O flagelo emerge de uma invaginação da membrana plasmática na porção anterior do parasita denominada bolsa flagelar; a qual é altamente especializada não possuindo microtúbulos subpeliculares associados à sua membrana. Além disso, a sua membrana externa é diferente da membrana que reveste o corpo celular e o flagelo quanto à distribuição de partículas intramembranas e localização de enzimas e proteínas (DE SOUZA, 2002). A bolsa flagelar é um compartimento especial isolado do meio extracelular, onde o parasita secreta macromoléculas e absorve nutrientes do meio externo, uma vez que, há evidências morfológicas e citoquímicas que mostram que nessa região existe uma intensa atividade endocítica e exocítica (DE SOUZA, 2002; FIGUEIREDO et al., 2000).

1.3.3 Os Reservossomos

Os reservossomos são estruturas encontradas apenas na região posterior das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Apresentam forma esférica com diâmetro de aproximadamente 700 nm, delimitados por uma unidade de membrana e possuindo conteúdo elétron denso com algumas inclusões eletronlucidas. O pH do interior do reservossomo é de cerca de 6,0; sugerindo que esta organela corresponde a um compartimento pré-lisossomal (DE SOUZA, 2002; SOARES et al., 1992).

A designação de “reservossomo” se baseou em dois critérios: a) todas as macromoléculas ingeridas pelo parasita através do processo endocítico se acumulam nessa organela; b) ela desaparece gradualmente quando as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas (DE SOUZA, 2002; DE SOUZA 2008; FIGUEIREDO et al., 2004).

Os reservossomos são responsáveis pelo armazenamento de proteínas, lipídeos e cruzipaina, a principal cisteína proteinase encontrada nesses parasitas. Sua função é

armazenar, reciclar e degradar macromoléculas. As formas amastigotas e tripomastigotas não possuem um reservossomo típico, porém possuem organelas relacionadas a lisossomos denominadas de “reservossomo-like”, as quais também armazenam cruzipaína (DE SOUZA, 2009; SANT’ANNA et al., 2008).

1.3.4 Glicossomos e Acidocalcisomas

Os glicossomos são estruturas esféricas medindo aproximadamente 0,3 µm de diâmetro, delimitadas por membrana e com uma matriz homogênea e levemente densa. Encontram-se aleatoriamente distribuídos por todo o corpo celular. Inicialmente, estas estruturas foram chamadas de microcorpos em analogia a organelas semelhantes descritas em células de mamíferos. Os glicossomos são um tipo especial de peroxissomos por conter em seu interior enzimas da via glicolítica (DE SOUZA 2008; PARSONS, 2004) Todas as proteínas encontradas nestas estruturas são codificadas no núcleo, traduzidas por ribossomos livres e importadas para o seu interior (DE SOUZA, 2002).

Os acidocalcisomas são organelas com característica ácida, ricas em cálcio, fósforo, magnésio, sódio, dentre outros íons, além de possuírem uma grande quantidade de canais, bombas e trocadores iônicos (DO CAMPO, 2005; MIRANDA et al., 2004). Apresentam-se como uma estrutura esférica com diâmetro de aproximadamente 200 nm, limitada por membrana, contendo em seu interior uma matriz eletróluscente, onde depósitos eletrondensos podem ser visualizados. Estas organelas estão distribuídas por todo corpo do parasita, embora sejam mais comuns na periferia celular. Como funções atribuídas a estas estruturas podemos citar armazenamento de cálcio, magnésio, sódio, compostos fosforados, potássio, zinco e ferro; manutenção do pH e da homeostasia intracelular e osmorregulação em associação com o vacúolo contrátil (DO CAMPO et al., 2005; MORENO; DO CAMPO, 2009).

1.3.5 Mitocôndria e Cinetoplasto

Uma particularidade do *T. cruzi*, bem como de todos os membros da família Trypanosomatidae, é a presença de uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo celular do protozoário. Assim como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanossomatídeos possui um DNA mitocondrial próprio, o qual pode representar até 30% do DNA total da célula. Em uma determinada região situada abaixo do corpúsculo basal e

próxima ao núcleo há um complexo arranjo de fibrilas de DNA que forma a estrutura conhecida como cinetoplasto (DE SOUZA, 2002).

O cinetoplasto é formado por um tipo especial de DNA conhecido como kDNA que se organiza através da associação de moléculas de maxicírculos e minicírculos, além da presença de proteínas básicas chamadas de Histonas-h1 que são responsáveis pela condensação deste material genético (CAVALCANTE et al., 2009; DE SOUZA; CAVALCANTE, 2008; LIU et al., 2005). Os maxicírculos medem aproximadamente 0,5-2,5 kb e estão envolvidos na codificação de RNA ribossomal e proteínas; enquanto que os minicírculos medem de 20 a 40 kb e formam RNAs guia que controlam a especificidade do RNAm.

A estrutura organizacional e morfologia do cinetoplasto variam de acordo com o estágio evolutivo do parasita. Nas formas multiplicativas epimastigotas e amastigotas se apresenta em forma de bastão levemente curvado, enquanto que nas formas tripomastigotas o kDNA se organiza em três a quatro fileiras paralelas, conferindo ao cinetoplasto um arranjo arredondado em formato de cesta (DE SOUZA et al., 2009b).

1.3.6 Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi

A via secretora do *T. cruzi* é constituída pelo retículo endoplasmático, complexo de golgi e um sistema de vesículas que brotam a partir das cisternas do golgi e migram para a bolsa flagelar onde se fundem liberando o seu conteúdo neste espaço.

Perfis de retículo endoplasmático liso e rugoso, envolvidos na síntese de proteínas e lipídeos, podem ser vistos por todo o corpo. No entanto, pode haver uma maior concentração próximos à membrana plasmática e aos microtúbulos subpeliculares estabelecendo contato com os mesmos, além de estarem presentes ao redor do núcleo (DE SOUZA, 2002).

O complexo de golgi está localizado próximo à bolsa flagelar e ao cinetoplasto, e nas formas epimastigotas e amastigotas sempre está próximo do citóstoma. De modo geral, é formado por um sistema de 3 a 10 cisternas. Na porção trans do complexo de golgi, estas cisternas se apresentam mais dilatadas do que na porção cis. Assim como em outras células, o complexo de golgi do *T. cruzi* está envolvido na glicolisação de proteínas, e no tráfego de membranas para diversas regiões da célula (ARARIPE et al., 2004; DE SOUZA 2009).

1.3.7 Inclusões Lipídicas

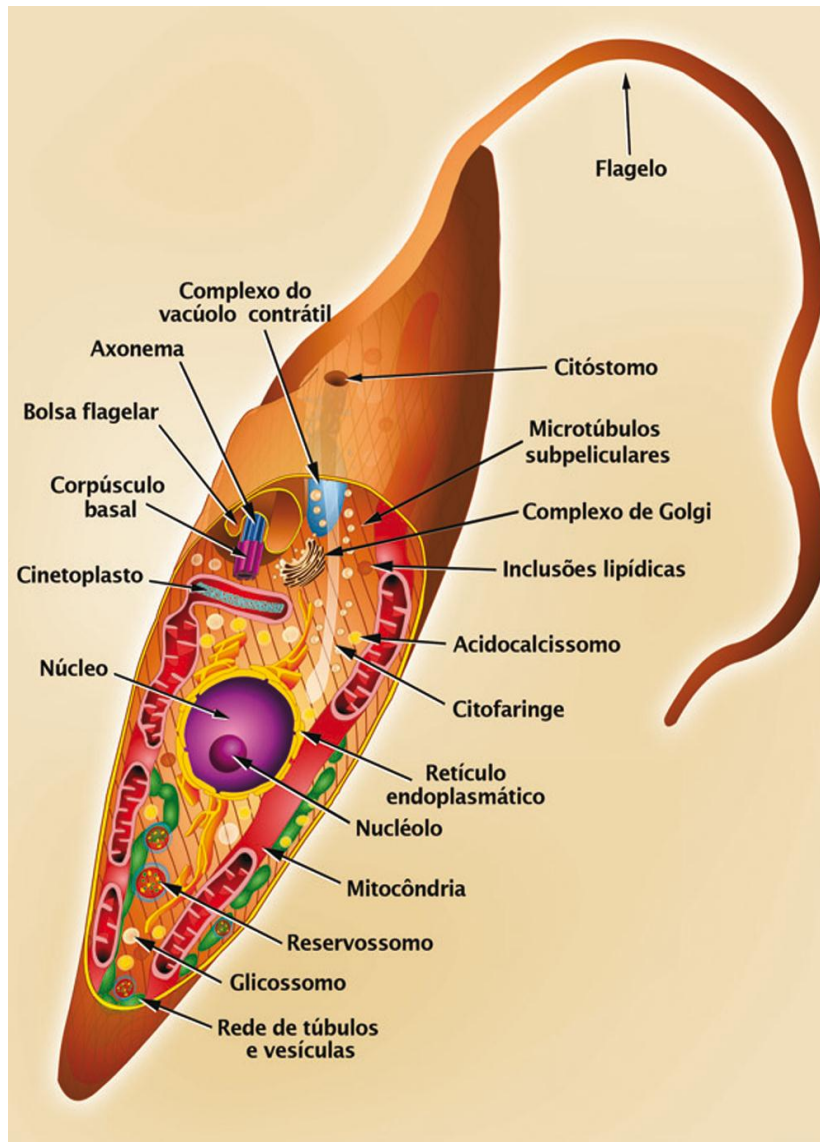
As inclusões lipídicas são estruturas esféricas com um diâmetro variável, envoltas por uma monocamada de fosfolipídeos e que podem ser observadas no citoplasma do *T. cruzi*. São bastante variáveis quanto à sua densidade, umas apresentam-se eletróluscentes, enquanto outras uma densidade média, porém pouco se sabe sobre essas estruturas. Apesar de pouco se saber sobre a função destas estruturas, estudos mostraram que formas tripomastigotas eficientemente acumulam inclusões lipídicas em seu citoplasma onde podem funcionar como reserva energética adicional (SOARES; DE SOUZA, 1987; FIGUEIREDO et al., 2000).

1.3.8 O Núcleo

O núcleo do *T. cruzi* e de outros tripanossomatídeos apresenta uma organização estrutural bastante semelhante a de outras células eucarióticas. Apresenta diâmetro de aproximadamente 2,5 µm, cromatina condensada associada ao folheto interno do envelope nuclear, com o nucléolo bem definido nas formas epimastigotas. A sua membrana externa apresenta poros nucleares com aproximadamente 80 nm de diâmetro, possuindo continuidade com a membrana do retículo endoplasmático. Nas formas tripomastigotas o núcleo é central e alongado, enquanto que nas formas epimastigotas e amastigotas é arredondado.

Durante o processo de divisão celular ocorrem mudanças na organização do material nuclear, tais como o aparecimento de microtúbulos intranucleares, dispersão da cromatina, aparecimento de placas densas, desaparecimento do nucléolo (o mesmo reaparece nas fases finais da divisão celular). No entanto, a membrana nuclear se mantém intacta (DE SOUZA, 2002; DE SOUZA, 2009). Embora o núcleo contenha todas as informações vitais para os tripanossomatídeos, poucos são os estudos realizados sobre a sua estrutura e funcionalidade.

Figura 7 - Ilustração da forma Epimastigota do *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares



Fonte - Atlas do *T. cruzi*. Fundação Oswaldo Cruz (2010)

1.4 Quimioterapia da doença de Chagas

A terapêutica da doença de Chagas teve início em 1909, logo após a descoberta da doença e consistia no uso de medicamentos a base de arsênio e antimônio. Entre os agentes quimioterápicos empregados de 1936 a 1960 destacam-se os derivados de quinoleínas, antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsemicais. No final da década de 60 e início de 1970 duas drogas o nifurtimox e o benzonidazol surgiram com melhores perspectivas para o tratamento da doença de Chagas tanto pelo potencial curativo, particularmente na fase aguda, como pela tolerância. Ambas as drogas promovem um efeito supressivo da parasitemia em

indivíduos infectados durante a fase aguda. Porém, o benzonidazol demonstra ser mais eficiente que o nifurtimox. Entretanto, deve-se levar em consideração que a eficácia destes compostos varia de acordo com a susceptibilidade das cepas de *T. cruzi* encontrada em determinadas áreas geográficas. Isto talvez possa explicar os resultados contraditórios obtidos após o tratamento específico para a doença de Chagas (ANDRADE et al., 1992; KIRCHHOFF, 1999). A chance de cura durante o tratamento na fase aguda é de aproximadamente 70 a 80%, enquanto que na fase crônica a probabilidade de cura fica em torno de 10 a 20% (COURA; DIAS, 2009), mostrando a baixa eficácia das drogas nesta fase (COURA; DE CASTRO, 2002; JANNIN; VILLA, 2007; URBINA; DOCAMPO, 2003).

Apesar de ter sido um grande avanço para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol não são considerados drogas ideais, pois causam toxicidade sistêmica e sérios efeitos colaterais, tais como anorexia, dermatites, leucopenia, distúrbios neurológicos, dentre outros (**Tabela 1**) (CASTRO et al., 2006; PÉREZ-MOLINA et al., 2009), o que leva à descontinuidade do tratamento. Além do mais, os fatores socioeconômicos dos países endêmicos para a doença de Chagas levam ao desinteresse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novas drogas, visto que são países subdesenvolvidos em que a maioria da população vive com menos de US\$ 2 por dia (LIESE; SCHUBERT, 2009).

Tabela 1 - Frequência de efeitos colaterais em adultos associado ao uso do nifurtimox e benzonidazol.

Efeitos colaterias	% de pacientes	Efeitos colaterias	% de pacientes
NIFURTIMOX		BENZINIDAZOL	
Anorexia	50-75	Dermatite alérgica	29-50
Náusea	15-50	Parestesia	0-30
Vômitos	15-26	Neuropatia periférica	0-30
Desconforto abdominal	12-40	Anorexia	5-40
Dor de cabeça	13-70	Náusea e vômitos	0-5
Vertigem	12-33	Leucopenia	<1
Alterações de humor	10-49	Trombocitopenia	<1
Insônia	10-54		
Mialgia	13-30		
Neuropatia periférica	2-5		
Diminuição da memória	6-14		
Leucopenia	<1		

Fonte: Adaptado de Bern (2011)

O esquema de tratamento do benzonidazol para adultos consiste em 5 a 7,5 mg/kg por dia, dividido em duas doses e administrado oralmente durante 60 dias. Em crianças com idade superior a 12 anos a recomendação é uma dose não superior a 10 mg/kg ao dia. Para o nifurtimox, é recomendado 8 a 10 mg/kg ao dia, dividido em 3 ou 4 doses e administrado oralmente em um período de 90 dias. Para crianças menores de 15 anos, a dose é de 12,5 a 15 mg/kg ao dia. Em ambos os tratamentos, após 10 dias do início, os pacientes devem ser acompanhados semanalmente para a monitoramento dos efeitos colaterais. No Brasil, o uso do nifurtimox foi descontinuado, visto que os benefícios do tratamento não eram superiores aos riscos associados a este tratamento (BERN, 2011). Recentemente, o Laboratório farmacêutico do estado de Pernambuco (Lafepe) deteve o direito de produzir o comprimido de benzonidazol para o tratamento da doença de Chagas, inclusive para paciente infantil, tornando-se o único fabricante mundial.

Uma droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deve apresentar os seguintes requisitos: a) produzir cura parasitológica nos casos agudos e crônicos; b) não produzir efeitos colaterais importantes, além de não induzir resistência parasitológica e; c) ter baixo potencial de genotoxicidade, teratogenicidade e cardiotoxicidade, visto que o coração é o primeiro órgão a ser afetado na doença de Chagas; d) ser barata, de fácil aplicação (de preferência ser administrada por via oral) e acessível aos pacientes, e) deve atuar sobre as formas tripomastigotas e principalmente as amastigotas; e por fim f) ter atividade contra diversas cepas de *T. cruzi* (BUCKNER; NAVABI, 2010; URBINA; DO CAMPO, 2003). Mesmo depois de décadas de pesquisas ainda não existem compostos que promovam a cura dos pacientes chagásicos, e que sejam capazes de substituir as únicas drogas existentes para o tratamento desta enfermidade (CASTRO et al., 2006).

O desenvolvimento de um novo fármaco para a doença de Chagas pode surgir através da prospecção de produtos naturais e sintéticos que tenham similaridade com compostos usados para outras doenças e/ou através da determinação de alvos específicos identificados em vias metabólicas essenciais para o *T. cruzi* (COURA; DE CASTRO, 2002; GERPE et al., 2006; IZUME et al., 2011). Além do mais, o conhecimento das estruturas químicas do benzonidazol e do nifurtimox tem permitido alterações nessas estruturas básicas ou a construção de novas moléculas com características semelhantes aos seus grupos funcionais levando ao avanço no desenvolvimento de drogas sintéticas contra a doença de Chagas (RODRÍGUEZ et al., 2009).

Vários grupos de pesquisa vêm produzindo compostos nitroaromáticos semelhantes ao nifurtimox e o benzonidazol, na esperança de encontrar moléculas mais seguras e mais eficazes sob o ponto de vista terapêutico. Destacam-se os derivados do 5-nitro-2-furil que apresentam excelente atividade supressora em ratos com uma menor citotoxicidade aguda que o nifurtimox (CABRERA et al., 2009). No entanto, alcançar uma máxima atividade antiparasitária associada a um mínimo de toxicidade é um grande desafio para drogas como o nifurtimox.

Vários estudos têm permitido a identificação de alvos potenciais como enzimas e vias metabólicas importantes para a sobrevivência do parasita, e muitos destes demonstram resultados bastante promissores (URBINA; DO CAMPO, 2003; MAYA et al., 2007). Dentre os estudos destacam-se compostos que inibem a cruzipaina, uma das principais cisteína protease. O composto K-777 é capaz de inibi-la e encontra-se em estudos pré-clínicos avançados (McKERROW et al., 2009). Este composto apresentou atividade tripanocida em ratos infectados com *T. cruzi* quando administrado intraperitonealmente, além de não apresentar toxicidade aparente (BRAK et al., 2010).

Drogas antifúngicas tais como, posaconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol e econazol, as quais têm como alvo enzimas responsáveis pela síntese de ergosteróis (OLIVIERE et al., 2010; URBINA, 2009), têm demonstrado induzir a cura parasitológica em ratos com infecção aguda e crônica (URBINA, 2002).

O miltefosina é outro composto que age sobre alvos específicos do *T. cruzi* bloqueando de forma seletiva a biossíntese da fosfatidilcolina através da via de transmetilação de Greenberg (URBINA, 2003). Estudos *in vitro* demonstram a sua potente atividade contra onze cepas de *T. cruzi* (LUNA et al., 2009) e uma atividade supressora da infecção, porém não curativa em camundongos infectados com *T. cruzi* (CROFT, 1996).

Os pirofosfatos inorgânicos são os compostos fosfatados que mais geram energia nos tripanossomatídeos, possuem cerca de 10 a 15 vezes mais energia que uma molécula de ATP e estão distribuídos por toda a célula, concentrando-se principalmente nos acidocalcisomas, sendo indispensáveis para a sobrevivência do parasita. Compostos nitrogenados análogos aos pirofosfatos, tais como pamidronato, alendronato e risedronato atuam *in vitro* sobre as formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e eliminam completamente a parasitemia e as formas amastigotas durante a fase aguda em ratos (GARZONI et al., 2004).

Dentre os compostos que agem sobre alvos não específicos do *T. cruzi* destacam-se a diamina e a pentamidina, os quais são usados há décadas contra leishmaniose e tripanossomíase africana (BERMAN, 2003; MAUDLIN, 2006). A arilimidamida DB766 suprimiu a parasitemia e preveniu a morte de camundongos em ensaios *in vivo*. Além disso, apresentou considerável atividade contra a cepa colombiana resistente. No entanto esta droga não foi capaz de alcançar a cura parasitológica (BATISTA et al., 2010). De todas as arilimidamidas, a DB613A mostrou-se ainda mais eficaz contra amastigotas intracelulares com uma baixa concentração necessária para inibir a infecção por essas formas (PACHECO et al., 2009).

Moléculas carreadoras têm sido utilizadas em estudos com drogas anti-*T. cruzi* (NOGUEIRA et al., 2008; SANCHES-DELGADO; ANZELLOTI, 2004). A aplicação mais recente destas pesquisas emprega complexos de rutênio, $[\text{RuCl}([\text{15}] \text{aneN}_4)\text{NO}]^{2+}$, para carrear e lançar o óxido nítrico para dentro de macrófagos infectados com *T. cruzi*. Este complexo tem apresentando atividade tripanocida *in vitro* (GUEDES et al., 2010) e atingido a cura parasitológica em 30% dos camundongos em estudos *in vivo*. Quando combinado com o benzonidazol a cura alcançou níveis de 80%, com baixa toxicidade nas doses testadas. É provável que haja um efeito sobre a resposta imune inata do hospedeiro, contribuindo desta forma, para a atividade biológica deste complexo (SILVA et al., 2010). Complexos similares, tais como o $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_{4\text{isn}}](\text{BF}_4)_3$ foram testados em ratos infectados com *T. cruzi* eliminando ninhos de amastigotas no tecido do miocárdio e foi capaz de conferir uma sobrevida aos animais por 15 dias usando 400nmol/kg. Paradoxalmente, houve um aumento na infecção deste tecido quando tratado com doses mais elevadas do complexo, reforçando a ideia que a modulação da resposta imune do hospedeiro está em jogo além de qualquer atividade antiparasitária direta (SILVA, et al., 2009).

1.4.1 Produtos naturais

As plantas e seus extratos são potentes agentes farmacêuticos que vêm sendo utilizados tradicionalmente por culturas nativas no tratamento de diversas doenças infecciosas e parasitárias (OKIGBO; MMEKA, 2008; SANTORO et al., 2007). Segundo a organização mundial de saúde, 80% da população mundial recorrem às plantas como fonte de tratamento (BRADACS et al., 2010). A grande biodiversidade da flora brasileira (cerca de 16% das 500.000 espécies de plantas que existem no mundo encontram-se na floresta Amazônica), constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas

substâncias com finalidade terapêutica (BASSO et al., 2005; KORDALI et al., 2008; MYERS et al., 2000), logo a procura por novos agentes quimioterápicos sempre representa uma área aberta à investigação.

Ao longo dos anos, a busca por compostos naturais extraídos de plantas tem se intensificado, principalmente pela elevada incidência de efeitos colaterais, ausência de eficácia na terapêutica, os altos custos na sua produção e o grande aumento na resistência às drogas convencionais (UPCROFT; UPCROFT, 2001). O melhor conhecimento nos modos de ação dos extratos de plantas tem possibilitado o avanço nas pesquisas visando encontrar uma molécula ativa com baixa toxicidade, tudo isso associado ao baixo custo na sua produção.

As propriedades medicinais das plantas como a atividade antioxidante, antimicrobiana (MAHADY, 2005), antipirética, antifúngica (DE BÔER et al., 2005), e principalmente, contra diversos parasitas humanos (PHILLIPSON, 2003) podem estar relacionadas aos seus constituintes, tais como os terpenos, lignanas, chalconas, lactonas, alcalóides, entre outros (SOETAN; AIYELAAGBE, 2009).

A perspectiva no desenvolvimento de novas drogas para a doença de Chagas tem levado nos últimos 15 anos ao “screening” de aproximadamente 400 espécies de plantas pertencentes a mais de 100 famílias com atividade tripanocida, a partir de extratos vegetais, compostos isolados e principalmente, substâncias derivadas do metabolismo secundário (COURA; DE CASTRO, 2002, IZUME et al., 2011; PINTO; DE CASTRO, 2009). O mecanismo de ação destes produtos naturais é bastante amplo, alguns bloqueiam a cadeia respiratória do parasita como, por exemplo, os alcalóides e naftoquinonas extraídas de *Calceolaria sessilis* (MORELLO et al., 1994) e de algumas plantas brasileiras (TEMPONE et al., 2005). Outros produtos inibem a resposta do *T. cruzi* ao estresse oxidativo originando radicais superóxido (MAYA et al., 2006). Uma proteína extraída de sementes de *Bahinia balviniodes* foi capaz de inibir a síntese da cruzipaina (DE OLIVEIRA et al., 2001). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação destes produtos naturais.

As lignanas são uma classe importante de fitoestrogênios similares ao estrogênio, porém o seu mecanismo de ação ainda não é conhecido. A lignana lactona extraída da planta de *Piper cubeba* mostrou uma atividade tripanocida *in vivo* em camundongos infectados com *T. cruzi*, levando a uma redução de 20% na infecção dos tecidos quando comparada ao controle. Além do mais, a administração oral foi tão eficaz quanto à intraperitoneal

(ESPERADIM et al., 2010). Outras lignanas extraídas de *Aristolochia cymbifera* se mostraram bastantes ativas contra amastigotas de *T. cruzi* (SARTORELLI et al., 2010).

Mas recentemente, a atividade tripanocida do sesquiterpeno Psilostachyn C, um composto natural isolado da *Ambrosia scraba*, foi investigado. Este composto exerceu efeito significativo contra as três formas evolutivas de *T. cruzi* com valores de concentração inibitória não superior a 3,5 µg/mL, além de apresentarem baixa toxicidade sobre células de mamíferos (SULSEN et al., 2011).

