

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL TRIPANOCIDA, CITOTÓXICO E
IMUNOMODULADOR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA CAATINGA

RECIFE

2017

LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL TRIPANOCIDA, CITOTÓXICO E
IMUNOMODULADOR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Biociências e Biotecnologia em
Saúde do Instituto Aggeu Magalhães,
FIOCRUZ-PE para obtenção do título de
doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan
Queiroz de Figueiredo
Coorientadora: Dra. Márcia Vanusa da
Silva

RECIFE

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S729a Souza, Larissa Isabela Oliveira de.
Avaliação in vitro do potencial tripanocida, citotóxico e imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga / Larissa Isabela Oliveira de Souza. - Recife: s.n, 2017.
170 p. : il., graf., tab.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo; coorientadora: Márcia Vanusa da Silva.
1. Trypanosoma cruzi - efeito de drogas. 2. Óleos essenciais - uso terapêutico. 3. Óleos essenciais - toxicidade. 4. Plantas medicinais. 5. Citotoxicidade. 6. Doença de chagas - quimioterapia. 7. Tripanossomicidas. 8. Antiprotozoários - uso terapêutico. 9. Antiprotozoários - toxicidade. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Silva, Márcia Vanusa da. ths. III. Título.

CDU 616.937

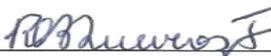
LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL TRIPANOCIDA, CITOTÓXICO E
IMUNOMODULADOR DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Biociências e Biotecnologia em
Saúde do Instituto Aggeu Magalhães,
FIOCRUZ-PE para obtenção do título de
doutor em Ciências.

Aprovado em: 13/04/2017

BANCA EXAMINADORA:



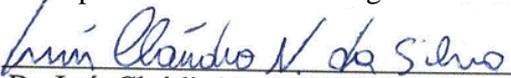
Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo (Orientadora)
Departamento de Microbiologia do IAM/FIOCRUZ



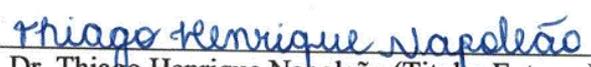
Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (Titular Interno)
Departamento de Microbiologia do IAM/FIOCRUZ



Dra. Danielle Maria Nascimento Moura (Titular Externo)
Departamento de Imunologia do IAM/FIOCRUZ



Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva (Titular Externo)
Departamento de Biologia Parasitária da CEUMA



Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Externo)
Departamento de Bioquímica da UFPE

Dedico este trabalho aos amores da minha vida, meus pais (Maria de Souza e José de Oliveira) e meus irmãos (Lucas e João), pelo amor incondicional, companheirismo, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida, por serem meus maiores motivadores e acreditarem sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, uma força que sinto presente em todos os segundos da minha vida, que me guia, fortalece e impulsiona.

À Nossa Senhora Aparecida, por interceder por mim junto á Deus.

Aos que sempre me apoiaram incondicionalmente e que são os que mais estão felizes com essa conquista: minha amada família, meus pais (Maria e José), meus irmãos (Lucas e João), meus primos-irmãos (Tatiana, Renata e Rômulo) e meus primos-sobrinhos (Ruan, Rafael, Caio e Malu). Ao meu querido Gustavo e sua família (Fátima e Carlito) pelo companheirismo, alegria, dedicação, amor, carinho e palavras de conforto nos momentos difíceis. Aos meus cunhados (Jéssica, Lourdes, Wilson e em especial a Letícia) pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

À Dr^a Regina Bressan pela orientação durante a realização do doutorado, por ter acreditado e investido em conhecimento acadêmico, pela paciência e disponibilidade em passar seus conhecimentos. A minha co-orientadora, Dra. Márcia Vanusa, pela disponibilidade, auxílio e colaboração na parte de obtenção dos óleos essenciais.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos (integrantes e ex-integrantes), Ana Carla, Andrezza, Camila, Carina, Cinthia, Cynarha, Danilo, Divar, Isis, Flávia, Keicy, Lays, Mary, Moana, Rafaela, Rayana, Rômulo, Rosymeri, Suênia, Sumara, Tayná, Tuane, Vinicius e Vitor pela boa convivência, companheirismo e momentos de descontração. Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos pelos ensinamentos Dr^o Antonio Pereira e Dr^a Milena de Paiva. E em especial as amigas que o LBCP colocou em minha vida, Amanda, Jana, Lívia, Neyla e especialmente a Karla e Taciana, pelos valiosos ensinamentos, conselhos, amizade verdadeira, incentivo e por tornarem os dias mais fáceis principalmente com as dificuldades encontradas no meio do caminho.

A todos os amigos do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde e a todos do departamento de Microbiologia, em especial a Igor, Gustavo, Morgana, Michele, Nathaly, Renata e Karine.

Aos amigos, que mesmo distante se fizeram presentes, Altair, Andresa, Andressa, Aurenice, Daniela, Hêlvio, Luana, Moézio, Monique, Rafael, Rita, Rodrigo, Rosanne, Vanessa e Tássio

que sempre me deram carinho, incentivo, conselhos, apoio, boa conversa e abraço apertado. Agradecimento especial ao meu amigo Luís e sua família (Maria, Edilson, Débora, André e Artur), os quais foram fundamentais no processo de seleção de doutorado e adaptação em Recife, muito obrigada pela receptividade e por me tratarem como se eu fosse da família.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Aos Pesquisadores e Discentes do programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde (PPGBBS) pelos ensinamentos transmitidos e o companheirismo. A todos os colaboradores do PPGBBS que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Janice.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, aos técnicos e tecnologistas da Plataforma tecnológica (em especial Karina e Cássia) e a secretária do departamento de Microbiologia (Karol), pela cordialidade e prestatividade.

Aos pesquisadores Dr^o Antonio Neves, Dr^a Valéria Pereira e Dr^o Thiago Napoleão pelas contribuições na participação da banca do exame de qualificação.

Ao Dr^o Alexandre Silva pela identificação do material botânico e ao Msc. Clóvis Macêdo pelo auxílio na extração dos óleos essenciais.

Ao Dr^o Paulo Euzébio pelo auxílio na aquisição dos dados de citometria de fluxo.

À Dr^a Daniella Navarro e Msc. Patrícia Bezerra pelo auxílio na caracterização química dos óleos essenciais.

À Dr^a Virginia Lorena pelo auxílio na aquisição dos dados das dosagens de citocinas.

À equipe do Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo auxílio com os experimentos envolvendo camundongos.

Peço para que Deus abençoe a todos que contribuíram com seu tempo e paciência para realização deste trabalho.

*“Cada planta tem centenas de substâncias, e uma delas pode ser
mais importante que uma galáxia.”*

Otto Gottlieb

*“Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece.”
Filipenses, 4:13*

SOUZA, Larissa Isabela Oliveira de. **Avaliação *in vitro* do potencial tripanocida, citotóxico e imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga.** 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

A doença de Chagas constitui um sério problema de saúde pública em toda a América Latina e particularmente no Brasil. Os tratamentos disponíveis para esta doença se limitam à utilização de drogas tóxicas, de custo elevado e com baixa eficácia na fase crônica da doença. Este trabalho investigou as atividades tripanocida, citotóxica e imunomoduladora *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de *Eugenia brejoensis* (EB), *Hyptis fruticosa* (HF), *Hyptis pectinata* (HP), *Hyptis salzmannii* (HS), *Lippia macrophylla* (LM) e *Syagrus coronata* (SC). Nossos resultados mostraram que exceto o OESC, que foi rico em ácidos graxos, os demais OEs foram ricos em terpenos e seus derivados oxigenados, sendo o trans-cariofileno um dos constituintes majoritários da maioria dos OEs estudados. Todos os OEs foram capazes de inibir o crescimento de formas epimastigotas e amastigotas, causaram a perda da viabilidade celular de tripomastigotas, diminuíram o percentual de macrófagos infectados *in vitro* e foram mais seletivos para o parasita em relação às células de mamíferos. Os OEs de EB e HP foram considerados os mais promissores por apresentarem índices de seletividade maior que 10. O OESC induziu aumento na produção de TNF- α e diminuição de IL-10, enquanto o OELM e o OEHF diminuíram a produção de IL-6, IL-10 e TNF- α . Nossos resultados demonstraram que os OEs mais promissores, OEEB e OEHP, parecem atuar em múltiplos alvos intracelulares do parasita, as principais alterações encontradas foram: desorganização do citoplasma, aumento no número vacúolos, alteração do potencial de membrana mitocondrial, desestruturação do núcleo e do k-DNA. Concluindo, nossos dados apontam que os OEs estudados, principalmente OEEB e OEHP são promissores para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para a doença de Chagas.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Produtos naturais. Quimioterapia. Resposta imune.

SOUZA, Larissa Isabela Oliveira de. ***In vitro* evaluation of the trypanocidal, cytotoxic and immunomodulatory potential of essential oils of plant from Caatinga.** 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