1.4.1.1 Óleos essenciais

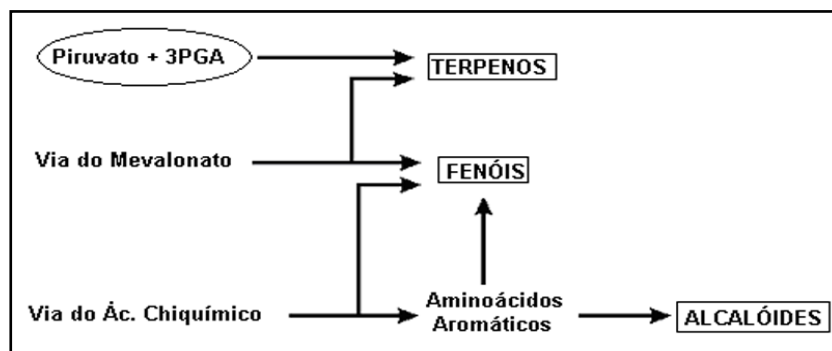
Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica, entretanto é a volatilidade, além de ter o aroma agradável e intenso, sendo por isso, chamados de essências (SIMÕES; SPITZER, 1999). Estes óleos podem estar presentes nas mais diversas partes das plantas, como nas flores, folhas, cascas, troncos, galhos, raízes, rizomas, frutos ou sementes; porém sua composição pode variar de acordo com esta localização (SIMÕES et al., 2000). Embora apresentem cor e aspecto semelhante, a composição química destes óleos, características físico-químicas e odores podem ser diferentes e variar significativamente. Além do mais, fatores como a época da coleta, estágio de desenvolvimento da planta, condições climáticas e do solo podem também causar variações na sua composição (REIS et al., 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas, normalmente sintetizados nas folhas em estruturas chamadas tricomas glandulares, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular. Este metabolismo secundário desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, atuando nos mecanismos de defesa das plantas às condições adversas. Assim, estes produtos agem como defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbioses (SILVA; CASALI 2000).

Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (**Figura 8**). Os terpenos são formados a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Em termos químicos, os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído

por um grupamento hidroxila. Já os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico, ou de aminoácidos alifáticos (PERES, 2004).

Figura8 - Principais vias do metabolismo secundário das plantas.

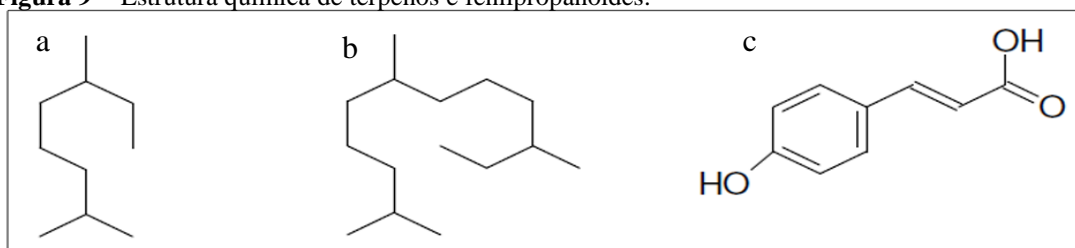


Fonte: Peres (2004).

Os constituintes principais dos óleos essenciais pertencem à classe dos terpenos/terpenóides e os fenilpropanóides (**Figura 9**). Embora os terpenos sejam os constituintes químicos preponderantes nos óleos essenciais, sempre que os fenilpropanóides estão presentes fornecem um sabor e odor indispensáveis e significativos ao óleo. Biogeneticamente, terpenos e fenilpropanóides originam-se de metabolitos precursores diferentes além de serem gerados por rotas biossintéticas completamente distintas (SANGWAN et al., 2001).

Os principais terpenos presentes nos óleos essenciais são os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e os sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) que se diferem de acordo com a quantidade de unidade de isoprenos presentes. Dentre os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis, destacam-se: linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno, timol e carvacrol. Já entre os sesquiterpenos mais comuns encontram-se o farnesol, nerolidol, bisaboleno, entre outros. Na mistura, tais compostos estão presentes em diferentes concentrações, normalmente variando de acordo com as características de cada planta. O componente principal de um óleo pode constituir até 85 % do mesmo (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Figura 9 - Estrutura química de terpenos e fenilpropanóides.



Fonte: A autora

Legenda: a) e b) Terpenos; c) fenilpropanóides

As mais importantes aplicações comerciais dos óleos essenciais são na indústria alimentícia (como flavorizantes), de cosméticos e perfumes (fragâncias) (ANTHONY et al., 2004). Além disso, podem ser usados no desenvolvimento de novas drogas alternativas, pois apresentam um amplo espectro de efeitos farmacológicos, com atividades: antiviral (BISHOP, 1995), antimicótica (MARI et al., 2003), antihelmínica (PESSOA et al., 2002) e antibacteriana (MOUREY; CANILAC, 2002). Estudos recentes demonstraram potencial ação inibitória de diversos óleos essenciais contra vários protozoários humanos tais como: *Plasmodium falciparum*. (TCHOUMBOUGNANG et al., 2005), *Giardia lamblia* (ALMEIDA et al., 2007), *Leishmania* sp. (DE MEDEIROS et al., 2011; MIKUS et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008; SANTIN et al., 2009; UEDA-NAKAMURA et al., 2006) e *Trypanosoma cruzi* (NOBRET; WINK, 2010; SANTORO et al., 2007; SANTORO et al., 2007b; SANTORO et al., 2007b).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais vêm sendo evidenciadas há algum tempo (SHELEF, 1983) e recentemente o interesse nestas substâncias aumentou consideravelmente (ANTHONY, et. al. 2004). Além do mais, propriedades, tais como seu efeito imunomodulatório, anti-inflamatório, baixa densidade, rápida difusão por membranas celulares devido a sua natureza lipofílica podem contribuir para eficácia dos seus componentes contra alvos intracelulares (ROCHA et al., 2005). Podendo ainda oferecer alternativas para as vias de administração, incluindo a via transcutânea. No entanto, o modo de ação destes óleos ainda é controverso e pesquisas adicionais se fazem necessárias.

1.4.1.1.1 *Lippia sidoides*

Lippia sidoides Cham (Verbenaceae) (**Figura 10**) é uma planta aromática do Nordeste do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, popularmente conhecida como alecrim-pimenta. Apresenta ampla utilização na medicina popular principalmente como anti-séptico (LE MOS et al., 1990; LACOSTE et al., 1996). Em virtude destas propriedades, este vegetal é cultivado em hortos de plantas medicinais e faz parte do elenco de plantas selecionadas pelo Governo como fitoterápico. Esta espécie produz um óleo essencial rico em timol e carvacrol e apresenta propriedades bactericida, fungicida, moluscicida e larvicida (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2004; GIRÃO et al., 2003; KUNLE et al., 2003; LEAL et al., 2003).

Figura 10 - *Lippia sidoides*.

Fonte: Plantas medicinais (LIPPIA ..., 2010)

1.4.1.1.2 *Lippia origanoides*

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) (**Figura 11**) é um arbusto aromático, de até 3 m de altura (JANSEN-JACOBS, 1988; MOLDENKE, 1965). A espécie é nativa de alguns países da América Central (México, Guatemala e Cuba) e norte da América do Sul, especialmente na Região Amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) (PASCUAL et al., 2001). Esta planta é popularmente conhecida como Orégano de monte. É amplamente utilizada para fins culinários e medicinais, principalmente em doenças gastrointestinais e respiratórias (OLIVEIRA, 2004; PASCUAL et al., 2005). Assim como o óleo essencial de *Lippia sidoides*, o óleo de *L. origanoides* também é rico em timol e carvacrol. Um estudo etnobotânico realizado no estado do Pará-Brasil, destacou a ampla utilização desta planta como uma especiaria. Este mesmo estudo revelou que a infusão feita a partir das folhas e flores é indicada para o tratamento de dor de estômago, cólica, indigestão, diarreia, azia, náuseas, flatulência, corrimentos vaginais, e febre, assim como um anti-séptico para a boca e garganta (OLIVEIRA, 2004).

Figura 11 - *Lippia origanoides*.

Fonte: Plantas medicinais (LIPPIA..., 2011)

1.4.1.1.3 *Ocimum gratissimum*

Ocimum gratissimum L. (Labiatae) (**Figura 12**) é uma planta aromática originária da África e Ásia popularmente conhecida como alfavaca, cultivada subespontaneamente em todo o Brasil, devido a sua adaptação a regiões tropicais (CRAVEIRO et al., 1981). As plantas do gênero *Ocimum* são normalmente caracterizadas pelas diferentes composições químicas de seus óleos essenciais. As suas propriedades antimicrobianas são atribuídas a essas variações (SIVROPOULOU et al., 1996). É popularmente usado no tratamento de diversas doenças, por exemplo, infecções do trato respiratório, diarreia, febre, doenças de pele e pneumonia. Por seu sabor e odor semelhantes ao do cravo-da-índia, é usada também como condimento na culinária (EFFRAIM, 2001; LORENZI, 2002; LORENZI, 2008). Dentre os componentes presentes no óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, o eugenol é o principal, sendo a ele atribuído as atividades analgésicas, antifúngicas e antibacterianas (AKINYEMI et al., 2004; LEMOS et al., 2005; LOPEZ et al., 2005; NAKAMURA et al., 1999).

Figura 12 - *Ocimum gratissimum*.



Fonte: Prelude Medicinal Plants Database specialized in Central (OCIMUM..., 2011)

1.4.1.1.4 *Chenopodium ambrosioides*

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) (**Figura 13**) planta herbácea nativa da América tropical, originária provavelmente do México, encontra-se largamente distribuída pelo território brasileiro, onde recebe vários nomes populares, dentre

eles “mastruz” (JAMART, 2000). Sua ampla utilização deve-se à presença de altos teores de ascaridol (seu óleo essencial possui mais de 60% de ascaridol), o qual é responsável pelas propriedades anti-helmínticas em *Ancilostoma duodenalis*, *Trichuris tricurria* e *Ascaris lumbricoides* (GIOVE, 1996). Este óleo também possui atividade contra *Trypanosoma* (KIUCHI et al., 2002), *Leishmania braziliensis* (FRANÇA, 1996) e *Plasmodium falciparum* (POLLACK et al., 1990). Propriedades antifúngicas foram demonstradas com ação contra *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium trichoides* (DELESPAUL et al., 2000; KISHORE et al., 1993).

Figura 13 - *Chenopodium ambrosioides*



Fonte: Plantas medicinais e fitoterapia (CHENOPODIUM..., 2011)

1.4.1.1.5 *Justicia pectorales*

Justicia pectorales var. (Acanthaceae) (**Figura 14**) é uma planta herbácea medicinal conhecida popularmente por chambá, nativa da América tropical e distribuída por toda a zona continental. Usada na medicina popular do Norte e Nordeste do Brasil, no tratamento de asma, tosse, bronquite, além de dores e inflamação (BARROS, 1992; VIANA et al., 2004). Os estudos sobre a atividade biológica do óleo essencial de *Justicia pectorales* são quase inexistentes, sabe-se que seus efeitos medicinais são atribuídos a presença de cumarina (MATOS, 1998).

Figura 14 - *Justicia pectorales*

Fonte: Plantas medicinais e fitoterapia (JUSTICIA..., 2011)

1.4.1.1.6 *Vitex agnus-castus*

O *Vitex agnus castus* L. (Verbenaceae) (**Figura 15**) é um arbusto aromático conhecido popularmente como Alecrim-de-Angola, é utilizado em propósitos sociais e religiosos pelos descendentes culturais dos africanos. *V. agnus-castus* possui efeitos estimulante e normalizador das funções da glândula pituitária, especialmente a função da progesterona, restabelece o equilíbrio normal estrógeno/progesterona e reduz alguns sintomas indesejáveis da menopausa, associados com a redução da produção de progesterona. É indicado no tratamento da dismenorreia, estresse pré-menstrual e outras desordens relacionadas com a função hormonal. Seu óleo essencial é rico em limoneno, 1,8 cineol e sabineno (KUSTRAK; BLAZEVIC, 1992; ZOGHBI et al., 1999).

Figura 15 - *Vitex agnus-castus*.

Fonte: Horticultural Photography (VITEX..., 2011)

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o potencial dos óleos essenciais como agentes quimioterápicos contra doenças causadas por parasitas, além da grande necessidade para o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes, com menos efeitos colaterais e baixo custo associado para o tratamento da doença de Chagas; o estudo de seus efeitos sobre parasitas tais como *T. cruzi*, constitui um amplo campo para investigação. Assim, o presente projeto objetivou avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas comumente utilizadas na medicina popular e encontradas no nordeste do Brasil, sobre o crescimento, viabilidade e ultraestrutura das diferentes formas evolutivas de *T.cruzi*, bem como o efeito destes compostos sobre a interação destes parasitas com macrófagos e a produção de óxido nítrico por macrófagos.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os efeitos causados por óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro sobre as três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*, bem como sua citotoxicidade sobre as células de mamíferos?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a atividade biológica dos óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro sobre as três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;
- b) Determinar a atividade biológica sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com os diferentes óleos essenciais;
- c) Avaliar o efeito citotóxico dos óleos essenciais sobre as células de mamíferos (Macrófagos);
- d) Analisar o percentual de inibição e o índice de sobrevivência de amastigotas de *T. cruzi* em cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com os óleos essenciais mais promissores;
- e) Avaliar o efeito dos óleos essenciais mais promissores sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos;
- f) Analisar as alterações morfológicas induzidas pela ação dos óleos essenciais mais promissores, através da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*;
- g) Verificar a viabilidade da membrana plasmática e mitocôndria das formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com diferentes óleos essenciais por citometria de fluxo e microscopia confocal a laser;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Plantas e extração dos óleos essenciais

Lippia sidoides (LS), *Lippia origanoides* (LO), *Chenopodium ambrosioides* (CA), *Ocimum gratissimum* (OG), *Justicia pectorales* (JP) e *Vitex agnus-castus* (VAC) foram coletadas no Jardim Botânico de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina/PI, Brasil. Os óleos essenciais (OEs) foram obtidos por hidrodestilação, através do aparelho de Clevenger (**Figura 16**). Para tal, foram pesadas aproximadamente 100 g de cada amostra e transferidas para um balão volumétrico ao qual se adicionou 1 L de água destilada. Acoplou-se ao balão o aparelho de Clevenger, iniciando-se a hidrodestilação. Uma manta de aquecimento foi utilizada como fonte de calor. O processo de extração foi monitorado a cada 30 minutos, até o final do período total de cinco horas. O tempo de extração foi determinado em função do rendimento de cada óleo essencial. Seis extrações foram realizadas e monitoradas. As amostras de óleo essencial obtidas nos diferentes tempos de extração foram transferidas para microtubos eppendorf, armazenadas a -20°C por no máximo uma semana e posteriormente analisadas para a identificação dos constituintes.

Figura 16 - Sistema de hidrodestilação aparelho de Clevenger



Fonte: Medeiros (2011)

5.2 Análise química dos óleos essenciais

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi feita através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) na Universidade Federal do Piauí (**Figura 17**). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-17A acoplado a um espectrômetro de massa GCMS-QP5050A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (95% polidimetilsiloxano e 5% de fenil, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura do filme de fase fixa). A programação utilizada para injeção e corrida das amostras foi à seguinte: injetor = 220 °C, detetor = 240 °C, coluna = 60 °C a 240 °C, 3 °C.min⁻¹. O gás de arraste utilizado foi hélio, com vazão de 1 mL.min⁻¹. Os espectros de massas foram comparados com as entradas da biblioteca eletrônica Wiley 229 e conferidos visualmente com espectros de massas disponíveis na literatura (ADAMS, 2007). A identificação dos constituintes voláteis foi feita por comparação: dos índices de Kovats dos espectros de massas com a biblioteca de espectros do CG-MS e com dados da literatura, como descrito previamente (ADAMS 2007; DE LIMA et al., 2009).

Os OEs foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), à 50 mg/mL e armazenados a 4 °C na ausência de luminosidade até o uso. Soluções estoques (1 mg/mL) foram diluídas em DMSO e as soluções de trabalho foram diluídas em meio de cultura, a partir desta solução em concentrações variando de 250 a 15,6 mg/mL, de modo que a concentração final de DMSO não excedeu 0,2%, concentração não tóxica para o protozoário.

Figura 17 - Cromatográfico gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/MS)



Fonte: Medeiros (2011).

5.3 Parasitas

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Dm28c, foram mantidas em meio LIT (Liver infusion triptose) (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 28 °C em estufa e repicadas duas vezes por semana. Para os experimentos foram utilizados parasitas na fase log de crescimento (3 dias).

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram obtidas a partir de cultura de células Vero infectadas e cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma–Aldrich Co., USA) suplementado com 10% SFB, e adicionado 100 UI / mL de penicilina e 100 lg / mL de estreptomicina (DE SOUZA et al., 2004). Alternativamente, estas formas foram obtidas por punção cardíaca (**Figura 18**) de camundongos albinos Swiss de 30 dias, infectados no pico da parasitemia. O sangue obtido foi acondicionado em tubo Falcon (15 mL) e centrifugado por 15 minutos a 500 g para isolar os parasitas das hemácias e dos leucócitos. O pellet formado foi mantido por 30 min a 37 °C, para permitir a migração dos parasitas para o sobrenadante. O sobrenadante contendo os parasitas isolados foi transferido para o meio RPMI enriquecido com 10% SFB, e mantidos a 37 °C em uma incubadora a 5% CO₂ até o uso.

Formas amastigotas foram obtidas a partir de cultura primária de macrófagos peritoneal de camundongo Balb/c. Para tal, os macrófagos foram retirados em condições estéreis através da inoculação via intraperitoneal de 8 mL de meio RPMI, e então após 1 minuto de homogeneização o meio foi retirado e armazenado em tubo Falcon a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, os macrófagos foram aderidos em placa de 24 poços a uma concentração de 3×10^5 céls/mL em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e mantidos por 24 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Por fim, os poços foram lavados com meio RPMI para a retirada dos macrófagos não aderidos e então infectados com formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* na proporção de 1:10 por 4 h a 37 °C.

Figura 18 - Obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*



5.4 Atividade tripanocida dos OEs

Cultura de epimastigotas contendo 2×10^6 parasitas/mL foram incubadas a 28 °C na ausência ou presença de diferentes concentrações (250 – 15,6 µg/mL) de OEs. O crescimento celular foi avaliado durante 4 dias por contagem direta em câmara de Neubauer. O parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento foi a IC₅₀, o qual corresponde à concentração da droga capaz de inibir em 50 % a proliferação dos parasitas, calculado para cada um dos óleos testados após 48 horas de tratamento.

Formas tripomastigotas sanguíneas foram incubadas a 37 °C na concentração de 2×10^6 parasitas/mL com diferentes concentrações (100 – 6,3 µg/mL) de OEs, e a CL₅₀ (Concentração que inviabiliza 50% dos parasitas) foi avaliada por contagem direta dos parasitas em câmara de Neubauer após 24 horas de tratamento. Como controle destes experimentos, os parasitas foram incubados em meio de cultura específico na ausência do tratamento. Para cada experimento, foram feitos três ensaios independentes em triplicata.

Macrófagos aderidos em lamínulas e infectados com formas amastigotas de *T. cruzi* foram tratados com diferentes concentrações (100 – 12,5 µg/mL) dos OEs e após 48 horas de tratamento os macrófagos foram fixados em metanol por 5 minutos e corados em solução de Giemsa (1:20) em água destilada (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos e então as lamínulas foram lavadas e montadas em lâminas com entellan. O efeito dos OEs sobre as formas amastigotas foi avaliado através dos seguintes parâmetros: a) a concentração que inibe 50% a proliferação das amastigotas (IC₅₀); b) o índice de sobrevivência das amastigotas, o qual foi determinado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número de amastigota por célula infectada (VENDRAMETTO et al., 2010). Como controle, macrófagos infectados e não tratados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

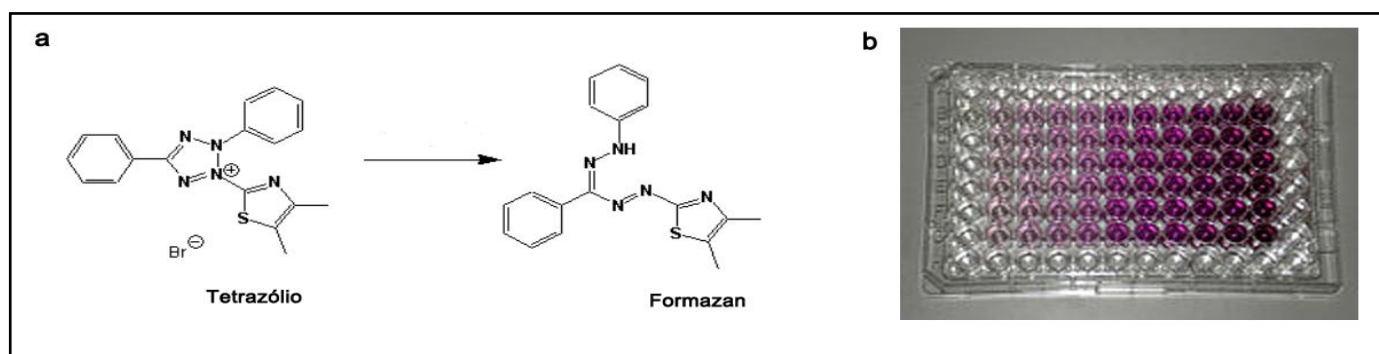
A IC₅₀ para formas epimastigotas e amastigotas e CL₅₀ para formas tripomastigotas. Foram determinadas através de uma análise de regressão pelo programa SPSS 8.0 para Windows.

5.5 Citotoxicidade em células de mamíferos

Com objetivo de testar o efeito citotóxico dos OEs sobre células de mamíferos utilizamos a técnica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolium) (MOSMANN, 1983). O teste se baseia em uma reação colorimétrica formada pela redução de sais de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas a Formazan (**Figura 19**). Macrófagos previamente aderidos em microplacas de 96 poços a uma

concentração de 5×10^4 céls/mL foram tratados com os diferentes OEs por 48 h e o controle formado por células não tratadas. Após a incubação os macrófagos foram lavados em meio RPMI e incubados a uma concentração de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído no próprio meio, por 3 horas a 37 °C. Posteriormente, as células foram solubilizadas em DMSO (100 µl/poço) para que os cristais formados fossem dissolvidos. A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração 50% citotóxica (CC₅₀) para as células de mamíferos foi determinada através da análise de regressão usando o programa SPSS 8.0 para Windows. O índice de seletividade (SI), que determina a seletividade da droga para as células de mamíferos ou para os parasitas, foi calculado através da razão entre os valores da CC₅₀ e da IC₅₀. Cada ensaio foi feito em quadruplicata em três experimentos independentes.

Figura 19 – Método do MTT



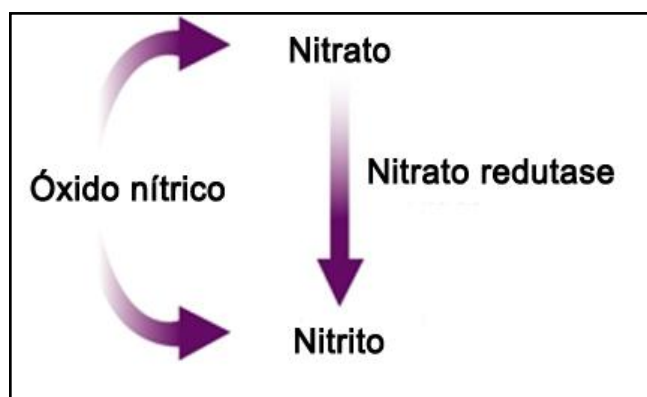
Fonte: A autora (2010).

Legenda: a) Redução do sal tetrazólio em formazan; b) Reação colorimétrica do MTT.

5.6 Produção de óxido nítrico

A fim de analisarmos o possível efeito imunomodulatório dos diferentes óleos essenciais sobre a produção de óxido nítrico, 50 µl do sobrenadante da cultura de macrófagos tratados ou não com os OEs foram incubados com 150 µl do reagente Griess (1% sulfanilamide/ 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 490nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando o Nitrito de Sódio como padrão através da reação de Griess (Figura 20).

Figura 20 - Reação de Griess



Fonte: A autora (2011).

5.7 Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal a Laser

Para análise do possível efeito dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. origanoides* sobre a viabilidade celular, bem como sobre a membrana plasmática e a mitocôndria, os traçadores utilizados foram, Live/Dead (Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit, Molecular Probes) (2 μM de calceína-AM e 4 μM de homodímero de etídio), Rodamina 123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e MitoSox (5 $\mu\text{M}/\text{mL}$). Para tal, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com a IC_{50} e $2 \times \text{IC}_{50}$ dos OEs de *L. sidoides* e *L. origanoides* por 48 h, e então foram incubadas com os marcadores descritos acima por 30 minutos a 37 °C e foram visualizadas ao microscópio confocal a laser. Como controle positivo as células foram tratadas por 30 minutos com etanol 70%, enquanto que o controle negativo foram células sem qualquer tratamento.

Para citometria de fluxo foram utilizados Live/Dead (Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit, Molecular Probes) (2 μM de calceína-AM e 4 μM de homodímero de etídio), e MitoSox (5 $\mu\text{M}/\text{mL}$). As células foram processadas da mesma forma descrita acima e a aquisição de dados e análise foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA, EUA), equipado com o software da Quest Cell (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San José, CA, EUA). Um total de 20.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida como a correspondente às formas normais de *T. cruzi*. Os valores obtidos foram analisados com o Windows Multiple Document Interface (versão 2.8) software para citometria de fluxo para a determinação da porcentagem da média de marcação para cada situação. Alterações na fluorescência do MitoSox foram quantificadas utilizando-se o índice de variação (IV), obtido através da equação $(\text{MT} - \text{MC}) / \text{MC}$, onde MT e MC correspondem a média fluorescente dos parasitas tratados e controle, respectivamente.

5.8 Estudo ultraestrutural

Nos tempos determinados, as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* após tratamento com a IC_{50}/CL_{50} e $2 \times IC_{50}/CL_{50}$ dos OEs foram centrifugadas por 10 minutos a 500 g e lavadas 2 vezes em PBS. A fixação foi feita através de uma solução de 2,5% Glutaraldeído, 4% Paraformaldeído em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C. Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas no escuro por uma hora em uma solução contendo 1% OsO_4 , 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM $CaCl_2$ em tampão cacodilato 0,1M, e então foram desidratadas em baterias crescentes de acetona e incluídas em resina Polybed 812. Cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss M109. Para a microscopia eletrônica de varredura, tripomastigotas tratados com os óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. origanoides* foram fixados e pós-fixados como descrito para microscopia eletrônica de transmissão e posteriormente foram aderidos em lamínulas contendo poli-L-Lisina por 20 minutos. As amostras foram desidratadas em baterias crescentes de etanol, secas através da metodologia do ponto crítico, utilizando-se CO_2 líquido, montadas em suporte próprio, metalizadas com uma camada de 20 nm de ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura SEM 510 Jeol.

5.9 Animais

Os camundongos da espécie *Mus musculus* e linhagem Albino Swiss e BALB/c, com aproximadamente 30 dias de vida, foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães (CECAL-FIOCRUZ) para a obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* e para obtenção de macrófagos peritoneais, respectivamente. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal desta mesma instituição (CEUA- FIOCRUZ) sob a licença de número L-001/08.

5.10 Análises estatísticas

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores

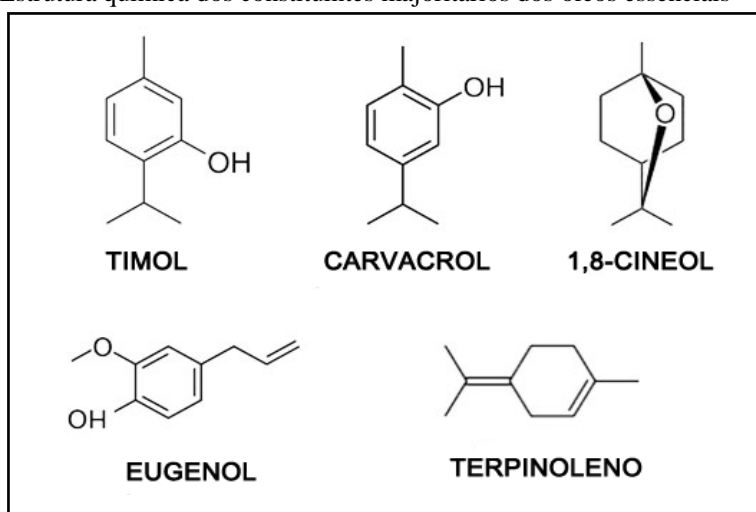
$p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA e os pós-teste de Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

6 RESULTADOS

6.1 Análise química dos óleos essenciais

A identificação química dos óleos essenciais foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC/MS) com determinação do índice de retenção de Kovats (RI). Os constituintes majoritários identificados nos diferentes OEs são apresentados na **tabela 2**. Dentre os vários constituintes identificados, os monoterpenos e/ou os sesquiterpenos foram preponderantes em todos os óleos. No óleo essencial de *L. sidoides*, o timol foi o mais abundante com 78,4%, os demais constituintes não apresentaram quantidade relativa superior a 6,5%. O carvacrol (37,3%), timol (22,4%), ρ -cymeno (15,6%) e γ -terpineno (10,9%) foram os mais abundantes em *L. origanoides*. 1,8-cineol foi o constituinte majoritário de *V. agnus-castus* (34,3%), seguido por *trans*-2,7-dimetil-oct-5-en-3-ino (13,2%) e α -terpenil acetato (10%). O óleo essencial de *O. gratissimum* teve o eugenol (38,4%) como seu principal constituinte, além do 1,8-cineol (21,6%) e (E)-Ocimeno (10%). A análise do óleo essencial de *J. pectorales* demonstrou a presença de apenas dois constituintes principais, o terpinoleno com 86,6% e o α -terpineno com 13,7%. Enquanto que o terpinoleno (69,9%), o ascaridol (17,1%) e o *trans*-3-carenen-2-ol (11,7%) foram os constituintes majoritários do óleo essencial de *C. ambrosioides*. Vários outros constituintes em concentrações inferiores a 10% foram revelados na análise química desses OEs. A estrutura química dos constituintes majoritários dos OEs estão representados na **figura 21**.

Figura 21 - Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais



Fonte: A autora (2011).

Legenda: Estrutura química dos constituintes majoritários dos OEs de *L. sidoides* (timol), *L. origanoides* (carvacrol), *V. agnus-castus* (1,8-cineol), *O. gratissimum* (eugenol), *C. ambrosioides* e *J. pectorales* (terpinoleno).

Tabela 2 - Quantidade relativa dos constituintes encontrados nos OEs

CONSTITUINTES	QUANTIDADE RELATIVA (%)							
	RI ^a	RI ^b (Exp.)	LS	LO	OG	VAC	JP	CA
Mirceno	990	988	0.4	2.3	1.6	3.4	----	----
α -Terpineno	1017	1018	0.4	----	----	0.8	13.7	----
<i>p</i> -Cimeno	1024	1022	6.3	15.6	----	2.0	----	----
Limoneno	1029	1028	0.4	----	----	----	----	----
1,8-Cineol	1031	1033	1.6	----	21.6	34.3	----	----
γ -Terpineno	1059	1062	1.1	10.9	----	1.7	----	----
Terpinen-4-ol	1177	1177	0.6	----	----	----	----	----
Timol metil éter	1235	1235	1.4	0.2	----	----	----	----
Timol	1290	1298	78.4	22.4	----	----	----	----
(E)-Cariofileno	1419	1418	6.2	2.1	5.5	----	----	----
Aromadendreno	1441	1433	0.5	----	----	----	----	----
α -Humuleno	1454	1452	0.3	----	----	----	----	----
Viridifloreno	1496	1489	0.4	----	----	----	----	----
Spatulenol	1578	1572	0.4	----	----	----	----	----
Cariofileno oxido	1583	1581	0.4	0.4	----	----	----	----
α -felandreno	1002	989	----	1.5	----	----	----	----
3,7,7-Trimetilbiciclo [4.1.0] hep-2-ene	-	1060	----	1.4	----	----	----	----
Linalol	1096	1091	----	0.3	1.2	----	----	----
<i>Cis</i> -7-Isopropilenilbiciclo [4.1.0] heptanos	-	1072	----	0.5	----	----	----	----
<i>Trans</i> -hidrato sabineno	1098	1102	----	0.2	----	----	----	----
(Z)-Ocimeno	1229	1228	----	0.3	----	----	----	----
Carvacrol	1299	1299	----	37.3	----	----	----	----
α -Copaeno	1376	1378	----	0.2	----	----	----	----
3-tert-Butil-4-metoxifenol	-	1393	----	1.1	----	----	----	----
(Z)-Cariofileno	1408	1408	----	0.2	----	----	----	----
δ -Cadineno	1523	1537	----	0.2	----	0.9	----	----
<i>trans</i> -2,7-dimetil-oct-5-en-3-ino	-	978	----	----	----	13.2	----	----
<i>cis</i> -2,7-dimetil-oct-5-en-3-ino	-	981	----	----	----	9.3	----	----
Ciclohex-3-ene-1-ol	-	1173	----	----	----	6.5	----	----
α -Terpineol	1188	1189	----	----	1.0	2.9	----	----
Linalil proprionato	1337	1330	----	----	----	0.9	----	----
α -Terpenil acetato	1349	1347	----	----	----	10.0	----	----
β -Fameseno	1456	1458	----	----	----	5.6	----	----
Germacreno-D	1485	1487	----	----	2.3	2.3	----	----
Dihidroscclareno	1974	1969	----	----	----	0.7	----	----
α -Pineno	939	935	----	----	1.9	----	----	----
Sabineno	975	972	----	----	1.8	----	----	----
β -Pineno	979	976	----	----	4.4	----	----	----
(E)-Ocimeno	1050	1049	----	----	10.0	----	----	----
Eugenol	1359	1356	----	----	38.4	----	----	----
β -Elemeno	1390	1380	----	----	0.5	----	----	----
γ -Muroleno	1479	1477	----	----	0.6	----	----	----
β -Selineno	1490	1490	----	----	5.5	----	----	----
α -Selineno	1498	1494	----	----	2.0	----	----	----
Terpinoleno	1088	1084	----	----	----	----	86.6	69.9
<i>trans</i> -3-Caren-2-ol	-	1227	----	----	----	----	----	11.7
Ascaridol	1237	1237	----	----	----	----	----	17.1
Isoascaridol	-	1303	----	----	----	----	----	1.3

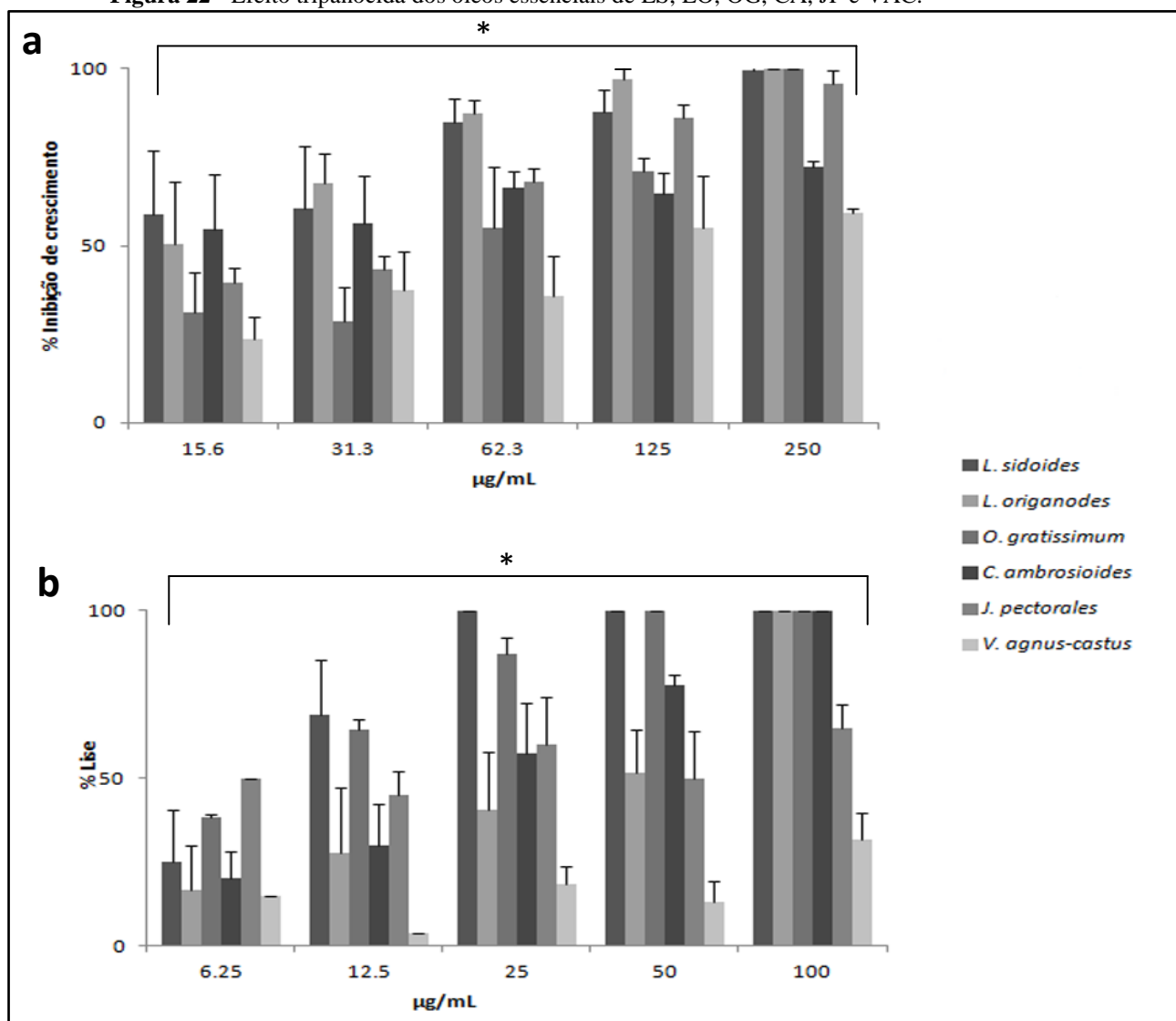
Fonte: Elaborado pela autora (2011).

Legenda: RI^a Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); RI^b Índice de retenção experimental

6.2 Atividade tripanocida dos Óleos essenciais

A análise da atividade dos óleos essenciais demonstrou que todos os OEs testados foram capazes de inibir o crescimento de formas epimastigotas e causar perda da viabilidade de formas tripomastigotas de maneira significativa em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$). Este efeito foi dose-dependente para ambas as formas (**Figura 22a e 22b**). Os OEs de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *O. gratissimum* foram capazes de inibir em 100% o crescimento das formas epimastigotas nas concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os óleos de *C. ambrosioides*, *J. pectorales* e *L. sidoides* e *L. origanoides* e *V. agnus-castus* não foram capazes de inibir totalmente, mesmo nas maiores concentrações testadas (**Figura 22a**). Já nas formas tripomastigotas os óleos de *L. sidoides* e *O. gratissimum* foram capazes de causar 100% de lise a partir da concentração de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Este índice de lise foi alcançado pelos OEs de *L. origanoides* e *C. ambrosioides* apenas na maior concentração testada, enquanto os OEs de *J. pectorales* e *V. agnus-castus* não foram capazes de atingir este patamar em nenhuma das concentrações testadas. O óleo essencial de *V. agnus-castus* foi o que se mostrou menos efetivo contra as formas tripomastigotas, pois mesmo na maior concentração este óleo não foi capaz de induzir 50% de perda de viabilidade nestas formas. (**Figura 22b**).

Figura 22 - Efeito tripanocida dos óleos essenciais de LS, LO, OG, CA, JP e VAC.



Fonte: A autora (2009)

Legenda: a) Efeito sobre o crescimento de formas epimastigotas tratadas com OEs; b) Efeito sobre a viabilidade de formas tripomastigotas. Cada barra representa a média de 3 experimentos em triplicata, \pm desvio padrão. * Valores estatisticamente significativos ($p < 0.05\%$)

A determinação da concentração que inibe em 50% a proliferação das epimastigotas (IC_{50}) mostrou que os OEs de *C. ambrosioides*, *L. origanoides* e *L. sidoides* foram os mais efetivos contra essas formas, exibindo valores de 21,3; 26,2 e 28,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Enquanto os OEs de *J. pectorales*, *O. gratissimum* e *V. agnus-castus* foram os menos efetivos, com valores de IC_{50} : 56,8; 71,1; 157,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Tabela 3**). Os OEs *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *C. ambrosioides* e *L. origanoides* foram os mais efetivos contra as formas tripomastigotas sanguíneas, com valores de CL_{50} de 10,3; 11,5; 28,1 e 39,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por outro lado, os OEs de *J. pectorales* e *V. agnus-castus* foram os menos efetivos contra estas formas com valores de CL_{50} de 44,5 e 155,8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Efeito tripanocida dos OEs de LS, LO, CA, OG, JP, VAC sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*; citotoxicidade em macrófagos e índice de seletividade (SI).

OEs	µg/mL			SI
	Epimastigota	Tripomastigota	Macrófago	
	IC ₅₀	CL ₅₀	CC ₅₀	
<i>L. sidoides</i>	28.9 ± 4.9	10.3 ± 0.5	192,7 ± 0.3	18.7
<i>L. origanoides</i>	26.2 ± 5.3	39.7 ± 11.4	175,7 ± 0.4	4.4
<i>J. pectorales</i>	56.8 ± 18.9	44.5 ± 10.2	176,9 ± 1,2	3.9
<i>O. gratissimum</i>	71.1 ± 12.2	11.5 ± 0.3	180,4 ± 1,0	15.7
<i>C. ambrosioides</i>	21.3 ± 6.8	28.1 ± 7.0	275,6 ± 0,7	9.8
<i>V. agnus-castus</i>	157.1 ± 36.5	155.8 ± 5.4	617,9 ± 8,1	3.9

Fonte: A autora (2009)

6.3 Citotoxicidade dos óleos essenciais sobre células de mamíferos (macrófagos)

Todos os OEs apresentaram baixa citotoxicidade sobre as células de mamíferos (CC₅₀ > 100 µg/mL). A atividade citotóxica mais baixa foi encontrada em macrófagos tratados com os óleos essenciais de *V. agnus-castus* e *C. ambrosioides*, os quais apresentaram CC₅₀ de 617,9 e 275,6 µg/mL respectivamente. *L. sidoides*, *L. origanoides*, *J. pectorales* e *O. gratissimum* apresentaram CC₅₀ de 192,7; 175,7; 176,9 e 180,4 µg/mL. (Tabela 3). A partir da análise da citotoxicidade dos diferentes óleos sobre as células de mamíferos foi determinado o índice de seletividade (SI) para as formas tripomastigotas, o qual indica o quanto cada óleo é tóxico para estas formas em relação às células de mamíferos. Todos os OEs testados se mostraram mais seletivos contra tripomastigotas apresentando um SI superior a 2,0. Os OEs de *L. sidoides*, *O. gratissimum* e *C. ambrosioides* foram os mais seletivos com SI de 18,7; 15,7; e 9,8 respectivamente. Por outro lado *L. origanoides*, *V. agnus-castus* e *J. pectorales* foram os menos seletivos. *L. origanoides* apresentou um SI de 4,4 enquanto *V. agnus-castus* e *J. pectorales* este índice foi de 3,9 para ambos os óleos. (Tabela 3).

6.4 Efeito dos óleos essenciais de LS, LO, CA e OG sobre formas amastigotas de *T. cruzi*

Tendo em vista que os OEs de *L. sidoides*, *L. origanoide*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* foram os mais efetivos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com baixos valores de CL₅₀, além de apresentarem maiores valores de SI para tripomastigotas, analisou-se

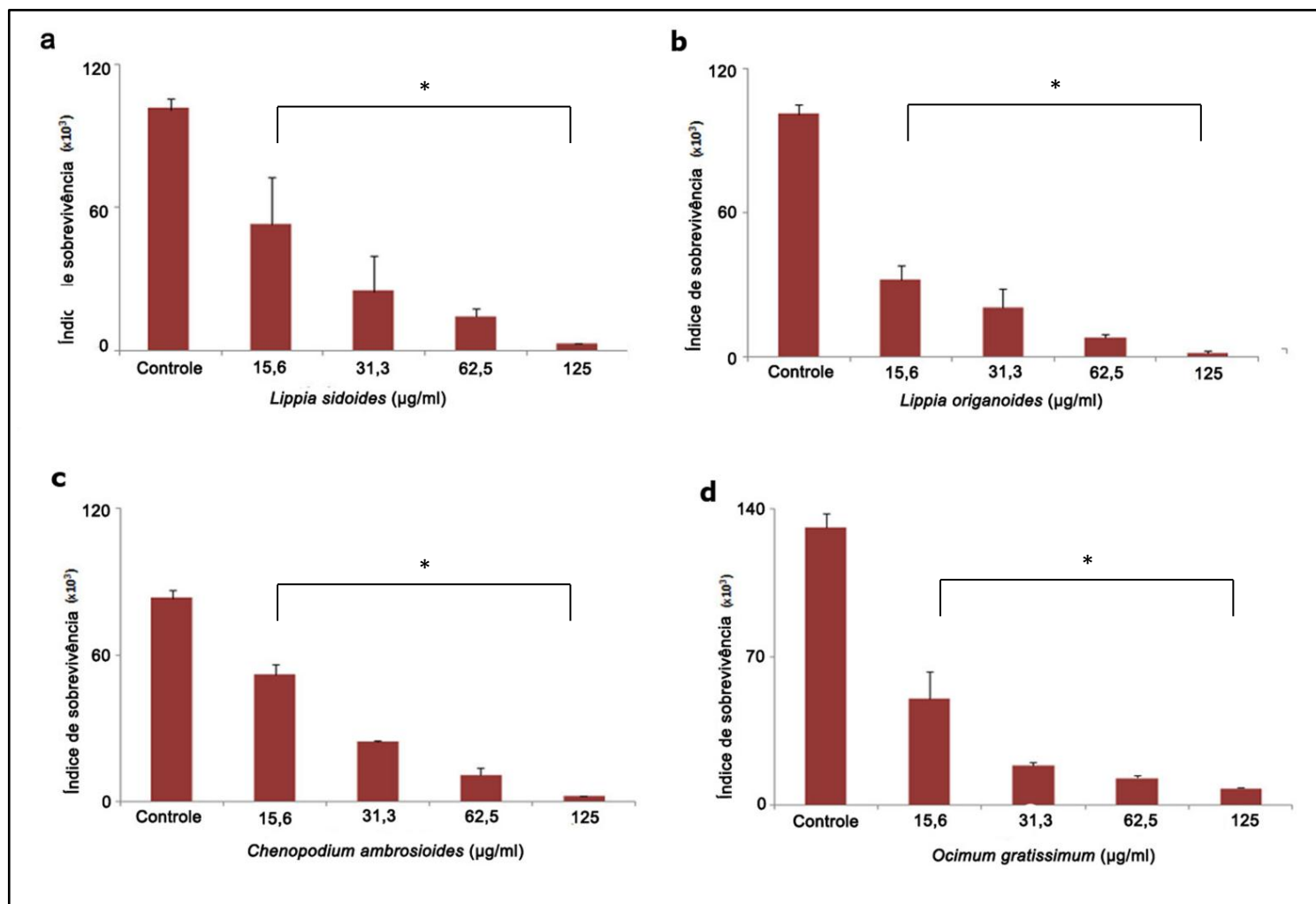
a atividade deste óleos sobre as formas amastigotas intracelulares deste parasita. Para tal, a concentração capaz de inibir em 50% a proliferação destas formas (IC₅₀) no interior de macrófagos foi calculada após 48 horas de tratamento. Todos os OEs testados foram capazes de reduzir a infecção com valores de IC₅₀ de 50,2 µg/mL (*C. ambrosioides*); 41,7 µg/mL (*L. sidoides*); 30,7 µg/mL (*O. gratissimum*) e 29.8 µg/mL (*L. origanoides*) (**Tabela 4**). Quando a citotoxicidade destes óleos é comparada com a sua atividade sobre as amastigotas obtivemos os mesmos valores de SI para os óleos de *L. origanoides* e *O. gratissimum* (SI=5.9), sendo estes considerados os mais seletivos contra as formas intracelulares do parasita seguidos pelos OEs de *C. ambrosioides* (SI=5.5) e *L. sidoides* (SI=4.6) (**Tabela 4**). O tratamento com os OEs de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* também teve efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre o índice de sobrevivência (IS) das amastigotas no interior de macrófagos, em todas as concentrações testadas, de maneira dose dependente (**Figura 23**). Todos os óleos na menor concentração testada (15,6 µg/mL) apresentaram uma inibição do índice de sobrevivência superior a 40% quando comparado aos macrófagos infectados e não tratados (controle), destacando-se o óleo essencial de *L. origanoides* que apresentou inibição superior a 55%. Para a maior concentração testada (125 µg/mL), todos os OEs apresentaram uma inibição do índice de sobrevivência superior a 90% (**Figura 23**).

Tabela 4 - Efeito tripanocida dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre formas amastigotas de *T. cruzi* e o índice de seletividade (SI).

OEs	Amastigota	Macrófago	SI
	IC ₅₀	CC ₅₀	
<i>L. sidoides</i>	41.7 ± 12.3	192,7 ± 0.3	4,6
<i>L. origanoides</i>	29.8 ± 3.0	175,7 ± 0.4	5,9
<i>O. gratissimum</i>	30.7 ± 2.3	180,4 ± 1,0	5,9
<i>C. ambrosioides</i>	50.2 ± 6,0	275,6 ± 0,7	5,5

Fonte: A autora (2010)

Figura 23 - Efeito dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre a sobrevivência das amastigotas.

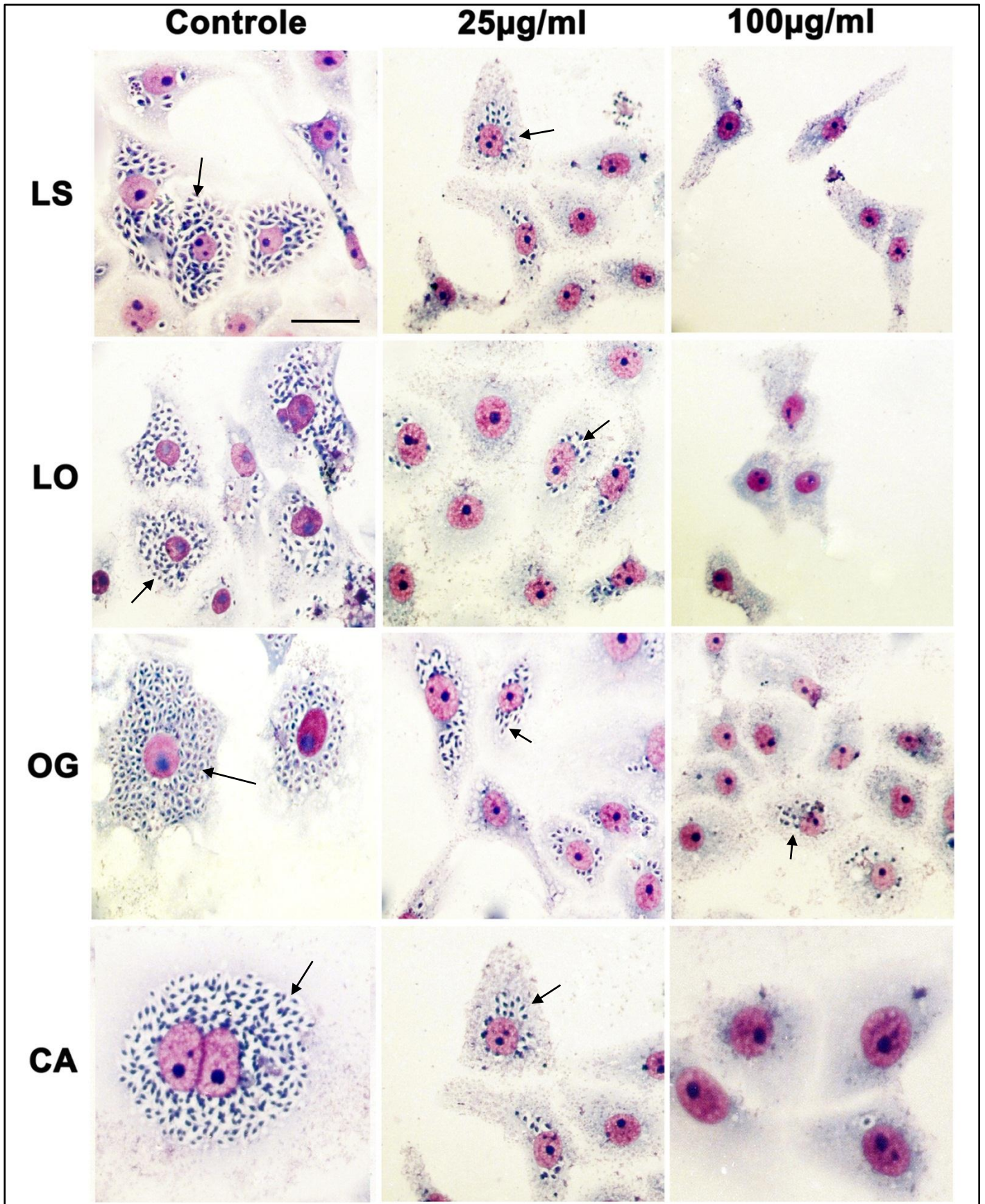


Fonte: A autora (2010)

Legenda: a) Índice de sobrevivência (IS) de amastigotas tratadas com OE de LS; b) IS de amastigotas tratadas com OE de LO; c) IS de amastigotas tratadas com OE de CA d) IS de amastigotas tratadas com OE de OG. * Significância estatística ($p < 0,05$).

O efeito do tratamento com os OEs sobre a infecção de macrófagos também pôde ser evidenciado através da microscopia óptica. Macrófagos controles se apresentaram altamente parasitados com número de amastigotas/célula infectada superior a 30 na maioria das células observadas. Este número cai drasticamente nas células tratadas com os OEs de *L. sidoides*, *L. origanoide*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ a infecção é praticamente inexistente para os óleos de *L. sidoides*, *L. origanoide* e *C. ambrosioides* (Figura 24).

Figura - 24 Efeito dos OEs de LS, LO, CA e OG sobre a infecção dos macrófagos por amastigotas de *T. cruzi*, após 48 h de tratamento.



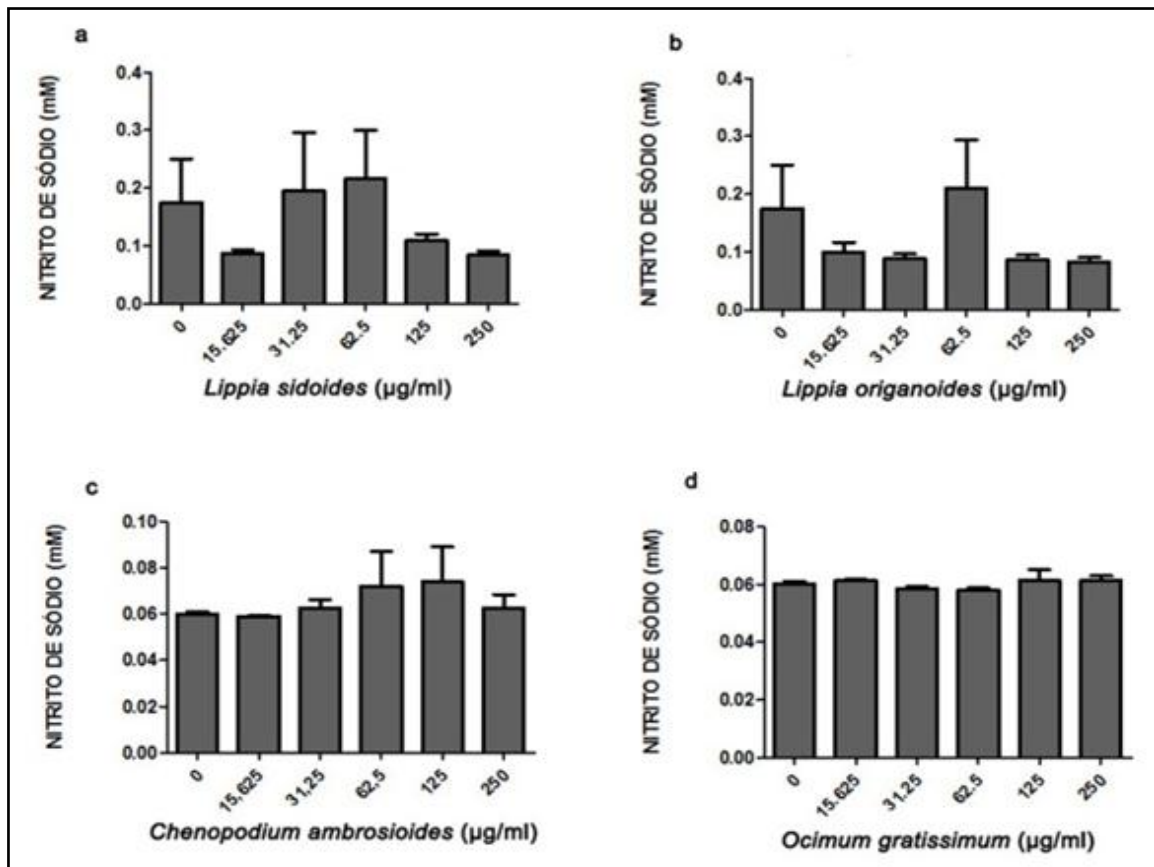
Fonte: A autora (2011)

Legenda: Amastigotas (Seta). Barra: 25 µm.

6.5 Produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos tratados com OEs

Para avaliarmos o possível efeito imunomodulador dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* sobre macrófagos foi avaliada a produção de óxido nítrico por estas células através da quantificação das concentrações de nitrito, após 48 horas, na presença ou ausência destes óleos. Nenhum dos óleos foi capaz de induzir alterações significativas na produção de NO em todas as concentrações quando comparado às células não tratadas (**Figura 25**). Para os OEs de *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* a produção de NO se manteve praticamente constante (**Figuras 25c e 25d**). Por outro lado, *L. sidoides* apresentou uma inibição da produção NO na concentração de 15 µg/mL, seguida de um aumento nas concentrações de 31.25 e 62.5 µg/mL e novamente uma diminuição nas concentrações de 125 e 250 µg/mL (**Figura 25a**). O óleo essencial de *L. origanoides* teve um comportamento semelhante ao encontrado para *L. sidoides*. No entanto, apenas na concentração de 62 µg/mL foi possível observar um aumento nos níveis de NO em relação ao controle. Nas demais concentrações deste óleo estes níveis foram sempre menores (**Figura 25b**).

Figura 25 - Produção de óxido nítrico por macrófagos após 48 h de tratamento com os OEs



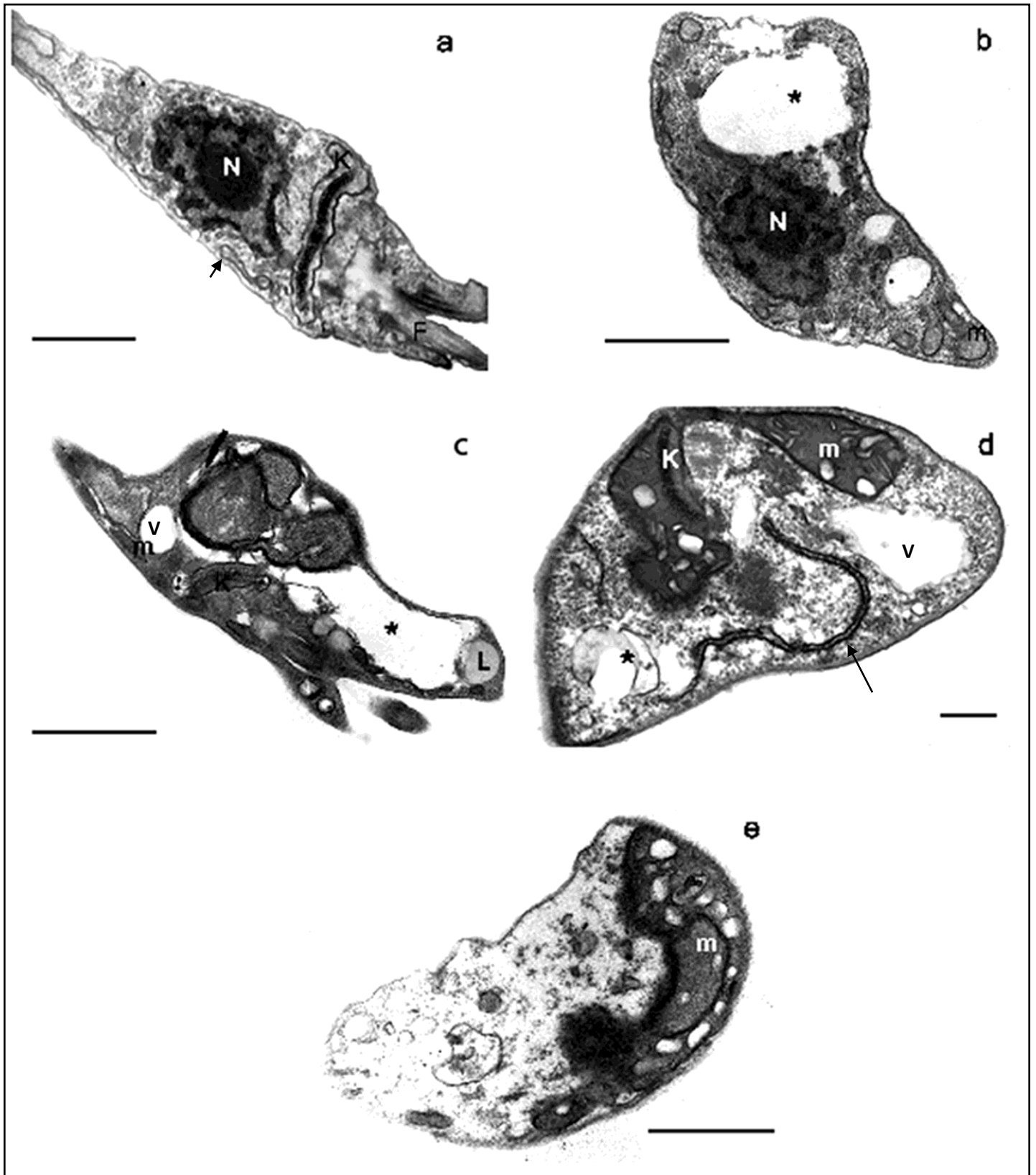
Fonte: A autora (2011)

Legenda: *Lippia sidoides* (a), *Lippia origanoides* (b), *Chenopodium ambrosioides* (c) *Ocimum gratissimum* (d)

6.6 Análise ultraestrutural do *T. cruzi* após tratamento com OEs

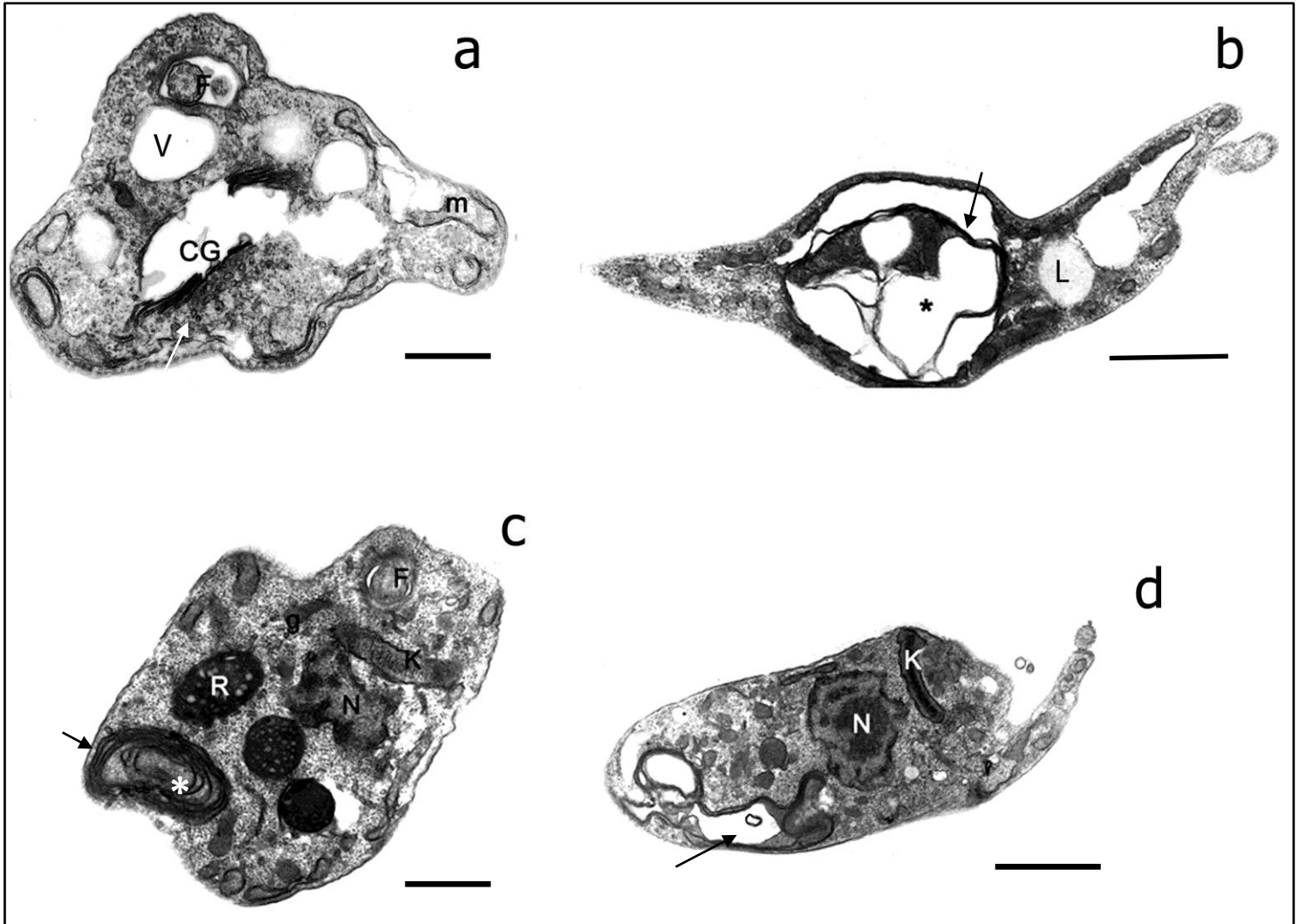
Alterações morfológicas das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com os OEs de *L. sidoides*, *L. origanoide*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* foram observadas através da análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão.

Formas epimastigotas controles apresentaram morfologia normal, forma alongada, flagelo emergindo da bolsa flagelar, mitocôndria e cinetoplasto característicos e bem preservados, núcleo e nucléolo evidentes (**Figura 26a**). Formas epimastigotas tratadas com diferentes óleos mostraram efeitos semelhantes, embora com severidade variando de acordo com a concentração e o óleo essencial testado. As alterações mais observadas foram: desorganização geral da célula com aparecimento de espaços eletróluscentes no citoplasma, inchaço e desorganização da estrutura da mitocôndria e aparecimento de vacúolos (**Figuras 26b, 26c, 26d, e 27**). Além destas alterações, células tratadas com *C. ambrosioides* apresentaram rompimento do complexo de Golgi e entumescimento do retículo endoplasmático (**Figuras 27a e 27b**). O tratamento com *O. gratissimum*, por sua vez, levou a uma desorganização das cristas mitocondriais com formação de membranas concêntricas no interior desta organela semelhantes a figuras mielínicas e aparente aumento no número de glicosomos (**Figura 27c e 27d**).

Figura 26 - Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com os OEs de LS e LO

Fonte: A autora (2009)

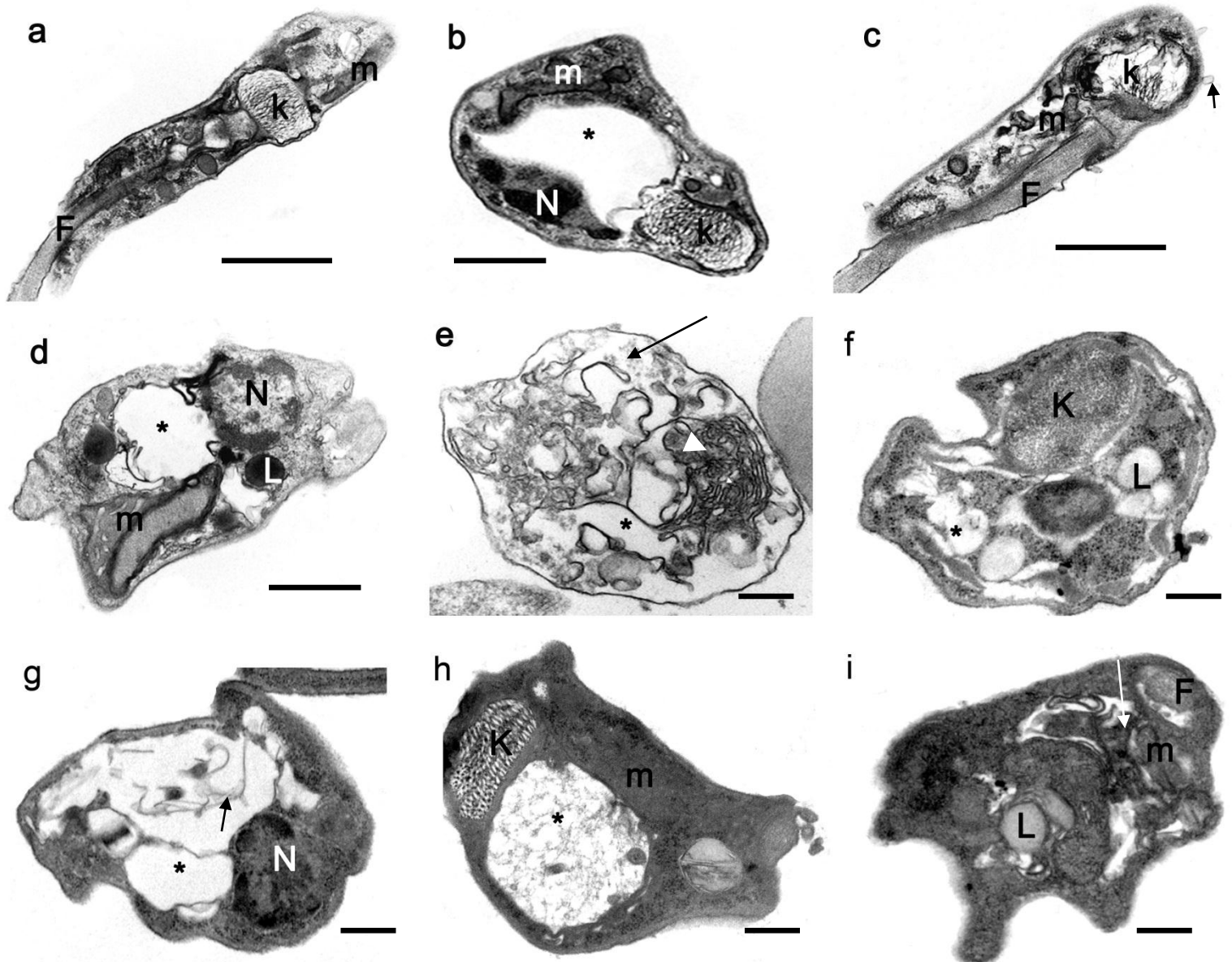
Legenda: (a) Célula controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (K) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar. Núcleo central (N) com nucléolo evidente e nucleoplasma homogêneo e eletrondenso. Perfis da mitocôndria (seta) também podem ser observados. (b) Epimastigota tratada com a IC_{50} de LS, apresentando espaços eletróluscentes no citoplasma (*). (c) Células submetidas ao tratamento com $2 \times IC_{50}$ de LS com uma intensa desorganização interna, e surgimento de espaços eletróluscentes (*) e vacúolos (V). (d) Epimastigota tratada com o óleo essencial de LO mostrando um grande aumento de volume da mitocôndria (m) e do Retículo endoplasmático (seta) com aparecimento de espaço eletróluscentes no citoplasma (*) e grandes vacúolos (V). (e) Célula drasticamente alterada após o tratamento com $2 \times IC_{50}$ de LO com perda de conteúdo citoplasmática, presença de vacúolos (V) e mitocôndria intumescida (m). Barras: $1\mu m$.

Figura 27 - Formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com os OEs de CA e OG

Fonte: A autora (2009)

Legenda: (a) Tratamento com o óleos essencial de CA induziu o intumescimento da mitocôndria (m), ruptura do complexo de golgi (CG) e aumento na quantidade de vesículas do golgi (seta). (b) Presença de estrutura semelhante a vesículas autofágicas (*) com grande quantidade de perfis de membrana (seta) após tratamento com o dobro da IC_{50} de CA. (c) Forma epimastigota incubada na presença do OE de OG mostrando intumescimento da mitocôndria (*) com desorganização das cristas mitocondriais formando membranas concêntricas (seta). Nota-se a presença de um grande número de glicosomos (G) dispersos no citoplasma. (d) Detalhe de uma célula tratada com o dobro da IC_{50} de OG mostrando o inchaço da mitocôndria e a perda de material da matriz (seta). Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Mitocôndria (m), Flagelo (F), Inclusões lipídicas (L). Barras: 1 μ m.

O tratamento com os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* também produziram drásticas alterações nas formas tripomastigotas. Células controles apresentaram morfologia e organelas típicas bem preservadas, com o cinetoplasto em formato de cesta e localizado posterior ao núcleo (**Figura 28a**). Células tratadas apresentaram alterações semelhantes às encontradas nas formas epimastigotas com considerável aumento do volume celular (**Figuras 28b, 28c, 28d, 28e, 28f, 28g, 28h, 28i**). No entanto, nas maiores concentrações os efeitos foram significativamente mais severos do que nas formas epimastigotas, com intensa desorganização intracelular, rompimento das fibrilas de kDNA e de organelas, além do aparecimento de espaços eletróluscentes no citoplasma (**Figuras 28c, 28e, 28g, 28i**). Estas alterações são indicativas de perda da viabilidade celular e possível comprometimento da membrana plasmática.

Figura 28 – Fotomicrografias eletrônicas de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com LS, LO, CA e OG.

Fonte: A autora (2010 e 2011)

Legenda: (a) Célula controle mostrando morfologia e organelas bem preservadas; (b) Tripomastigota tratada com a CL_{50} de LS, observa-se discreta desorganização do cinetoplasto (K), intumescimento da mitocôndria (m) e retração nuclear formando um largo espaço eletróluscente (*). (c) $2x CL_{50}$ de LS, as células apresentaram desorganização do cinetoplasto (K), intumescimento da mitocôndria (m) e a formação de “blebs” na superfície celular (seta). (d) Tripomastigota tratada com CL_{50} de LO mostrando mitocôndria intumescida (m) com desorganização das suas cristas (seta), presença de inclusões lipídicas eletróluscentes (L), desorganização do citoplasma, surgimento de espaços eletróluscentes com perfis membranosos em seu interior (*). (e) Observa-se drásticas alterações no parasita tratado com $2x CL_{50}$ de LO, tais como inchaço do citoplasma, perda de material citoplasmático (*), apenas com a presença de perfis de membrana espalhados (seta) e surgimento de perfis de membrana (cabeça da seta). (f) Tripomastigota tratada com a CL_{50} de OG mostrando o aumento na quantidade de inclusões lipídicas (L), modificações no arranjo do cinetoplasto (K) e formação de espaços eletróluscentes no citoplasma (*). (g) Célula tratada com o dobro da CL_{50} de OG mostrando o aumento dos espaços eletróluscentes (*) e com perfis de membrana em seu interior (seta). (h) Desarranjo na estrutura do cinetoplasto (K), intumescimento da mitocôndria (m) e o surgimento de grandes espaços eletróluscentes ocupando a maior parte do citoplasma (*) após o tratamento com a CL_{50} de CA; (i) com dobro dessa concentração houve o aumento do volume da mitocôndria (m) com perda da matriz e desarranjo das cristas mitocondrias (seta). Núcleo (N), Cinetoplasto (K), Mitocôndria (m), Flagelo (F). Barras: $1\mu m$.

6.7 Análise do modo de ação dos óleos essenciais de *L. origanoides* e *L. sidoides* através da microscopia confocal a laser, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura.

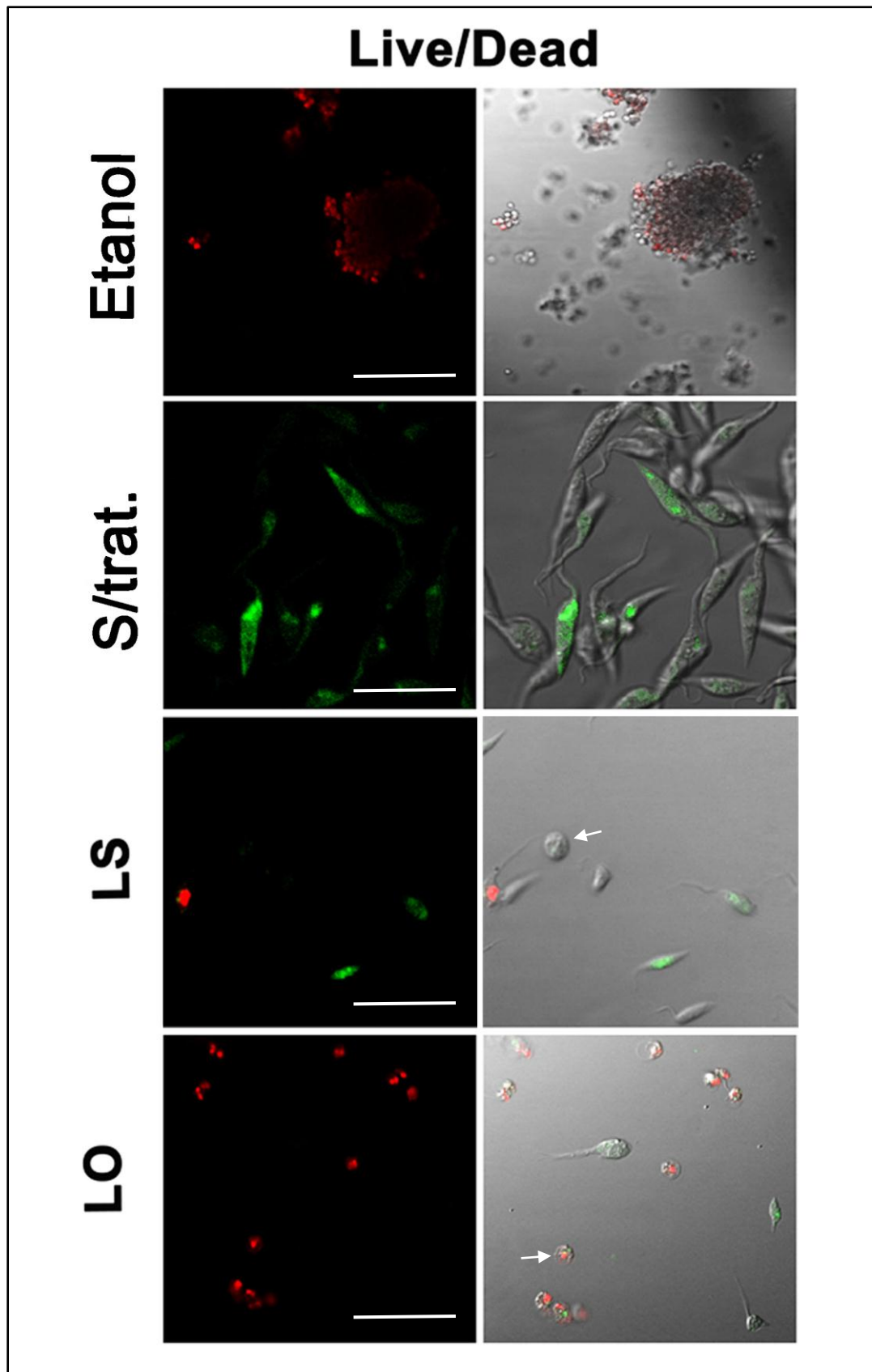
Tendo em vista que os ensaios prévios demonstraram o potencial tripanocida dos óleos essenciais de *L. origanoides* e *L. sidoides*, um estudo mais aprofundado sobre os possíveis mecanismos de ação destes óleos foi realizado. Inicialmente foi utilizado o kit Live/Dead para analisar a viabilidade celular e possível comprometimento da membrana plasmática. Este kit é baseado em dois marcadores: calceína (Ca) e homodímero de etídio (HE). A calceína contém um grupamento acetoximetil ester capaz de atravessar passivamente a membrana das células na sua forma eletricamente neutra e ser convertida a seu análogo fluorescente por esterases de células viáveis, emitindo fluorescência na faixa do verde. Já o homodímero de etídio é um marcador de ácido nucléico que penetra na célula apenas quando esta apresenta a integridade da membrana comprometida, emitindo fluorescência na faixa do vermelho.

Formas epimastigotas controles submetidas à marcação com esses fluorocromos mostraram intensa marcação em verde para Ca e pouca ou nenhuma marcação para o HE indicando que as células apresentavam-se viáveis e com sua membrana plasmática íntegra. Este panorama muda radicalmente quando as células foram incubadas com etanol 70%, utilizado tanto como um fixador quanto permeabilizante. Nesta condição, a fluorescência da Ca foi praticamente abolida e uma intensa marcação para o HE foi observada no núcleo e cinetoplasto dos parasitas. Intensa formação de grumos de parasitas foi visualizada com este tratamento. Células tratadas com o óleo essencial de *L. sidoides* apresentaram diminuição na intensidade da marcação para Ca, indicando perda da viabilidade celular. No entanto, apenas algumas células apresentaram-se positivas para o HE. Alterações tais como arredondamento do corpo celular também puderam ser observadas. Por outro lado, o tratamento com o óleo essencial de *L. origanoides* resultou em perda evidente da integridade da membrana plasmática, com intensa marcação do núcleo e cinetoplasto com HE. Nestas células também foi observada o aumento do volume celular (**Figura 29**).

As análises da marcação com Live/Dead através da microscopia confocal foram corroboradas pela citometria de fluxo. A **Figura 30** apresenta um “dot plot” representativo dos fenótipos de marcação com a calceína e o HE de células controles e tratadas com os OEs, onde o quadrante I representa as células marcadas apenas com calceína (Ca+/HE-), o quadrante II representando as células duplo positivas (Ca+/HE+), o quadrante III

representando as células negativas para ambos os marcadores (Ca-/HE-) e o quadrante IV células marcadas apenas com HE (Ca-/HE+). Como esperado, todas as células controles apresentam forte marcação para Ca com aproximadamente 98,6% das células marcadas (Ca+/HE-) e apenas 0,03% apresentando fenótipo Ca-/HE+ (**Figura 30b**). Já as células tratadas com etanol 70% apresentaram forte marcação com HE (Ca-/HE+) correspondendo a 97,8 % da população de parasitas (**Figura 30a**). Apenas 44,8% das células tratadas com o óleo de *L. sidoides* foram Ca+/HE-, enquanto que 37,3% da população apresentou fenótipo Ca-/HE+. Além do mais, foi possível observar que 10% da população apresentava marcação duplo positiva (Ca+/HE+) (**Figura 30c**). O tratamento com o óleo essencial de *L. origanoides* mostrou-se bem mais drástico para o parasita do que o óleo de *L. sidoides*, com perda da integridade da membrana evidenciada pelas altas porcentagens de células Ca-/HE+ (88,1%) e Ca+/HE+ (11,3%). Apenas 0,1% mostraram-se viáveis (Ca+/HE-) (**Figura 30d**).

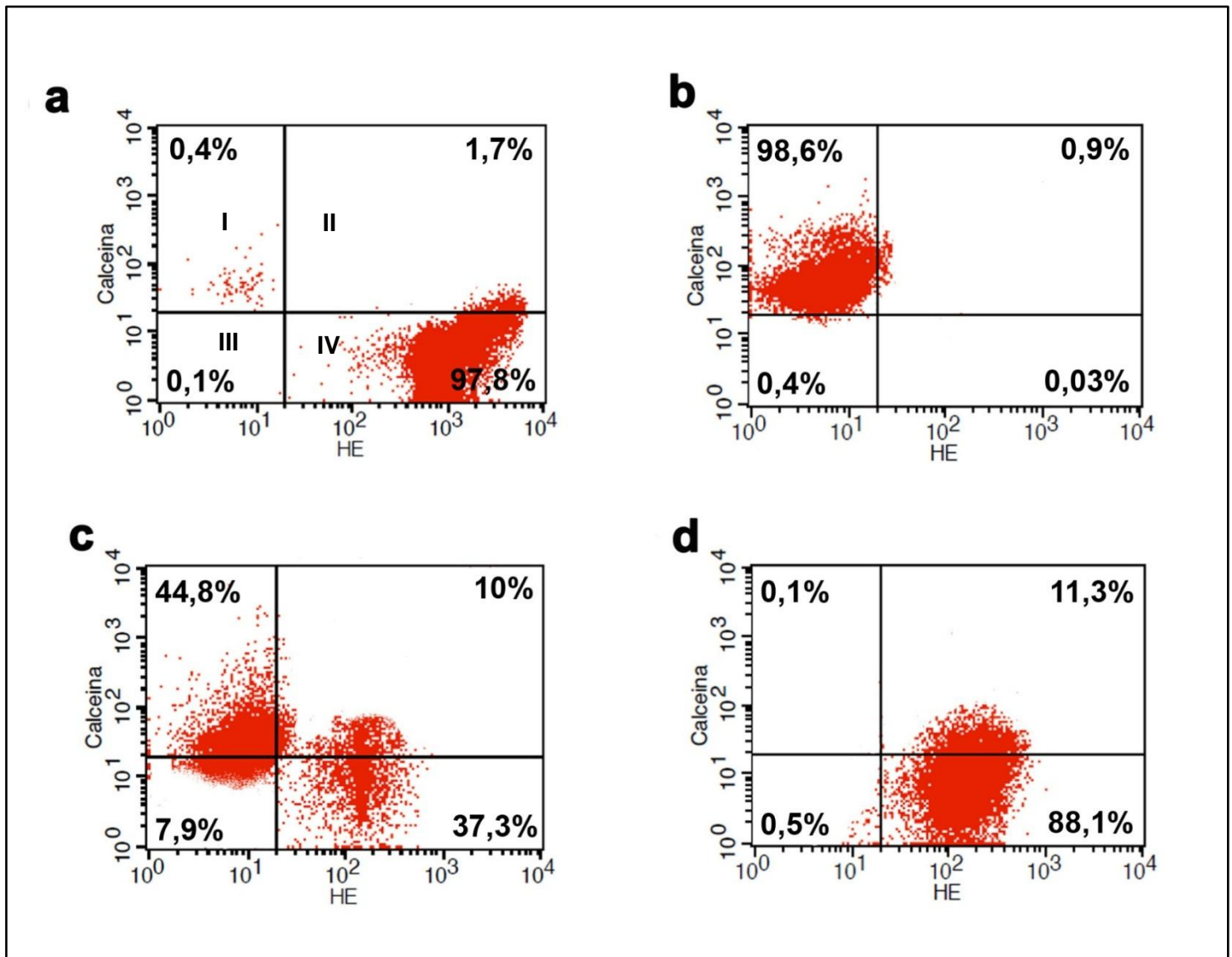
Figura 29: Marcação do Live/Dead de formas epimastigotas e *T. cruzi*, através da microscopia confocal a laser



Fonte: A autora (2011)

Legenda: C+ (Parasitas controle positivo tratadas com etanol 70%), C- (Parasitas controle negativo sem tratamento), LS (*L. sidoides*), LO (*L. oryzae*). Células com forma alterada (Seta). Barras: 28 μ m.

Figura 30 - Gráficos de marcação da calceína e homodímero de etídio de formas epimastigotas e *T. cruzi*, através da citometria de fluxo.



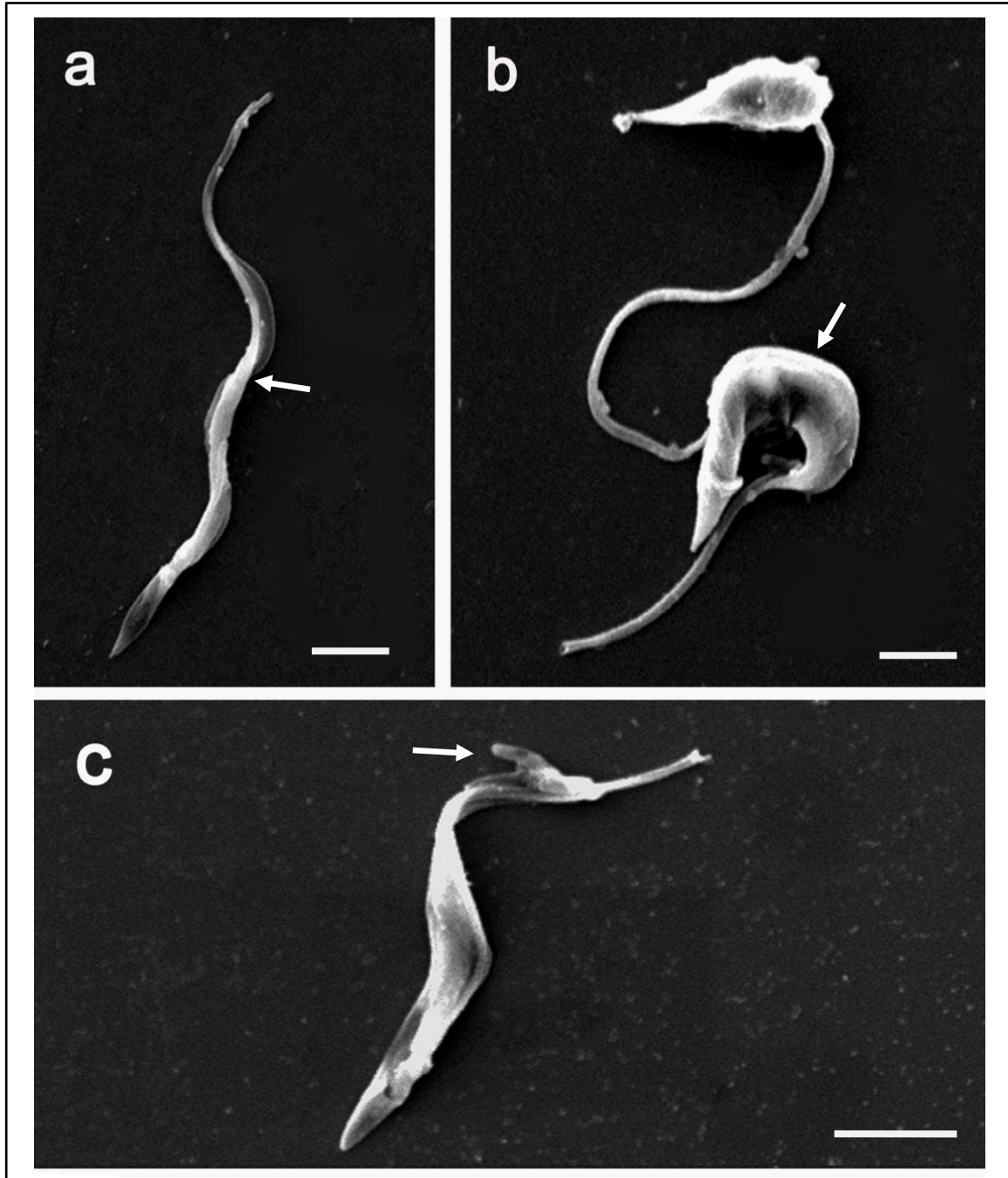
Fonte: A autora (2011)

Legenda : (a) Controle Positivo (parasitas tratadas com etanol) ; (b) Controle Negativo (sem tratamento) ; (c) Parasitas tratadas com *L. sidoides* ; (d) Parasitas tratadas com *L. organoides*. Quadrante I (Ca+/HE-), Quadrante II (Ca+/HE+), Quadrante III (Ca-/HE-), Quadrante IV (Ca-/HE+).

Para verificarmos se as tripomastigotas, as quais representam as formas infectivas ao hospedeiro vertebrado, apresentavam alterações na sua superfície em decorrência do tratamento com os OEs de *L. sidoides* e *L. organoides* adicionalmente foi realizada análise através de microscopia eletrônica de varredura. Formas tripomastigotas controles, visualizadas por esta técnica, mostraram-se alongadas e delgadas com flagelo formando uma membrana ondulante ao longo do corpo celular do parasita e superfície celular lisa (**Figura 31a**). Este perfil foi drasticamente afetado pelo tratamento com OEs de *L. sidoides* e *L. organoides*. Os parasitas passaram a apresentar aumento do volume e encurtamento do corpo

celular. Projeções da membrana semelhantes a bolhas foram comumente observadas nos parasitas tratados. Por outro lado, sinais de rompimento da membrana não foram observados para estes óleos (**Figuras 31b e 31c**).

Figura 31 - Microscopia eletrônica e varredura de formas tripomastigotas de *T. cruzi*



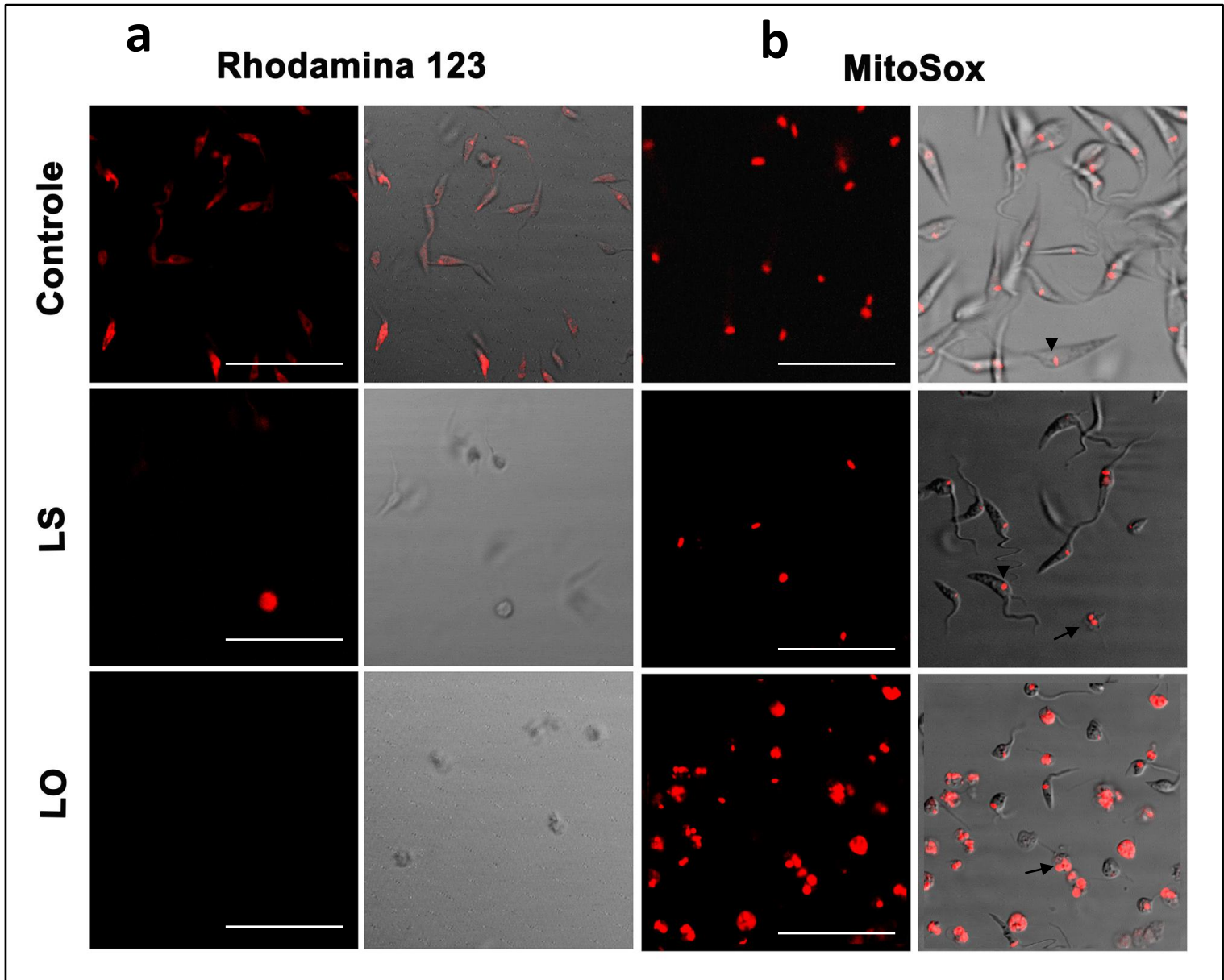
Fonte : A autora (2011)

Legenda : (a) Célula com morfologia alongada, flagelo acompanhado o corpo celular, além da aparência lisa da membrana plasmática (seta). (b) Tripomastigota tratada com óleo essencial de LS mostrando a distorção e a dilatação do corpo do parasita (seta). (c) Célula após tratamento com LO, observa-se o achatamento do corpo celular e a formação de projeções da membrana (seta). Barras=1 µm.

Visto que todos os tratamentos com os OEs, incluindo os OEs de *L. sidoides* e *L. origanoides*, induziram alterações significativas nas mitocôndrias foi analisado o efeito destes óleos sobre o potencial de membrana mitocondrial através do uso do marcador fluorescente Rodamina 123, o qual se liga a mitocôndrias de células viáveis emitindo fluorescência na faixa do vermelho. Parasitas controles apresentaram intensa marcação em suas mitocôndrias enquanto que, nas células tratadas com o OEs de *L. sidoides* e *L. origanoides* houve uma drástica redução tanto no número de células marcadas quanto na intensidade de fluorescência evidenciando um sério comprometimento do potencial de membrana mitocondrial nestes parasitas (**Figuras 32a**).

Para verificar se as alterações no potencial de membrana mitocondrial foram causadas por estresse oxidativo foi utilizado um segundo marcador mitocondrial: o MitoSox. Este fluorocromo é permeável às células vivas e rapidamente e seletivamente endereçado às mitocôndrias. Uma vez nesta organela, este reagente é rapidamente oxidado pelos radicais superóxido (ROS) e se liga aos ácidos nucléicos. Tanto células controles quanto tratadas, visualizadas por microscopia confocal a laser, apresentaram mitocôndria intensamente marcada para o MitoSox exclusivamente na região correspondente ao cinetoplasto. Interessantemente, o núcleo de alguns parasitas também apresentou forte marcação para este fluorocromo. Nas células tratadas, principalmente com *L. origanoides*, a intensidade de fluorescência, (mantendo-se os mesmos parâmetros de captura de imagem) foi significativamente aumentada em relação ao controle (**Figuras 32b**).

As alterações na geração de ROS pelas mitocôndrias puderam ser melhor visualizadas através da citometria de fluxo pelo deslocamento do “dot plot” para a direita do quadrante, evidenciando um aumento na intensidade de fluorescência, principalmente nas células tratadas com *L. origanoides* (**Figuras 33**). A partir das medianas da intensidade de fluorescência foi determinado o índice de variação que informa o quanto a intensidade de fluorescência para um marcador nas células tratadas é aumentada ou diminuída em relação às células controles. Valores de índice positivos significa um aumento na produção de ROS pela mitocôndria dos parasitas tratados em relação ao controle. O índice de variação encontrado para as células tratadas com *L. sidoides* e *L. origanoides* foram respectivamente +1,2 e +3.1 indicando uma aumento na intensidade de fluorescência das células tratadas em relação ao controle (**Tabela 5**).

Figura 32 - Marcação do MitoSox de formas epimastigotas e *T. cruzi*, através da microscopia confocal a laser

Fonte : A autora (2011)

Legenda : (a) Parasitas incubados com Rhodamina 123, (b) Parasitas incubados com MitoSox. Controle (Sem tratamento), LS (Parasitas tratados com *L. Sidoides*); LO (Parasitas tratados com *L. Origanoides*). Epimastigotas com forma alterada (Seta), Cinetoplasto (Cabeça da seta). Barras : 28 μ m.

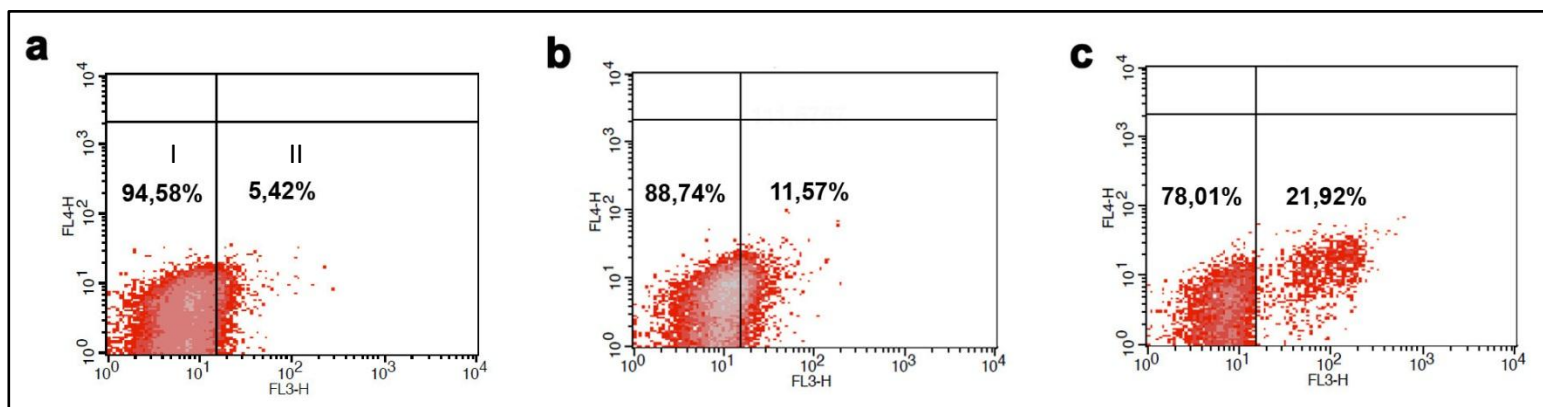
Tabela 5 – Índice de variação da intensidade da marcação (IV) nas células não tratadas e tratadas com o óleos essencial de LS e LO e incubadas com o MitoSox.

Tratamento	IV
LS	+1,2
LO	+3,1

Fonte: A autora (2011)

Legenda: IV= (MT-MC)/MC

Figura 33 - Marcação do MitoSox em formas epimastigotas e *T. cruzi*, através da citometria de fluxo.



Fonte : A autora (2011)

Legenda : (a) Controle; (b) Parasitas tratados com *L. sidoides*; (c) Parasitas tratados com *L. organoides*. Quadrante I : % de células não marcadas com MitoSox, quadrante II : % de células marcadas.

7 DISCUSSÃO

A doença de Chagas representa um grande impacto para saúde pública das populações da América do Sul e América Central e permanece ainda hoje sem um tratamento eficiente (OMS, 2008). Tendo em vista que as drogas antichagásicas usuais causam uma série de efeitos colaterais, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos tem sido proposto, incluindo derivados de plantas tais como óleos essenciais (FERREIRA et al. 2006; PAULINO et al. 2005;). Neste sentido, no presente trabalho foram avaliadas a atividade tripanocida e a citotoxicidade de óleos essenciais extraídos de plantas do nordeste brasileiro comumente utilizadas na medicina popular.

7.1 Caracterização química dos Óleos essenciais

Os óleos essenciais são definidos como uma mistura complexa de constituintes voláteis derivados do metabolismo secundário de plantas aromáticas e obtidos principalmente por hidrodestilação. Tais misturas podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações variadas. No entanto, é comum que dois ou três componentes estejam presentes em concentrações mais elevadas sendo denominados constituintes majoritários, aos quais são geralmente atribuídas às atividades biológicas destes óleos (BAKKALI et al. 2008). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é o método de escolha para análise dos constituintes de óleos essenciais. Através desta técnica foi determinada a composição química de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *O. gratissimum*, *C. ambrosioides*, *J. pectoralis* e *V. agnus-castus* por comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com aqueles de substâncias padrão previamente analisadas ou através de bibliotecas de referências existentes na literatura (ADAMS, 1995). Os índices de retenção (IR) foram calculados usando-se uma série homóloga de n-alcanos, que foram analisados por CG-EM nas mesmas condições de operação. Tais abordagens permitem uma maior confiabilidade dos resultados melhorando significativamente a identificação dos constituintes dos óleos essenciais, particularmente aqueles com padrões de fragmentação muito semelhantes (DE LIMA et al. 2009).

Nossos resultados mostraram uma grande variedade na composição química dos óleos essenciais, mesmo entre óleos de plantas pertencentes a um mesmo gênero, como é o caso de *L. sidoides*, cujo composto majoritário foi o timol (78%) e *L. origanoides* que teve o carvacrol como constituinte principal. A análise química obtida para estes óleos foi similar à descrita

por outros autores (CRAVEIRO et al. 1981; DE MEDEIROS et al. 2011; ESCOBAR et al. 2010; NAKAMURA et al. 2006).

Os compostos terpênicos foram os principais componentes de todos os óleos testados, predominando os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$). Este último constitui a maior classe dos terpenóides (OLIVEIRA et al. 2003), enquanto os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo mais de 90% dos óleos essenciais (BAKKALI et al. 2008). Os compostos terpênicos ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural, e que são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos (RAVEN et al. 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004). Tais compostos podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos em: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (OLIVEIRA et al. 2003).

Os óleos essenciais, bem como os seus constituintes terpênicos são bastante conhecidos por suas atividades biológicas contra diversos microorganismos, incluindo tripanossomatídeos como *Trypanosoma brucei* (OTOGURO et al. 2011), *Leishmania sp.* (DE MEDEIROS et al., 2011; OLIVEIRA et al. 2009) e *Trypanosoma cruzi* (SANTORO et al. 2007a; 2007b; 2007c). Consequentemente, tem se assumido que os mecanismos de ação dos óleos essenciais é baseado na natureza química de seus constituintes. Desta forma, especula-se que a natureza hidrofóbica dos constituintes de óleos essenciais, principalmente os compostos terpênicos, permite aos óleos passar livremente através das membranas celulares, afetando as organelas e/ou suas vias metabólicas (BURT, 2004; CARSON et al. 2002; COWAN, 1999; KNOBLOCH, 1989;). No entanto, devido ao grande número de constituintes e as interações sinérgicas ou antagônicas existentes entre elas é provável que os óleos essenciais possam ter outros alvos celulares além das membranas celulares, tais como coagulação do citoplasma, lipídeos e proteínas (BURT, 2004; COX et al. 2000; GUSTAFSON et al. 1998; JUVEN et al. 1994; LAMBERT et al. 2001; OUSSALAH et al. 2006; ULTEE et al. 2002).

Tem sido relatado na literatura que o timol, constituinte majoritário do óleo essencial de *L. sidoides*; e o carvacrol, principal constituinte do óleo de *L. origanoides* apresentam tripanocida bem como, antibacteriana e antifúngica (AHMAD et al. 2011; BOTELHO et al. 2007; DE MEDEIROS et al. 2011; ESCOBAR et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2009; ROBLEDO et al. 2005; SANTORO et al. 2007a; SANTOS et al. 2004; TABANCA et al. 2007). Ambas as substâncias parecem interagir com a membrana do parasita e causar

drásticas alterações fisiológicas que conduzem à perda de permeabilidade da membrana e em última instância conduzem à morte celular (BURT, 2004).

O 1,8 cineol, composto majoritário do óleo de *V. agnus-castus* e também encontrado em altas quantidades em *O. gratissimum* é bastante conhecido por possuir propriedades antimicrobianas e tem sido encontrado em plantas com atividade tripanocida e leishmanicida (OLIVEIRA et al. 2009; SANTORO et al. 2007b). Tem sido também demonstrado que este composto aumenta a permeabilidade cutânea em formulações tópicas. Agindo no estrato córneo da pele, este composto é capaz de romper temporariamente lipídios intracelulares, permitindo a entrada na pele de substâncias com baixo grau de permeabilidade (WILLIAMS et al. 2006). Assim, tem sido demonstrado o potencial deste composto como antiséptico e antimicrobiano (WORTHINGTON et al. 2009).

Eugenol é o principal constituinte do óleo essencial de *O. Gratissimum*, além de ser o constituinte químico mais importante dos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas (VIZENCI et al. 2000). Apresenta uma ampla utilização como um agente aromático para alimentos e fragrância na indústria de cosméticos, e é comumente usado em odontologia como sedativo, para pulpite e hiperalgesia dental. Várias ações biológicas do eugenol têm sido relatadas. Por exemplo, este composto induz efeitos sobre o sistema nervoso central em mamíferos tais como hipotermia, diminuição da atividade motora espontânea, anticonvulsivantes, anestesia geral e é um depressor potente do sistema nervoso periférico com propriedades miorrelaxante, antiespasmódica e vasorelaxante (GHELARDINI et al. 2001; LIMA et al. 2000). Ueda-Nakamura et al. (2006) demonstraram ação antiprotozoária deste constituinte sobre *L. amazonenses*.

Tanto o óleo de *C. ambrosioides* quanto o de *J. pectoralis* são ricos em terpinoleno. Embora relatos sobre a atividade isolada deste composto seja menos comum na literatura. Plantas ricas em terpinoleno têm demonstrado atividade antimicrobiana (EFTEKHAR et al. 2005).

Apesar dos compostos majoritários serem implicados como os responsáveis pela atividade dos OEs, não podemos descartar a possibilidade que outros compostos, presentes em menor quantidade, possam estar envolvidos nessa atividade, agindo sinergicamente ou antagonicamente a estes compostos.

7.2 Atividade dos óleos essenciais sobre formas epimastigotas e tripomastigotas

O presente estudo mostrou que os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides*, *O. gratissimum*, *J. pectoralis* e *V. agnus-castus*, têm um efeito inibitório no crescimento de formas epimastigotas e causaram perda de viabilidade em formas tripomastigotas de maneira dose-dependente. De acordo com o cálculo da IC₅₀ para epimastigota foi observada a seguinte ordem de atividade dos óleos: *C. ambrosioides* > *L. origanoides* > *L. sidoides* > *J. pectoralis* > *O. gratissimum* > *V. agnus castus*. Com excessão dos óleos de *L. origanoides* e *C. ambrosioides* todos os óleos foram mais efetivos contra formas tripomastigotas do que para formas epimastigota com a seguinte ordem de atividade: *L. sidoides* > *O. gratissimum* > *C. ambrosioides* > *L. origanoides* > *J. pectoralis* > *V. agnus castus*. Estes resultados são particularmente importantes, uma vez que a forma tripomastigota é a forma infectante encontrada no hospedeiro vertebrado. Santoro et al., 2007a também demonstraram que as formas tripomastigotas são geralmente mais susceptíveis ao tratamento com óleos essenciais. Ainda neste contexto, destaca-se o óleo essencial de *L. sidoides* e *O. gratissimum*, os quais se mostraram os mais efetivos contra tripomastigotas com baixos valores de CL₅₀. As diferenças de susceptibilidade entre estas formas se devem provavelmente as diferenças existentes quanto as suas vias metabólicas, as características físico-químicas das suas superfícies e estruturas celulares (IZUME et al. 2010).

7.3 Citotoxicidade dos Óleos essenciais

Os óleos essenciais e/ou seus constituintes têm sido reportados como bem tolerados pelas células de mamíferos e alguns deles tem demonstrado possuir um efeito protetor contra o estresse oxidativo (EL-NEKEETY et al. 2011). No entanto, por serem produtos de extração de uma espécie vegetal e, portanto mais concentrados, podem apresentar certa citotoxicidade, a qual dependerá da dose utilizada (SIMÕES et al. 2000). Assim, um passo importante para avaliação do potencial dos óleos essenciais é a determinação do seu potencial citotóxico em células de mamíferos.

Uma das técnicas mais rápidas e precisas para avaliação da citotoxicidade de um composto é o método colorimétrico do MTT, que quantifica o metabolismo mitocondrial e a atividade respiratória das células, através da redução dos sais de tetrazólio a formazan por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Esta técnica vem sendo usada com

sucesso em células de mamíferos e em alguns protozoários como *Leishmania* (BERG et al. 1994; DE MEDEIROS et al. 2011; SERENO; LEMESRE, 1997) *Trypanosoma brucei* (ELIS et al. 1995), e mais recentemente em *Trypanosoma cruzi* (ESCOBAR et al. 2010; SALOMÃO et al. 2011; SÜLSEN et al. 2011).

Nossos resultados mostraram que todos os óleos essenciais testados, apresentaram baixa toxicidade (>100 µg/mL) sobre as células de mamíferos. O óleo de *V. agnus-castus* se mostrou o menos tóxico para os macrófagos. No entanto, este óleo também apresentou baixa atividade tanto para formas epimastigotas quanto para formas tripomastigotas.

Quando a CC₅₀ foi comparada com CL₅₀ de formas tripomastigota, pôde-se determinar o índice de seletividade dos diferentes óleos sobre esta forma. Todos os óleos essenciais mostraram ser mais seletivos para as formas tripomastigotas do que para as células de mamíferos com SI superior a 3,0. Segundo Houghton et al. (2007), uma droga para ser efetiva deve apresentar um SI igual ou maior que 2,0. Por outro lado, para Bézivin (2003) o índice de seletividade é considerado interessante apenas para valores maiores que 3,0. *L. sidoides* mostrou-se o mais seletivo de todos os óleos testados sendo 18 vezes mais tóxico para o parasita do que para célula do hospedeiro.

7.4 Atividade dos OEs essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* sobre formas intracelulares de *T. cruzi*

Visto que os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* foram os que apresentaram melhor atividade tripanocida, de acordo com os seus índices de seletividade, a atividade destes sobre formas amastigotas intracelulares foi analisada. A importância de se obter compostos potencialmente eficazes contra as amastigotas, justifica-se principalmente para o tratamento na fase crônica que é caracterizada pelo intenso parasitismo de tecidos por estas formas. Nossos resultados mostraram que, exceto o óleo essencial de *L. origanoides*, as formas amastigotas foram mais resistentes ao tratamento do que as formas tripomastigotas. A diferença na susceptibilidade destas formas quando comparadas as formas tripomastigotas pode ser devido ao fato de que os óleos precisam atravessar a membrana celular do hospedeiro e da membrana do vacúolo parasitóforo, a fim de ter acesso à amastigota intracelular, enquanto que a tripomastigota extracelular está diretamente exposta ao tratamento.

O tratamento com os OEs teve um reflexo direto não só nos níveis de infecção como também na sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos. Todos os óleos testados mostraram-se efetivos na redução do índice de sobrevivência dos parasitas intracelulares de maneira dose-dependente. A atividade de óleos essenciais sobre amastigotas tem sido descrita por outros autores em *Leishmania* (DE MEDEIROS et al. 2011; ROSA et al. 2003; UEDA-NAKAMURA et al. 2006) e em *Trypanosoma cruzi* (BOURGUIGNON et al. 2009; ESCOBAR et al. 2011; SANTORO et al. 2007c). Essa atividade pode ser favorecida pelo fato dos óleos essenciais se difundirem facilmente em todas as membranas celulares e, conseqüentemente, revelam vantagens no que diz respeito às interações com alvos intracelulares (EDRIS, 2007).

A exemplo do que ocorreu com as formas tripomastigotas, todos os óleos foram mais tóxicos para as formas amastigotas do que para as células de mamífero. No entanto, todos os óleos testados, com exceção do *L. origanoides* apresentaram-se mais seletivos contra formas tripomastigotas do que para formas amastigotas.

7.5 Efeitos dos óleos essenciais na produção de óxido nítrico

Os protozoários são susceptíveis à morte por exposição a radicais superóxido que são gerados a partir do peróxido de hidrogênio e pelo o óxido nítrico (NO). Este último produzido por macrófagos após ativação de macrófagos pelo IFN- γ e TNF- α . Estes radicais são de grande importância na defesa destas células contra microorganismos intracelulares (GANTT, 2001; SILVA et al. 2003).

Com o intuito de verificar se a morte das amastigotas foi decorrência de uma ação direta dos OEs sobre estas formas e/ou se estes óleos possuem um efeito estimulatório sobre os macrófagos, a produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum*, foi avaliada. Nenhum óleo foi capaz de induzir alterações significativas na produção de NO por macrófagos, embora células tratadas com os óleos de *L. sidoides* e *L. origanoides* apresentaram alguma variação nos níveis de NO quando comparadas com as células não tratadas. Por outro lado, a concentração deste composto nas células tratadas com *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* permaneceu praticamente inalterada durante o tratamento. Estes resultados apontam para um efeito direto dos óleos sobre o parasita.

7.6 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica tem se mostrado uma ferramenta útil e confiável na investigação de novos fármacos para doença de Chagas, tanto para avaliar as alterações morfológicas quanto identificar as organelas-alvo. Neste estudo foi possível observar que as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* sofreram notáveis alterações morfológicas em comparação com parasitas não tratados. Tais alterações encontradas tanto em formas epimastigotas quanto tripomastigotas foram geralmente comuns a todos os óleos, embora o grau de severidade variasse em função do óleo e das concentrações testadas. As alterações morfológicas mais significativas foram observadas na mitocôndria, tais como intumescimento mitocondrial, principalmente na região próxima ao cinetoplasto e desorganização das cristas mitocondriais formando estruturas com membranas concêntricas em seu interior. Tais resultados também foram observados por Santin et al. (2009) e De Medeiros et al. (2011) em *Leishmania* tratadas com óleos essenciais e por Izume et al. (2008) e Sulsen et al. (2010) em *T. cruzi*. As alterações na mitocôndria pode sugerir um efeito sobre os componentes estruturais desta organela, possivelmente proteínas ou enzimas de membrana. Segundo Santa-Rita et al. (2004), danos mitocondriais com formação de arranjos membranosos nessa organela podem estar associados com a depleção de ergosterol e alteração das propriedades físicas das membranas. Tem sido mostrado que a membrana mitocondrial dos tripanossomatídeos em contraste com a membrana mitocondrial dos mamíferos possui uma grande quantidade de esteróis, logo, drogas que inibem a biossíntese de ergosterol provavelmente afetam a fisiologia da mitocôndria (URBINA et al. 2002). De fato, estudos recentes mostraram que os compostos timol e carvacrol encontrados nos óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. origanoides* inibiram de forma significativa a síntese de ergosterol em *Candida albicans* causando a perda da permeabilidade da membrana plasmática destes fungos (AHMAD et al. 2011). No entanto, um efeito dos diferentes óleos sobre outras vias metabólicas que levam o comprometimento direto ou indireto da mitocôndria não podem ser descartadas.

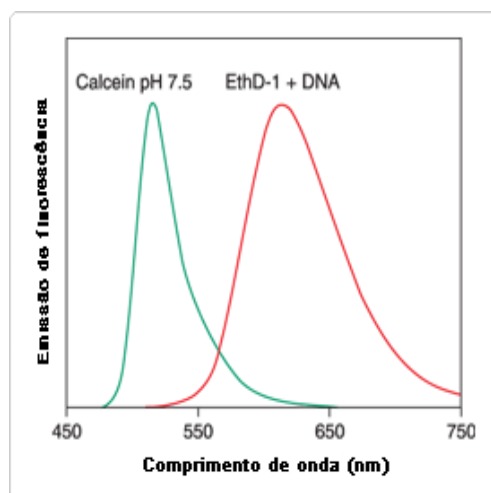
Além dessas alterações na mitocôndria, a desorganização na estrutura do cinetoplasto, intensa vacuolização no citoplasma e o aparecimento de protusões de membranas semelhantes a bolhas também foram comumente observadas tanto em formas epimastigotas quanto em tripomastigotas tratadas com os óleos essenciais. Essas alterações, compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular dos parasitas, também foram descritas em *T. cruzi* tratados com

óleos essenciais bem como com outras drogas de origem sintética ou natural (FIDALGO; GILLE, 2011).

7.7 Mecanismo de ação dos OEs de *Lippia sidoides* e *L. origanoides*

Plantas pertencentes ao gênero *Lippia*, tais como *L. sidoides*, e *L. origanoides*, são nativas da região semi-árida do Nordeste brasileiro e utilizadas na medicina popular pelas suas propriedades antiséptica, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica, além de apresentarem efeitos gastroprotectivos e leishmanicida (DE MEDEIROS et al. 2011, OLIVEIRA et al. 2009). Escobar et al. (2010) mostraram que a atividade de diferentes espécies de *Lippia* sobre *T. cruzi* e *L. chagasi* era dependente da espécie de *Lippia* e o local de sua coleta. Estas diferenças têm reflexo direto na atividade antiprotozoária. Um fato interessante é que a amostra de *L. origanoides* colombiana, cuja constituição química foi semelhante a encontrada na amostra de *L. origanoides* utilizada em nosso estudo, mostrou também um efeito bastante semelhante contra *T. cruzi*.

No presente estudo, nós demonstramos que *L. sidoides* e *L. origanoides* possuem atividade contra todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, além de baixa citotoxicidade contra células de mamíferos, com alta seletividade contra formas tripomastigotas e amastigotas. Além disso, os óleos destas plantas apresentaram alterações morfológicas importantes nos parasitas, principalmente na mitocôndria, sugerindo que esta organela seja o alvo preferencial de ação destes óleos. Estes resultados nos estimularam a aprofundar os estudos sobre os efeitos destes óleos sobre a integridade da membrana e sobre a funcionalidade das mitocôndrias. Vários ensaios baseados em sondas fluorescentes e em corantes vitais têm sido utilizados para analisar a atividade de drogas com potencial tripanocida através da microscopia confocal, uma vez que, esta é mais precisa que a microscopia convencional (MUELAS-SERRANO et al., 2000; KOUZNETSOV et al., 2005; VEGA et al., 2005; ROLON et al., 2006; SARAIVA et al., 2007). No presente trabalho, a viabilidade dos parasitas e a integridade da membrana plasmática foram analisadas utilizando o kit LIVE/DEAD composto pela calceína e pelo homodímero de etídio. O primeiro marcador emite fluorescência apenas quando modificado por esterases intracelulares em células viáveis, emitindo fluorescência na faixa do verde. O segundo é um fluorocromo que emite na faixa do vermelho ao se combinar com os ácidos nucleicos de células cuja integridade da membrana esteja comprometida. (Figura 34).

Figura 34 - Espectro de emissão de fluorescência normalizada de calceína e do homodímero de etídio-1

Fonte: Confocal microscopy (2010).

Nota: Separação espectral da calceína e homodímero de etídio que permite a visualização simultânea de células vivas e células mortas

A análise através da microscopia confocal mostrou que o tratamento das formas epimastigotas com os óleos essenciais de *L. organoides* e *L. sidoides* levou a perda da viabilidade celular, como demonstrado pela diminuição no número e na intensidade de fluorescência de células marcadas com calceína quando comparadas com o controle. Esta diminuição da marcação com a calceína foi acompanhada pelo aumento de células marcadas com HE, chegando a 88% do total da população nas amostras tratadas com *L. organoides*. A perda da integridade da membrana é uma das principais características da morte celular por necrose. Neste tipo de morte celular ocorrem também alterações na mitocôndria, depleção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio, perda da homeostase de cálcio e vacuolização do citoplasma (MENNA-BARRETO et al. 2007). No caso de *L. organoides*, a necrose parece ser o principal mecanismo de morte celular induzida por este óleo. No entanto, em *L. sidoides* uma porcentagem de aproximadamente 8% das células foi negativa para ambos os marcadores (Ca^2+ /HE) indicando que outros processos de morte celular independente de necrose, tais como a apoptose e a autofagia, podem também estar ocorrendo.

Apesar destes resultados mostrarem claramente o comprometimento da integridade da membrana plasmática de formas epimastigotas, a análise de formas tripomastigotas tratadas através da microscopia eletrônica de varredura falhou em mostrar rompimento da membrana, embora um aumento no volume celular, a formação de protruções da membrana apontassem para o comprometimento da permeabilidade celular. Estes resultados aparentemente controversos também foram identificado em *T. cruzi* e *Leishmania sp.* tratados com óleos essenciais. Estudos realizados por Oliveira et al (2009) demonstraram que apesar das

análises ultraestruturais não indicarem danos aparentes à membrana de *L. chagasi* tratadas com óleos essenciais, a mesma foi comprometida, como demonstrado pela incorporação de iodeto de propídio, um fluorocromo análogo ao HE. É possível que, os óleos atuem sobre as propriedades físico-químicas da membrana interferindo na sua permeabilidade e permitindo a marcação com HE sem, no entanto causar ruptura desta estrutura.

Os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria com características que divergem consideravelmente das encontradas em células de mamífero. Desta forma, substâncias que tenham como alvo a mitocôndria destes parasitas parecem ser bem promissoras (FIDALGO et al. 2011). Neste contexto, os drásticos efeitos ultraestruturais na mitocôndria do *T. cruzi*, nos levaram a uma análise mais funcional desta organela através da utilização de sondas fluorescentes específicas. A rodamina 123 é um fluorocromo carregado que é atraído pelo potencial negativo presente na membrana mitocondrial de células metabolicamente ativas (NICHOLLS et al. 2000). Os óleos essenciais do gênero *Lippia* testados nesse estudo provocaram uma considerável diminuição na quantidade de células marcadas com a rodamina 123, indicando perda do potencial de membrana mitocondrial. Nas células tratadas com *L. origanoides* este efeito é ainda mais severo abolindo completamente a marcação com este fluorocromo.

A despolarização da membrana mitocondrial está diretamente associada, entre outros mecanismos, a alterações nos canais de cálcio e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem disparar eventos de morte celular por apoptose e necrose (Yoon et al. 2000; Armstrong, 2006). Para verificar se a perda do potencial de membrana observado em nosso estudo estava de algum modo relacionada à produção de ROS pela mitocôndria dos parasitas foi utilizado um segundo marcador mitocondrial, o MitoSox. Nossos resultados demonstraram que tanto as células controles quanto as tratadas apresentavam marcação com o MitoSox, uma vez que, ROS pode ser gerado como um subproduto da fosforilação oxidativa. Cerca de 1 a 3 % do oxigênio mitocondrial consumido é incompletamente reduzido interagindo rapidamente com o oxigênio molecular para formar superóxido, uma espécie de ROS predominante nas mitocôndrias (BRAND et al. 2004; FIDALGO et al. 2011). No entanto, a produção destes radicais foi substancialmente aumentada, principalmente nas células tratadas com *L. origanoides*, as quais apresentaram um aumento significativo na intensidade de fluorescência como observado através da microscopia confocal e citometria de fluxo. O índice de variação para este marcador foi de +1,2 e +3,1 para os óleos de *L. sidoides* e *L. origanoides*, respectivamente, o que evidencia um forte incremento na fluorescência como

produto do aumento da geração de ROS nas mitocôndrias dos parasitas tratados com estes óleos. As alterações morfológicas observadas na mitocôndria de parasitas tratados com *L. sidoides* e *L. origanoides*, bem como a perda do potencial de membrana mitocondrial e a geração de ROS podem causar um estresse oxidativo considerável nos parasitas, levando a um colapso desta estrutura e conseqüentemente, a morte celular. (DEBRABANT et al. 2003; FIGARELLA et al. 2006; HARDER et al. 2006).

8 CONCLUSÕES

- a) Os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* foram os mais efetivos contra todas as formas evolutivas de *T. cruzi*;
- b) A baixa toxicidade dos óleos essenciais sobre as células de mamíferos aponta seu uso para a realização de ensaios *in vivo*. Soma-se a isto, a seletividade destes óleos para o parasita, principalmente sobre as formas tripomastigotas;
- c) A ausência de alterações significativas na produção de NO pelos macrófagos após tratamento com os óleos essenciais sugere que, os óleos essenciais agem diretamente sobre as amastigotas e/ou que outros mecanismos imunomodulatórios independentes de NO estejam envolvidos na atividade antiparasitária destas células;
- d) Análises ultraestruturais demonstraram que os óleos essenciais causam alterações morfológicas severas nos parasitas, compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular, e apontam a mitocôndria como principal alvo intracelular de ação dos óleos;
- e) O tratamento com *L. sidoides* e *L. origanoides* causou perda da viabilidade celular, como demonstrado pela diminuição para calceína, e da integridade da membrana pela marcação com o HE, sendo estes efeitos mais drásticos nas células tratadas com *L. origanoides*;
- f) Os resultados obtidos pelas análises por microscopia confocal a laser e citometria de fluxo sugerem que a mitocôndria é o alvo principal dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. origanoides*, uma vez que, o tratamento com estes óleos alteraram o potencial de membrana mitocondrial e aumentaram significativamente a produção de ROS;
- g) Nossos dados sugerem que a necrose seja a principal via de morte celular induzida por *L. origanoides*. No entanto, em *L. sidoides* outros tipos de morte celular como a apoptose e autofagia podem também estar envolvidos;
- h) Nossos resultados sugerem os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides* e *O. gratissimum* como agentes promissores para o tratamento da

doença de Chagas, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas.

REFERÊNCIAS

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 115, p. 1124–1131, 2007.

ADADE, C. M. et al. Effect of *Crotalus viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, London, v. 138, p. 46–58, 2011.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. **Carol Stream Illinois: Allured Publishing Corporation**; 14th ed 2007.

AGUILAR, M. M. et al. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 47-55, 2007.

AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 30, p. 41–50, 2011.

ANDRADE, S. G. et al. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 86, p. 624-626, 1992.

ANTHONYA, V.; FYFEA, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 462-468, 2004.

ARARIPE, J.R. et al. *Trypanosoma cruzi*: TcRAB 7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 321, p. 397-402, 2009.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101 p. 2034–2039, 2004.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated

diseases--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 6, p.475-506, 2005.

BATISTA, D. G, et al. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, p. 2940–2952, 2010.

BERMAN J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 397–401, 2003.

BERN C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. Review. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 26, p. 2527-34, 2011.

BERNSTEIN, R. E. Darwin's illness: Chagas disease resurgens. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 77, p. 608–09, 1984.

BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *tobacco mosaic* vírus. **Journal of Essential Oil Research**. v. 7, p. 641-644, 1995.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BOURGUIGNON, S. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: in vitro activity of Epoxy-a-Lap, a derivative of a-lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, New York, v. 122, n. 2, p. 91-96, 2009.

BRADACS, G.; MAES, L.; HEILMANN, J. In vitro cytotoxic, antiprotozoal and antimicrobial activities of medicinal plants from Vanuatu. **Phytotherapy Research**. London, v. 24, n. 6, p. 800-809, 2010.

BRAGA, M.V.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Effects of squalene synthase inhibitor on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 72–78, 2004.

BRAK K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 53, p. 1763–1773, 2010.

BRAND, M.C. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 6, p. 755–767. 2004

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.114, n. 2, p. 103-10, 1997.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogar, 2000. p. 431.

BRODSKYN, C., et al., Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infection and immunity**, Washington, v. 70, p. 3736–3743, 2002.

BURT, S.A. et al. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 919–926, 2003.

BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223–253, 2004.

CABRERA, E. et al. 5-Nitro-2-furyl derivative actives against *Trypanosoma cruzi*: preliminary in vivo studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 44, p. 3909–3914, 2009.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**, Basingstoke, v. 25, p. 471-9, 2006.

CAVALCANTI D. P. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, London, v. 4, n. 9, p.120, 2009.

CALVACANTI, E. S. et al. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti*. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541–544, 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, p. 1914–1920, 2002.

CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal Activity of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* L. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 569–571, 2003.

CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 1, p. 159–218, 1909.

CHENOPODIUM ambrosioides. Disponível em:
www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/plantas-mediciniais-erva-de-santa-maria.html. Acesso em 20 de abril de 2011.

COURA, R.; S. L. DE CASTRO. A critical review on Chagas disease chemotherapy, **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 97, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, p. 564-582, 1999.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 170–175, 2000.

CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae - Genus *Lippia*. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 44, p. 598–601, 1981.

CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 38, p. 1041–1047, 1996.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R.L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 4081–4089, 2004.

DEBRABANT, A. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 33, p. 257–267, 2003.

DE BOER, H. J. et. al. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v. 15, p:461-469, 2005.

DELESPAUL, Q. et al., The antifungal activity of oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n.2, p.256-66, 2000.

DE LIMA, S.G. et al. Monoterpenes, sesquiterpenes and fatty acids from *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae) from Ceara-Brazil. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepcion, v. 54, p. 55–57, 2009.

DE MEDEIROS, M. D. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 237-341, 2011.

DE OLIVEIRA, C. et al. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 382, p. 847-52, 2001.

DE SOUZA, W. A. short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz.** , Baltimore, Rio de Janeiro, v. 94, p. 17-36, 1999.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, E. M. et al. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 314, p. 223–235, 2003.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 14, n.9, p.822-38, 2008.

DE SOUZA, W.; CAVALCANTI, D.P. DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: a review. **Trends Cell Molecular Biology**, Cambridge, v. 2, p. 89-104, 2008.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 104, p. 17-36, 2009

DE SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

DE VINCENZIE, M. et al. Constituents of aromatic plants: I. *Methyleugenol*. **Fitoterapia**, Milano, v.71, p.216–221, 2000.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and tours bio-ecology characteristics with agents of the transmissión by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, Brasília, v. 39, p.370-375, 2006.

DO CAMPO, R. et al. Acidocalcisomes – conserved from bactéria to MAM. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 252-261, 2005.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, p. 308-323, 2007.

EFFRAIM, K. D.; JACKS, T. W.; SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit African. **Journal Biomedical Research**. Nigéria, v. 6, p. 21-25, 2001.

EFTEKHAR, F. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Diplotaenia damavandica*. **Zeitschrift fur Naturforsch**, Tubigen, v. 60, n.11-12, p. 821-825, 2005.

EL-NEKEETY A. A. et al. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin- induce oxidative stress in male rats. **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 7-8, p. 984-91, 2011.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105 n. 2, p. 184-190, 2010.

ESPERANDIM, V.R. et al. Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p.525–530, 2010.

FABRINO, D.L. et al. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. **Nitric Oxide**, Orlando, v.11, 166–174, 2004.

FERREIRA, V. F. et al. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 5459–5466, 2006.

FIGARELLA, K. et al. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. **Cell death and differentiation**, Oxford, v. 13, p. 1802–1814, 2006.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.29, p.229-232, 1996.

FIDALGO, L. M.; LARS, G. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, New york, v. 28, p. 2758–2770, 2011.

FIGUEIREDO, R.C.; ROSA, D.S.; SOARES, M.J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **Journal of Parasitology**. Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1213-8, 2000.

FIGUEIREDO, R.C. et al. Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology**., London, v. 129, n. 4, p. 431-438, 2000.

FLORES-CHAVEZ, M. et al. Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, p. 44-47, 2008.

- FORÉS, R. et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. **Bone marrow transplantation**. v. 39, p. 127-128, 2007.
- GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 167, p. 893–901, 2001.
- GARZONI, L. et al. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amestredan, v. 23, p. 286-90, 2004.
- GERPE, A. et al. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 3467-80, 2006;
- GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica**, Stuttgart, v.67, p. 564–566, 2001.
- GIOVE, N. R. A. Traditional medicine in the treatment of enteroparasitosis. **Revista brasileira de Gastroenterologia**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.197-202, 1996.
- GIRÃO, V. C. C. et al. clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 59, p. 95-102, 2003.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 45–80. 2005.
- GOTTLIEB, O. R. MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, p. 196-215, 1980.
- GRANTHON, A.C. et al. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 146, n. 1–2, p. 25–34, 2007.
- GUEDES, P.M. et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl([¹⁵]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Amsterdam, v. 160, p. 270–282, 2010.

GUSTAFSON, J.E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 194–198, 1998.

HARDER, S. et al. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryotic cells**, Washington, v. 5, p. 861–870, 2006.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**. V. 42, p. 377-387, 2007.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**. London, v.28, n.4, p.809-823, 2011.

JANNIN, J.; VILLA, L., 2007. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 102 (Suppl. 1), p. 95–97, 2007.

JUSTICIA pectorales. Disponível em: www.plantasonya.com.br/hortas-e-medicinais/chamba-justicia-pectoralis.html. Acesso em 20 de abril de 2011.

JUVEN, B.J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of applied bacteriology**, London, v. 76, p. 626–631, 1994.

KAYSER, O.; MASIHI, K. N.; KIDERLEN, A. F. Natural products and synthetic compounds as immunomodulators. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. V.1, n.2, p.319-335, 2003.

KISHORE, N.; MISHRA, A.K.; CHANSOURIA J.P. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, Berlim, v.36, p.211–215, 1993.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: R.E. Rakel, Editor, **Conn's Current Therapy**, New York. p. 101–102, 1999.

KIUCHI, F. et al. Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Chenopodium ambrosioides*,. **Journal of natural products**, Cincinnati, v.65, p.509-512, 2002.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**. v. 1, p.118–119, 1989.

KORDALI, S. et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, New York, 2008.

KOUZNETSOV, V. V. et al. Synthesis and antiparasitic properties of new 4-N-benzylamino-4-hetarylbut-1-enes. **Arch Pharm**, Seoul, v. 338, p. 32–37, 2005.

KUNLE, O. et al. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, p. 59-61, 2003.

KUSTRAK, K. J.; BLAZEVIC, N. The composition of the essential oil of *Vitex agnus castus*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58 (Suppl 1), p. 681, 1992.

LACOSTE E. et al. Lês Propriétés Antiseptiques de l'huile essentiel de *Lippia sidoides* Cham. Application à la microflore cutanée. **Annais Pharmaceutics Françaises**. V. 54, p. 228-30, 1996.

LAMBERT, R.J.W. et al. Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453–462, 2001.

LEAL, L. K. A. M. et al. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, p. 09- 11, 2003.

LEMOS, T.L.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytoterapy Research**. v . 4, p. 82-84, 1990.

LIMA, C. C. et al. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, p. 408– 411, 2000.

LIPPIA sidoides. Disponível em : www.lyndha.com/zenflora/fotoa.htm. Acesso em 20 de abril de 2011.

LIPPIA organoides. Disponível em:
www.historico.agenciadenoticias.unal.edu.co/articulos/ciencia_tecnologia/ciencia_tecnologia_200812. Acesso em 20 de abril de 2011.

LIU, B. et al. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.21, p.363-369, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 512p. 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008

LUIZE, P. S. et al. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.29, n. 10, p 2126-2130, 2006.

LUNA K. P. et al. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomedica**, Bogotá, v. 29, p. 448–455, 2009.

MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.11, n.19, p. 2405-2427, 2003

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.8, p.366-373, 2002.

MARIN-NETO, J.A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v.115, p. 1109–23, 2007.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza, UFC, 180p.1998.

MAUDLIN I. African trypanosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 100, p. 679– 701, 2006.

- MAYA, J. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Physiology and Biochemistry**, New York, p. 1-20, 2006;
- MCKERROW, J.H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 104 (1 Suppl), p.263–269, 2009.
- MENNA-BARRETO, R. F. et al. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, n. 4, p.895-905, 2007.
- MENNA-BARRETO, R. F.S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v.40, p.157–68, 2009.
- MIGLIETTA, A.; BOZZO, F.; GABRIEL, L.; BOCCA, C. Microtubuleinterfering activity of parthenolide. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.149, p. 165–173, 2004.
- MIKUS, J. et al. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, n. 4, p.366-368, 2000.
- MIRANDA K, et al. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. **Protist**, Jena, v.155, p. 395-405, 2004.
- MOREIRA, R. et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.21, p.205-211, 2002.
- MORELLO A. et al.. Trypanocidad effect of boldine and related alkaloids up on several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Physiology and Biochemistry**, New York, v.90, p. 1-12, 1994.
- MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **Journal Eukaryot Microbiology**. v.56,p. 208-213, 2009.
- MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". **Journal of Immunological Methods**. V. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUELAS-SERRANO S.; NOGAL-RUIZ J.J.; GOMEZ-BARRIO A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. Berlim, v. 86, p. 999–1002, 2000.

MUKHOPADHYAYA, P. et al. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. New York, v. 358, n. 1, p. 203–208. 2007.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NICHOLLS, D. G.; WARD, M. W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. **Trends in Neurosciences**. v. 23, p. 166-174. 2000.

NAKAMURA, C.V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.94, p. 675-678, 1999.

NURHAYAT T. et al. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperiu*, and *Chrysothamnus nauseosus* Essential Oils. **Agric. Food Chemistry**. V. 55, p. 8430–8435, 2007.

OCIMUM gratissimum. Disponível em:

http://www.metafro.be/prelude/view_plant?pi=09170. Acesso em 20 de abril de 2011.

OKIGBO, R. N.; MMEKA, E. C. Antimicrobial effects of three tropical plant extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albican*. **Journal of Traditional, Complementary and Alternative**. v.10, p. 226-229, 2008.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Holos, 2003. 64p

OLIVEIRA, V. C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**. Berlim, v.104, n.5, p1053-1059, 2009.

OLIVIERI, B.P. et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a

murine model of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v. 36, p. 79–83, 2010.

OMS. Les Chagas disease: control and elimination. Report of the Secretariat. EB124/17, 2008.

OMS. TDR and product/drug discovery, introduction, 2009. Disponível em: <
<http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development>. Acesso em: 02 de janeiro de 2010.

OTOGURO, K. et al. In vitro antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**. 2011. [in press]

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**. v.70, p. 901–908, 2007.

PACHECO, M.G. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of heterocyclic cationic molecules in vitro. **Experimental Parasitology**. Berlin, v. 123, p. 73–80, 2009.

PARSONS, M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular and Microbiology**. v. 53, p. 717-724, 2004.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. A review. **Journal of ethnopharmacology**, v.76, p. 201–214, 2001.

PAULINO, M. et al. The chemotherapy of Chagas' disease: an overview. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v.5, p. 499–519, 2005.

PEREIRA, K.S. et al. Chagas disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**. V.72, p. 441–446, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v.64, p.1139-47, 2009.

PESSOA, L. M. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v.16, p.59-63, 2002.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research - every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medicinal**. São Paulo, v. 69, n.6 , p.491-495, 2003.

PIACENZA, L. et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemistry Journal**. V. 403, p. 323–334. 2007.

PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**. V. 14, p. 4570-90, 2009.

PINTO, A.Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**. México, v. 25, p. 77–83, 2009.

POLLACK, Y.; SEGAL, R.; GOLENSER, J. The effect of ascaridole on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, Berlin, v.76, p.570-572, 1990.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, **Lancet Infectious Diseases**. v. 1, p. 92–100, 2001.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**. V. 375, n.9723, p.1388-1402, 2010.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 43-74, 2003.

ROBINSON, K. M. et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, V. 103, p.15038–15043. 2006

ROBLEDO, S. et al. In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v.49, p.1652–1655, 2005.

- ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**. Stuttgart, v. 12, p. 514-535, 2005.
- RODRIGUES, J.C. et al. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. **Protist**. Jena, v.158, n. 4, p. 447-456, 2007.
- RODRÍGUEZ, J. et al. New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. V.17, n. 24, p. 8186-8196, 2009.
- ROLON, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. Berlin, V. 99, p. 103-107, 2006.
- ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 47, p. 1895-1901, 2003.
- ROTTENBERG, M.E. et al. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **European Journal of Immunology**. Paris, v. 26, p. 3203-3213, 1996.
- SALOMÃO, K. et al. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi* Evidence-Based. **Complementary and Alternative Medicine**. 2011.
- SANGWAN N.S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**. V. 34, p. 3-21, 2001
- SANCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. V.4, p. 23-30, 2004.
- SANT'ANNA, C. et al. Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). **Histochemistry and Cell Biology**. V. 124, n. 1, p.87-95. 2005.
- SANT'ANNA, C. et al. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microscopy Research and Technique**. Berlin, v. 71, n. 8, p. 599-605. 2008

SANTA-RITA, R. M. et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v.54, p.704–710, 2004.

SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology research**. Berlin, v.100, p. 783-790, 2007a.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**. New York, v.116, n.3, p. 283-290, 2007b.

SANTORO, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology research**. Berlin, v. 134, n.11, p. 1649-656, 2007c.

SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p. 504–506, 2004.

SARAIVA J. et al. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**. Berlin, v. 100, p. 791–795, 2007.

SARTORELLI, P. et al. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. **Planta Medicinal**. São Paulo, 2010.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, p. 29-44, 1983.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa, MG: UFV, 2000.135p

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Bioscience**. v.8, p. 314–325, 2003.

SILVA, J.J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 53, p.4414–4421, 2009.

SILVA, J. J. et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British journal of pharmacology**. Germany, v.160, p.260-269, 2010.

SIVROPOULOU A. et al. antimicrobial and citotoxic activities of *Ocimum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.44, p.1202-1205, 1996.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999. p. 387-415.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 467-495.

SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. **Journal of Protozoology**. 34: 199-203, 1987.

SOETAN, K.O.; AIYELAAGBE, O.O. The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants - A review. **Journal of Medicinal Plant**. v.3, p. 324-328, 2009.

SOH, N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. V. 386, p. 532-543. 2006.

SÜLSEN V. et al. Antiproliferative effect and ultrastructural alterations induced by psilostachyin on *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**. Berlin, v. 15, p.545-53, 2010.

SÜLSEN, V. P. et al. Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v. 37, n. 6, p. 536-43. 2011.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Medicinal**. São Paulo, v. 71, n. 1, p.20-23, 2005.

- TEMPONE, A. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**. Stuttgart, v. 12, p. 382-90, 2005.
- TORRES-SANTOS, E.C. et al. Selective effect of 2V, 6V-dihydroxy-4V-methoxylchalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Amsterdam, v. 43, p. 1234–1241, 1999.
- UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology international**. New York, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2006.
- UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology**. Berlin, v. 14, p. 150-164, 2001.
- URBINA, J. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**. Schiphol, v.8, p.287-95, 2002.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitology**. Amsterdam, v. 19, n. 11, p.495-501, 2003.
- URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.104 (1 Suppl), p.311–318, 2009.
- VALERIA P. et al. Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity *Martinoa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v. 37, p. 536–543, 2011.
- VEGA C, A. et al. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. **Parasitology Research**. Berlin, v. 95, p. 296–298, 2005.
- VENDRAMETTO, M.C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescen*. **Parasitology international**. New York, v.59, p. 154–158, 2010.
- VIANA; S. B.; NOBRE; M. E. P.; MATOS, F. J. A. Erva utilizada na medicina popular tem eficácia comprovada. Pesquisas FUNCAP, Fortaleza, v.6, no 1, p.5-6, abr. 2004.

VITEX agnus-castus. Disponível em:

<http://www.horticulturalphoto.com/LB/Vitex.htm>. Acesso em 20 de abril de 2011.

WHO. Les Leishmanioses et les co-infections Leishmania/HIV. Aidé-Mémoire OMS. 116. Bureau du Port-Parole de OMS, Genebra, 2002.

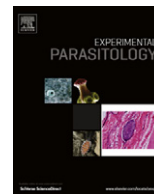
WILLIAMS et al. Molecular interactions between the penetration enhancer 1,8-cineole and human skin. **Journal of Raman Spectroscopy**. India, v. 37, p. 361-366, 2006.

WORTHINGTON, T. et al. Antimicrobial efficacy of *eucalyptus* oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Amsterdam, v. 64, n. 6, p.1219-1225, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. Washington, v.12, n. 2, p. 240-253, 2011.

ZOGHBI, M.D.B.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. The essential oil of *Vitex agnus castus* L. growing in the Amazon Region. **Flavour and Fragrance Journal**. New York, V. 14, n. 4, p. 211-213, 1999.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil

Andrezza Raposo Borges^a, Juliana Ramos de Albuquerque Aires^a, Taciana Mirely Maciel Higino^a, Maria das Graças Freire de Medeiros^b, Antonia Maria das Graças Lopes Citó^b, José Arimatéia Dantas Lopes^b, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^{a,*}

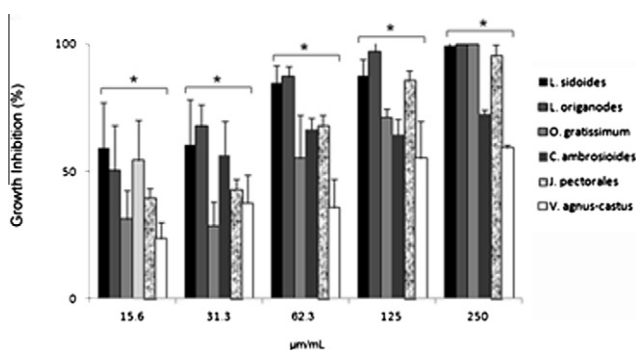
^a Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE, Av. Prof. Moraes Rego s/n Cidade Universitária-Campus da UFPE, Recife-PE, 50670-420, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela-Ininga, Teresina-PI, 64049-550, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ The trypanocidal potential of essential oils from medicinal plants was evaluated.
- ▶ The essential oils tested were active against all evolutive forms of *Trypanosoma cruzi*.
- ▶ The essential oil from *Lippia sidoides* was the most effective against trypomastigotes.
- ▶ *Lippia organoides* essential oil was the most effective against amastigotes.
- ▶ All essential oils were more specific against parasites than mammal cells.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2012

Received in revised form 12 June 2012

Accepted 13 June 2012

Available online 4 July 2012

Keywords:

Essential oils
Trypanosoma cruzi
 Chagas disease
 Chemotherapy
 Cytotoxicity

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is an important cause of mortality and morbidity in Latin America. There are no vaccines available, the chemotherapy used to treat this illness has serious side effects and its efficacy on the chronic phase of disease is still a matter of debate. In a search for alternative treatment for Chagas disease, essential oils extracted from traditional medicinal plants *Lippia sidoides*, *Lippia organoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia pectorales* and *Vitex agnus-castus* were investigated *in vitro* for trypanocidal and cytotoxic activities. Essential Oils were extracted by hydrodistillation and submitted to chemical analysis by gas chromatography/mass spectrometry. The concentration of essential oils necessary to inhibit 50% of the epimastigotes or amastigotes growth (IC_{50}) and to kill 50% of trypomastigote forms (LC_{50}) was estimated. The most prevalent chemical constituents of these essential oils were monoterpenes and sesquiterpenes. All essential oils tested demonstrated an inhibitory effect on the parasite growth and survival. *L. sidoides* and *L. organoides* essential oils were the most effective against trypomastigote and amastigote forms respectively. No significant cytotoxic effects were observed in mouse peritoneal macrophages incubated with essential oils which were more selective against the parasites than mammalian cells. Taken together, our results point towards the use of these essential oils as potential chemotherapeutic agent against *T. cruzi*.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Address: Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n – Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife 50670-420, Pernambuco, Brazil. Fax: +55 8134531911.

E-mail address: rcbqf01@gmail.com (R.C.B.Q. de Figueiredo).

1. Introduction

American trypanosomiasis, caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*, is an important public health concern in Latin America

(Rocha et al., 2007). It is estimated that 18 million people are infected and 100 million people live in areas at risk of infection (WHO, 2008).

The current treatment of Chagas disease is based on the use of nifurtimox (4((5-nitrofurfurylidene)amino)-3-methylthiomorpholine-1,1-dioxide), derived from nitrofurans, and benznidazole (*N*-benzyl-2-nitroimidazole-1-acetamide), a nitroimidazole derivative (Urbina, 2002). These drugs are very toxic to the patients presenting several side effects. Both Nifurtimox and Benznidazole are effective in the acute phase but their effectiveness in the chronic phase of disease is still controversial (Marin-Neto et al., 2009). In addition, the success of treatment also varies according to the geographical area, probably due to differences in drug susceptibility among different *T. cruzi* strains (Castro et al., 2006; Soeiro and De Castro, 2009). For these reasons, the development of new safe and more effective therapeutic agents is still needed.

Plants and their derived products are an interesting source of lead compounds that could be potentially active against protozoa (Croft et al., 2005; Salem and Werbovetz, 2006). Essential oils from aromatic plants have shown many biological activities against various microorganisms (Boyraz and Özcan, 2006; Tagboto and Townson, 2001; Tepe et al., 2006) including *T. cruzi* (Santoro et al., 2007a) and *Leishmania* (De Medeiros et al., 2011; Oliveira et al., 2009). Due to their low density and lipophilic feature they can interact with different intracellular targets (Rocha et al., 2005). Additionally, it has been shown that essential oils constituents also have immune modulatory effects on mammalian host (Cowan, 1999; Rocha et al., 2005). In this context, the present study investigated the *in vitro* activity of essential oils from plants of Northeast of Brazil, used in folk medicine, on epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. The cytotoxicity of these essential oils on mammalian cells was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and essential oil extraction

Lippia sidoides, *Lippia origanoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia pectorales* and *Vitex agnus-castus* were collected at the Garden of Medicinal and Aromatic Plants of the Universidade Federal do Piauí (UFPI), in Teresina, Piauí, Brazil. Voucher specimens were identified and deposited at the Graziela Barroso Herbarium in UFPI under numbers ICN TEPB18743, TEPB09205, TEPB25418, TEPB25506, TEPB25400 and TEPB18885 respectively. Essential oils were obtained by hydrodistillation, using the modified Clevenger apparatus (Craveiro et al., 1981).

2.2. Essential Oil chemical assay

The analysis of essential oils was performed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), with identification of constituents made by comparing the spectra obtained with those of the equipment data bank (Willey Mass Spectral Database 229) and the retention index (RI) calculated for each essential oil constituent (Adams, 2007). The GC/MS analysis was performed with a Shimadzu GC-17A/MS QP5050A-GC/MS system (EI mode 70 eV, source temperature 270 °C, scanned mass ranged 43–350 Daltons). Operating conditions were: capillary DB5 fused silica column (30 m × 0.25 mm; 0.25 mm film thickness); injector temperature 220 °C; column temperature set initially at 40 °C and then programmed at 3 °C/min to 240 °C; carrier gas helium, with linear gas velocity of 1.0 mL/min; split ratio 1:10; injected volume 1.0 mL (1% dilution in dichloromethane); inlet pressure 100.2 kPa. Mass spectra were taken at 70 eV; decomposition speed 1.000; decomposition interval 0.50; fragments from 45 to 450 Daltons

were decomposed. A mixture of hydrocarbons (C₉H₂₀ to C₂₆H₅₄) was injected under these same conditions.

2.3. Parasites

Culture epimastigote forms of *T. cruzi*, strain Dm28c (Contreras et al., 1988), were maintained by weekly passages at 28 °C in LIT medium (Camargo, 1964) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS). Three-day-old culture forms were used in all experiments. Trypomastigotes, Y strain (Silva and Nussenzweig, 1953), were obtained and harvest from *T. cruzi*-infected Vero cells as previously described (De Souza et al., 2004), cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The amastigote forms were obtained from infected peritoneal macrophages as detailed below.

2.4. Trypanocidal activity

For *in vitro* assay of trypanocidal activity, essential oils were initially dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), at a concentration of 50 mg/mL and stored at –20 °C. This stock solution was diluted to obtain a solution at 1 mg/mL in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) medium. This solution was once again diluted in the same culture medium at concentrations ranging from 15.6 to 250 µg/mL, so that the final concentration of DMSO never exceeded 0.2%, a concentration which is not toxic for the protozoa. In order to investigate the effects of essential oils on epimastigote growth, the parasites (2 × 10⁶ parasites/mL) were incubated for 72 h at 28 °C in the absence or presence of essential oils and the culture growth was estimated daily by cell counting. Trypomastigote forms (2 × 10⁶ cells/mL) were kept at 37 °C in RPMI medium supplemented with 10% FBS and then incubated for 24 h with essential oils. The IC₅₀ (concentration of essential oils that inhibits by 50% the growth of epimastigotes) and LC₅₀ (concentration of essential oils that kills 50% of trypomastigotes) were evaluated by cell counting in a Neubauer chamber, after 48 and 24 h of cultivation respectively. The data obtained were analyzed by regression analysis using the SPSS 8.0 software for Windows.

To evaluate the effects of essential oils on intracellular amastigote forms, peritoneal macrophages from Balb/c mice were harvested and seeded at 3 × 10⁵ cells/mL in a 24-well plate, supplemented with 10% inactivated FBS and allowed to adhere for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Adhered macrophages were then infected with culture-derived trypomastigote forms using a ratio 1:10 at 37 °C for 4 h. Afterward, non-interiorized parasites were removed by washing and the infected culture were incubated for 48 h in RPMI 1640 medium or treated with different concentrations of essential oils. The cultures were stained with Giemsa (Sigma–Aldrich, USA) and the parasite infection was determined by counting of total number of intracellular amastigote per 300 cells in duplicate. The concentration that inhibited the intracellular amastigote growth by 50% (IC₅₀) was estimated by regression analysis as described above.

2.5. Cytotoxicity assay

To evaluate the potential cytotoxic effect of essential oils on mammalian cells, peritoneal macrophages from Balb/c mice (5 × 10⁴ cells/well) were seeded in 96-well plates containing RPMI medium, supplemented with 10% inactivated FBS, and incubated for 2 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Non-adherent cells were then removed by washing with PBS and the remaining cells were allowed to growth for additional 48 h in RPMI in the absence or presence of the different concentrations of the essential oils. After

the incubation period cells were submitted to MTT colorimetric assay as previously described by Mosmann (1983). Briefly, treated and untreated cells were washed and incubated in fresh culture medium containing 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 3 h at 37 °C. After incubation, the cells were solubilized in DMSO (100 µL/well) and the formazan precipitates derived from MTT reduction was determined spectrophotometrically at 540 nm. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by regression analysis. The selectivity index (SI) was determined for trypomastigotes and amastigotes as the ratio of CC₅₀ to LC₅₀ or IC₅₀ values, respectively.

2.6. Ethical standards

All experiments involving the use of experimental animals were performed in accordance to the ethical standards of Fundação Oswaldo Cruz and were approved by the ethics committee (CEUA-FIOCRUZ L-0001/08).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Dunnett's test. The data were analyzed by GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results and discussion

Essential oils can be defined as a volatile complex mixture of constituents obtained from aromatic plants, mainly by hydrodistillation. In this work the chemical characterization of essential oils constituents were performed by comparison of their GC–MS retention data with retention indexes obtained by the combination of the essential oil with eight *n*-alkanes used as internal standards. This procedure greatly improved the identification of essential oil compounds, particularly those with very similar fragmentation patterns (De Lima et al., 2009). The chemical analysis of essential oils used in our experiments is presented in Table 1. The main constituent of *L. sidoides* essential oil was thymol (78.4%), whereas carvacrol (37.3%), thymol (22.4%) and γ -terpinene (10.9%) were the major constituents of *L. origanoides*. The 1,8-cineole was the main component of *V. agnus-castus* (34.3%), followed by α -Terpinyl acetate (10%). *O. gratissimum* presents eugenol (38.4%) as the main constituent followed by 1,8-cineole (21.6%) and (*E*)-ocimene (10%). The terpinolene was the major component of essential oils from *J. pectorales* and *C. ambrosioides* with 86.6% and 69.9% respectively. Other minor essential oil constituents were present at levels below 10%. It is important to note in all the essential oils a predominance of monoterpenes (C₁₀H₁₆) and sesquiterpenes (C₁₅H₂₄) hydrocarbons.

All the essential oils tested showed an inhibitory effect on epimastigote growth and caused loss of cell viability of trypomastigote

Table 1

Quantitative and qualitative composition of *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides*, *O. gratissimum*, *J. pectorales* and *V. agnus-castus* essential oils, as determined by GC/MS.

Constituents	Relative amount (%)		<i>L. sidoides</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>O. gratissimum</i>	<i>V. agnus-castus</i>	<i>J. pectorales</i>	<i>C. ambrosioides</i>
	RI ^a	RI ^b						
α -Pinene	932	935	–	–	1.9	–	–	–
Sabinene	969	972	–	–	1.8	–	–	–
β -Pinene	974	976	–	–	4.4	–	–	–
Myrcene	988	988	0.4	2.3	1.6	3.4	–	–
α -Phellandrene	1002	989	–	1.5	–	–	–	–
α -Terpinene	1014	1018	0.4	–	–	0.8	13.3	–
Limonene	1024	1028	0.4	–	–	–	–	–
1,8-Cineole	1026	1033	1.6	–	21.6	34.3	–	–
(<i>E</i>)-Ocimene	1044	1049	–	–	10.0	–	–	–
γ -Terpinene	1054	1062	1.1	10.9	–	1.7	–	–
Terpinolene	1086	1084	–	–	–	–	86.6	69.9
Linalool	1095	1091	–	0.3	1.2	–	–	–
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1098	1102	–	0.2	–	–	–	–
Terpinen-4-ol	1174	1177	0.6	0.3	–	–	–	–
α -Terpineol	1186	1189	–	–	1.0	2.9	–	–
(<i>Z</i>)-Ocimenone	1226	1228	–	0.3	–	–	–	–
Thymol methyl ether	1232	1235	1.4	0.2	–	–	–	–
Ascaridole	1234	1237	–	–	–	–	–	17.1
Thymol	1289	1298	78.4	22.4	–	–	–	–
Carvacrol	1298	1299	–	37.3	–	–	–	–
Linalool propanoate	1334	1330	–	–	–	0.9	–	–
α -Terpinyl acetate	1346	1347	–	–	–	10.0	–	–
Eugenol	1356	1356	–	–	38.4	–	–	–
α -Copaene	1374	1378	–	0.2	–	–	–	–
β -Elemene	1389	1380	–	–	0.5	–	–	–
(<i>Z</i>)-Caryophyllene	1408	1408	–	0.2	–	–	–	–
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1417	1418	6.2	2.1	5.5	–	–	–
Aromadendrene	1439	1433	0.5	–	–	–	–	–
α -Humulene	1452	1452	0.3	–	–	–	–	–
(<i>E</i>) β -Famesene	1454	1458	–	–	–	5.6	–	–
γ -Murolole	1478	1477	–	–	0.6	–	–	–
Germacrene D	1484	1487	–	–	2.3	2.3	–	–
β -Selinene	1489	1490	–	–	5.5	–	–	–
Viridiflorene	1496	1489	0.4	–	–	–	–	–
α -Selinene	1498	1494	–	–	2.0	–	–	–
δ -Cadinene	1522	1537	–	0.2	–	0.9	–	–
Spathulenol	1577	1572	0.4	–	–	–	–	–
Caryophyllene oxide	1582	1581	0.4	0.4	–	–	–	–
Dihydrosclorene	1974	1969	–	–	–	0.7	–	–

^a Literature Retention Index (Adams, 2007).

^b Experimental Retention Index.

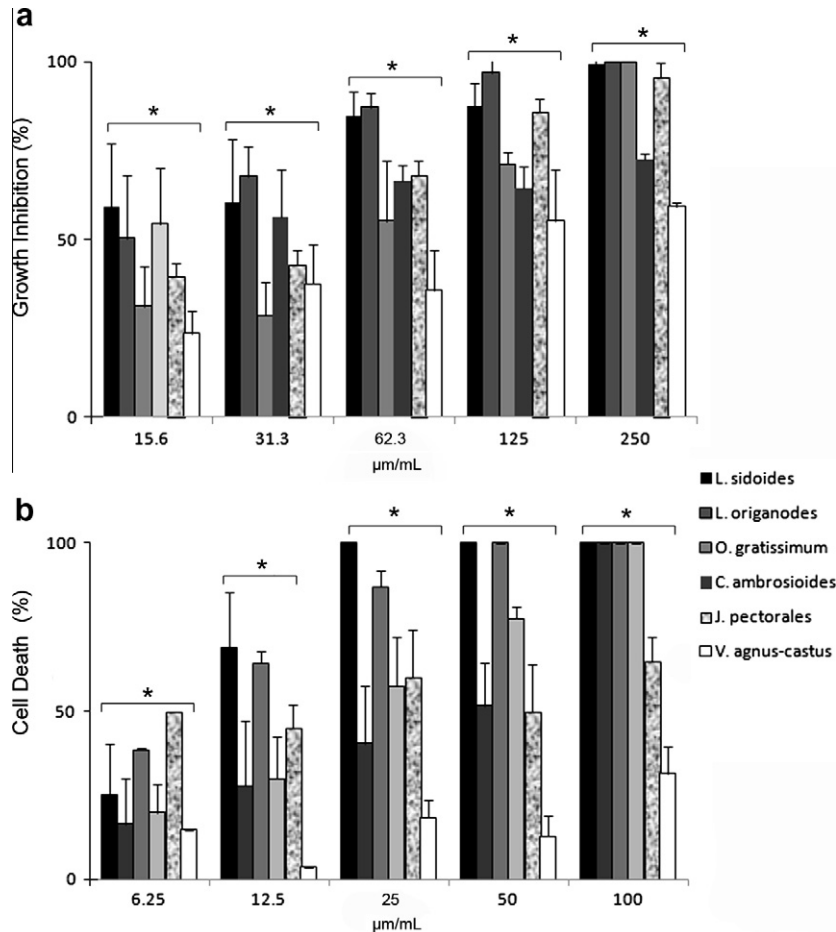


Fig. 1. Effects of *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides*, *O. gratissimum*, *J. pectorales* and *V. agnus-castus* essential oils on (a) epimastigote growth and (b) trypomastigote viability after 48 and 24 h of incubation respectively. The bars represent the mean of three independent experiments in triplicate \pm SD. * $p < 0.05$ compared to control.

Table 2

Trypanocidal and cytotoxic effects of essential oils from *L. sidoides*, *L. origanoides*, *J. pectorales*, *O. gratissimum*, *C. ambrosioides* and *V. agnus-castus*.

Essential Oils	Macrophage CC ₅₀ (µg/mL)	Epimastigote IC ₅₀ (µg/mL)	Trypomastigote LC ₅₀ (µg/mL)	Amastigote IC ₅₀ (µg/mL)	SI _(trypo)	SI _(ama)
<i>L. sidoides</i>	192.7 \pm 0.3	28.9 \pm 4.9	10.3 \pm 0.5	41.7 \pm 12.3	18.7	4.6
<i>L. origanoides</i>	175.7 \pm 0.4	26.2 \pm 5.3	39.7 \pm 11.4	29.8 \pm 3.0	4.4	5.9
<i>J. pectorales</i>	176.9 \pm 1.2	56.8 \pm 18.9	44.5 \pm 10.2	*	3.9	*
<i>O. gratissimum</i>	180.4 \pm 1.0	71.1 \pm 12.2	11.5 \pm 0.3	30.7 \pm 2.3	15.7	5.9
<i>C. ambrosioides</i>	275.6 \pm 0.7	21.3 \pm 6.8	28.1 \pm 7.0	50.2 \pm 6.0	9.8	5.5
<i>V. agnus-castus</i>	617.9 \pm 8.1	157.1 \pm 36.5	155.8 \pm 5.4	*	3.9	*

* Not determined.

forms in a dose-dependent way. Except for trypomastigotes treated with 12 µg/mL of *V. agnus-castus* essential oil, statistical differences ($p < 0.05$) between treated-cells and control cells were observed for all essential oil treatments (Fig. 1). The essential oils from *C. ambrosioides*, *L. origanoides* and *L. sidoides* were the most effective against epimastigotes, exhibiting IC₅₀ values of approximately 21.3, 26.2 and 28.9 µg/mL, respectively, whereas the less effective were the essential oils from *J. pectorales*, *O. gratissimum* and *V. agnus-castus* with IC₅₀ values of about 56.8, 71.1 and 157.1 µg/mL, respectively (Table 2). *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *C. ambrosioides* and *L. origanoides* were found to be more effective against trypomastigotes with LC₅₀/24 h values of about 10.3, 11.5, 28.1 and 39.7 µg/mL, respectively. *O. gratissimum* essential oil, for example, was about 6 times more toxic for trypomastigote than epimastigote forms. These results are particularly important

since the trypomastigotes are the infective forms found in the vertebrate host. On the other hand, essential oils from *J. pectorales* and *V. agnus-castus* presented lower activity against trypomastigotes with a LC₅₀/24 h values of 44.5 and 155.8 µg/mL respectively. Our previous studies have demonstrated that *L. sidoides* and *L. origanoides* were effective against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *O. gratissimum* was effective against *Leishmania chagasi* promastigotes (De Medeiros et al., 2011; Oliveira et al., 2009). Escobar et al. (2010) demonstrated the activity of different Colombian varieties of *L. origanoides* against *T. cruzi* and *L. chagasi*. According to these authors, the qualitative and quantitative differences existing between the *Lippia* essential oils are dependent on the *Lippia* species and on the place of plant collection. These differences have direct implication on the trypanocidal and leishmanicidal activities of these oils.

Interestingly, a Colombian sample of *L. origanoides*, whose the chemical composition was similar to those found in our *L. origanoides* specimen, also presented similar activities against *T. cruzi*.

Essential oils as well as their components have been found to possess a wide spectrum of pharmacological effects including antibacterial, antifungal, antiviral, antihelminthic and antiprotozoal activities (Macedo et al., 2010; Machado et al., 2011; Ocazonez et al., 2010; Reichling et al., 2009; Santos et al., 2010). They are also known to have important biological activities against trypanosomatids as *Trypanosoma brucei* (Otoguro et al., 2011), *Leishmania* (De Medeiros et al., 2011; Monzote et al., 2007; Oliveira et al., 2009) and *T. cruzi* (Santoro et al., 2007a, 2007b, 2007c). These activities are mainly attributed to the presence terpenic, aromatic and aliphatic constituents (Bakkali et al., 2008; Schelz et al., 2010).

The trypanocidal activity of thymol-rich essential oils has already demonstrated. Santoro et al. (2007c) have showed that treatment of *T. cruzi* with crude essential oil of *Thymus vulgaris* (thyme) caused a dose-dependent growth inhibition of epimastigotes with IC_{50} of 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both crude essential oil and thymol, the main constituent of thyme oil, proven to be also effective against trypomastigotes with LC_{50} for thymol of approximately 62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Santoro et al. (2007c). The phenolic compound eugenol, the main constituent of *Ocimum gratissimum*, was also found in the essential oil of *Zyzygium aromaticum*, which showed to be effective against *T. cruzi*. However, incubation of eugenol alone was less effective than crude essential oil of *Z. aromaticum* (Santoro et al., 2007b). Although *O. gratissimum* and *Z. aromaticum* essential oils have eugenol as main constituent, the activity of *O. gratissimum*, against *T. cruzi* was higher for both epimastigote and trypomastigote forms as demonstrated in the present study. The contrast of results obtained with *S. aromaticum*/eugenol and *O. gratissimum* essential oil could be explained by synergistic or antagonistic effects of other compounds in the oil mixture. Carvacrol, the main constituent of *L. origanoides*, has a broad-spectrum of antimicrobial activity extended to food spoilage or pathogenic fungi, yeast and bacteria as well as human, animal and plant pathogenic microorganisms (Nostro and Papalia, 2012). Furthermore, previous studies have demonstrated that carvacrol bearing essential oils present toxicity against *L. amazonensis* and *T. cruzi*, with no significant toxicity to mammalian cells (Escobar et al., 2010). Taken together these data open perspectives to the use of essential oils and their isolated constituents as potential chemotherapeutic agents for the treatment of parasitic diseases caused by tripanosomatids.

It is usually assumed that terpenic constituents are responsible for the hydrophobic feature of essential oils (Burt et al., 2005) which allows essential oils to freely permeate the cell membranes and kill the parasites by affecting their cytoplasmic metabolic pathways or organelles (Knobloch et al., 1989). On the other hand, essential oils themselves could interact with parasite membrane and cause drastic physiologic changes leading to the loss of membrane permeability which ultimately lead to cell death (Bakkali et al., 2008; Knobloch et al., 1989). However, due to the great number of constituents and the synergistic or antagonistic interactions existing between them it is likely that essential oils have other cellular targets besides the cellular membranes. In fact the interactions of essential oils with lipids and proteins have been reported (Bakkali et al., 2008).

Essential oils and their isolated constituents have been reported to be well tolerated by mammalian cells and some of them present a protective effect against oxidative stress (El-Nekeety et al., 2011). In our work we found that all essential oils presented no toxicity against mammalian cells (>100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The lowest cytotoxic activity was observed in *V. agnus-castus* and *C. ambrosioides*-treated cells with a CC_{50} of 617.9 and 275.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. However, *V. agnus-castus* was also the less effective against trypomastigote forms. *L. sidoides*, *L. origanoides*, *J. pectorales* and *O. gratissimum*

showed CC_{50} value of 192.7, 175.7, 176.9 and 180.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Table 2). In order to compare the trypanocidal activity and the toxicity of essential oils for mammalian cells, the selectivity index (SI) was estimated. All essential oils showed to be more effective against trypomastigote than mammalian cells with SI equal or superior to 2.0 (Houghton et al., 2007). The SI values for *L. sidoides*, *O. gratissimum* and *C. ambrosioides* were 18.7, 15.7 and 9.8, respectively indicating the high selectivity of these oils towards the parasites. Among all essential oils tested, *L. sidoides* essential oil was both the most selective and effective against trypomastigotes. On the other hand, *V. agnus-castus* and *J. pectorales* presented lower values of SI (3.9) (Table 2).

Since *L. sidoides*, *L. origanoides*, *O. gratissimum* and *C. ambrosioides* showed higher SI values for trypomastigote we have further analyzed the effects of these essential oils against intracellular amastigote forms. Our results showed that except for *L. origanoides*, which presented an IC_{50} of about 29.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amastigote forms showed to be more resistant to essential oils treatment than trypomastigotes with IC_{50} values of about 30.7, 41.7 and 50.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *O. gratissimum*, *L. sidoides* and *C. ambrosioides*, respectively. The lower susceptibility of amastigote forms when compared with trypomastigotes can be due to the fact that essential oils must have to cross the host cell membrane and the parasitophorous vacuole membrane in order to gain access to intracellular parasite, whereas the extracellular trypomastigote is directly exposed to essential oils. Furthermore the interaction of essential oils with host cell components and the inner cell environment conditions should be also taken into account. The SI values found for amastigotes showed that all essential oils were more toxic to this form than to mammalian cells.

In conclusion, the low toxicity of essential oils to mammalian cell associated to the significant trypanocidal activity of the essential oils of *L. sidoides*, *L. origanoides*, *C. ambrosioides*, and *O. gratissimum* points these oils as promissory candidates for trypanocidal drugs. Moreover the trypanocidal activity of *L. sidoides* and *J. pectorales* on the three evolutive forms of *T. cruzi* were demonstrated for the first time in this work. Further studies are required to elucidate the mechanisms of parasite death induced by the most promissory essential oils and identify their putative intracellular targets.

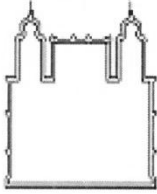
Acknowledgments

This work has been supported by CAPES and CPqAM - FIOCRUZ.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Bakkali, F., Averberk, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - a review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475.
- Boyraz, N., Özcan, M., 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey Intern. J. Food Microbiol. 107, 238–242.
- Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J., 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. J. Food Prot. 68, 919–926.
- Camargo, E.C., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo. 6, 93–100.
- Castro, J.A., de Meca, M.M., Bartel, L.C., 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). Hum. Exp. Toxicol. 25, 471–479.
- Contreras, V.T., Araújo-Jorge, T.C., Bonaldo, M.C., Thomaz, N., Barbosa, H.S., Meirelles, M.N.S.L., Goldenberg, S., 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83, 123–133.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. 12, 564–582.
- Craveiro, A.A., Fernandes, A.G., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., Machado, M.L.L., 1981. Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste. UFC, Fortaleza, BR.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends Parasitol. 21, 508–512.

- De Lima, S.G., Neto, J.M.M., Cito, A.M.G.L., Da Costa, J.G.M., Reis, F.A.M., 2009. Monoterpenes, sesquiterpenes and fatty acids from *Julocroton triquetra* (Euphorbiaceae) from Ceara – Brazil. *J. Chil. Chem. Soc.* 53, 1718–1720.
- De Medeiros, M.D., Da Silva, A.C., Cito, A.M., Borges, A.R., de Lima, S.G., Lopes, J.A., Figueiredo, R.C.B.Q., 2011. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int.* 60, 237–241.
- De Souza, E.M., Lansiaux, A., Bailly, C., Wilson, W.D., Boykin, W.D., Hu, Q., Batista, M.M., Araujo-Jorge, T.C., Soeiro, M.N., 2004. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem. Pharmacol.* 68, 593–600.
- El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol.* 57, 984–991.
- Escobar, P., Lea, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R., Stashenko, E., 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 184–190.
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P.J., Lee, C.C., 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 42, 377–387.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil Res.* 1, 118–119.
- Macedo, I.T., Bevilacqua, C.M., de Oliveira, L.M., Camurça-Vasconcelos, A.L., Vieira, L.S., Oliveira, F.R., Queiroz-Junior, E.M., Tomé, A.R., Nascimento, N.R., 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 173, 93–98.
- Machado, M., Dinis, A.M., Salgueiro, L., Custódio, J.B., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., 2011. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Exp. Parasitol.* 127, 732–739.
- Marin-Neto, J.A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A.C., Rassi, A., Morillo, C.A., Sosa-Estani, S., Yusuf, S., 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 319–324.
- Monzote, L., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed. Pharmacother.* 61, 148–153.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nostro, A., Papalia, T., 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 7 (1), 28–35.
- Ocazonez, R.E., Meneses, R., Torres, F.A., Stashenko, E., 2010. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 304–309.
- Oliveira, V.C., Moura, D.M., Lopes, J.A., De Andrade, P.P., Da Silva, N.H., Figueiredo, R.C.B.Q., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham. and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol. Res.* 104, 1053–1059.
- Otoguro, K., Iwatsuki, M., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara-Tukashima, A., Kiyohara, H., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Omura, S., Yamada, H., 2011. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. *Phytochem.* 72, 2024–2030.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R., 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forsch. Komplementmed.* 16, 79–90.
- Rocha, L.G., Almeida, J.R., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M.A., 2005. Review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomed.* 12, 514–535.
- Rocha, M.O., Teixeira, M.M., Ribeiro, A.L., 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 5, 727–743.
- Salem, M.M., Werbovetz, K.A., 2006. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 13, 2571–2598.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G., Freire, J.M., Soares, M.J., 2007a. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol.* 134, 1649–1656.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G., Mendonça, L.Z., Soares, M.J., 2007b. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283–290.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G., Salgado, A.P., Mena-Barreto, R.F., Soares, M.J., 2007c. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783–790.
- Santos, A.O., Santin, A.C., Yamaguchi, U.M., Cortez, L.E., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Nakamura, S.V., 2010. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 475–483.
- Schelz, Z., Hohmann, J., Molnar, J., 2010. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. In: Chattopadhyay, D. (Ed.), *Ethnomedicine: a Source of Complementary Therapeutics*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 281–304.
- Silva, L.V.A., Nussenzweig, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clínica Biol. São Paulo* 20, 191–201.
- Soeiro, M.N., De Castro, S.L., 2009. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 105–121.
- Tagboto, S., Townson, S., 2001. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv. Parasitol.* 50, 199.
- Tepe, B., Akpulat, H.A., Sokmen, M., Daferera, D., Sokmen, M., Yumrutas, O., Aydin, E., Polissiou, M., Sokmen, A., 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chem.* 97, 719–724.
- Urbina, J.A., 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* 8, 287–295.
- WHO. Les Chagas disease: control and elimination, 2008. Report of the Secretariat. EB124/17.

ANEXO B - Parecer do CEUA/CPqAM

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" *Estudo dos efeitos de compostos naturais e sintéticos sobre tripanosomatídeos.* "

número P-427/07, proposto por Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo, foi licenciado pelo N° L-001/08.

Sua licença de N° L-001/08 autoriza o uso anual de :

- 2 *Oryctolagus cuniculus*

- 400 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 19 de fevereiro de 2012 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008

Dra. Norma Vollmer Laparthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