Chagas disease is a serious public health problem in Latin America and particularly in Brazil. The available treatments for this disease are limited to the use of toxic, costly drugs with low efficacy in the chronic phase of the disease. This work investigated the *in vitro* trypanocidal, cytotoxic and immunomodulatory activity of essential oils of the *Eugenia brejoensis* (EB), *Hyptis fruticosa* (HF), *Hyptis pectinata* (HP), *Hypenia salzmannii* (HS), *Lippia macrophylla* (LM) and *Syagrus coronata* (SC). Our results showed that, except for EOSC, which was rich in fatty acids, the others EOs were rich in terpenes and their oxygenated derivatives, with trans-caryophyllene being one of the major constituents of most EOs studied. All EOs tested were able to inhibit the growth of epimastigotes and amastigotes forms, cause the loss of the cellular viability of trypomastigotes, decrease in the percentage of infected macrophages and were more selective for parasites than mammalian cells. The EOs from EB and HP were considered the most promising because they presented selectivity indices greater than 10. EOSC induced an increased production of TNF- α and decrease in IL-10, whereas EOLM and EOHP decreased the production of IL-6, IL-10 and TNF- α . The studies of the mechanisms involved in the trypanocidal activity showed that the most promising EOs, EOEB and EOHP, acted on multiple intracellular targets of the parasite without apparently cause damage to the host cells. The main alterations found were: cytoplasmic disorganization, increasing in the number vacuoles, alteration of the mitochondrial membrane potential, the disruption of the nucleus and k-DNA. In conclusion, our results showed that the EOs studied, especially the EOs of *E. brejoensis* and *H. pectinata*, are promising for the development of new chemotherapeutic agents for Chagas' disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Natural products. Chemotherapy. Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial dos indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 2	Distribuição das espécies de triatomíneos de relevância epidemiológica da transmissão da doença de Chagas	20
Figura 3	Radiografias demonstrando as manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas	21
Figura 4	Formas evolutivas do agente etiológico da doença de Chagas, <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 5	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 6	Estruturas e organelas encontradas na forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 7	Resposta imune inata dependente dos receptores do tipo toll na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 8	Imunidade inata e adquirida durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 9	Estruturas dos fármacos utilizados para tratamento da doença de Chagas	38
Figura 10	Mapa do bioma Caatinga	43
Figura 11	Principais componentes encontrados nos óleos essenciais de <i>Eugenia brejoensis</i> , <i>Hyptis fruticosa</i> , <i>Hyptis pectinata</i> , <i>Hypenia salzmannii</i> , <i>Lippia macrophylla</i> e <i>Syagrus coronata</i> .	60
Figura 12	Atividade hemolítica dos óleos essenciais de <i>Eugenia brejoensis</i> , <i>Hyptis fruticosa</i> , <i>Hyptis pectinata</i> , <i>Hypenia salzmannii</i> , <i>Lippia macrophylla</i> e <i>Syagrus coronata</i> .	61
Figura 13	Efeito dos óleos essenciais na infecção e sobrevivência de amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos	63
Figura 14	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com o óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>	64
Figura 15	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com o óleo essencial de <i>Hypenia salzmannii</i>	65
Figura 16	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas	65

	com o óleo essencial de <i>Hyptis fruticosa</i>	
Figura 17	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com o óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	66
Figura 18	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com o óleo essencial de <i>Lippia macrophylla</i>	67
Figura 19	Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com o óleo essencial de <i>Syagrus coronata</i>	67
Figura 20	Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de culturas infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
Figura 21	Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de culturas infectada com <i>T. cruzi</i> tratado com o óleo essencial de <i>Eugenia brejoensis</i>	71
Figura 22	Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de cultura infectada com <i>T. cruzi</i> tratado com o óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	72
Figura 23	Análises por citometria de fluxo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP	74
Figura 24	Análises por microscopia confocal a laser de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP	75
Figura 25	Análises por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP	76
Figura 26	Análises por citometria de fluxo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123	77
Figura 27	Análises por microscopia confocal a laser de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123	78
Figura 28	Análise por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123	79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Grupos químicos dos componentes dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata* **55**
- Tabela 2** Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata* **56**
- Tabela 3** Atividade tripanocida e citotóxica dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata* **61**
- Tabela 4** Análise através da citometria de fluxo dos efeitos dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas e tripomastigotas utilizando rodamina 123 **78**
- Tabela 5** Análises por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com MitoSoxRed **80**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AV	Anexina V
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC ₅₀	Concentração que causa a perda de viabilidade em 50% das células
CD	Célula dendrítica
CEUA	Comitê de ética em experimentação animal
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fosfatidilserina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
INF- γ	Interferon gama
IP	Iodeto de propídio
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
ISe	Índice de seletividade
IV	Índice de variação
kDNA	DNA mitocondrial

LBCP	Laboratório de Biologia Celular de Patógenos
DC	Doença de Chagas
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MnCl ₂	Cloreto de manganês
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos - <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PRR	Receptor de reconhecimento padrão - <i>Pattern Recognition Receptor</i>
Rh 123	Rhodamina 123
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TLR	Receptor tipo Toll - <i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	Organização Mundial da Saúde - <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Doença de Chagas	18
2.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>: agente etiológico da doença de Chagas	22
2.2.1	<i>O ciclo de vida do Trypanosoma cruzi</i>	25
2.2.2	<i>Mecanismos de morte celular programada em Trypanosoma cruzi</i>	30
2.3	<i>Resposta imune na doença de Chagas</i>	31
2.4	Quimioterapia da doença de Chagas	38
2.5	Óleos Essenciais	41
2.6	Plantas da Caatinga	43
2.6.1	<i>Eugenia brejoensis</i> Mazine (<i>Myrtaceae</i>)	44
2.6.2	<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm (<i>Lamiaceae</i>)	45
2.6.3	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit (<i>Lamiaceae</i>)	45
2.6.4	<i>Hyptenia salzmannii</i> (Benth.) Harley (<i>Lamiaceae</i>)	45
2.6.5	<i>Lippia macrophylla</i> (Cham.) Linnaea (<i>Verbenaceae</i>)	46
2.6.6	<i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Beccari (<i>Arecaceae</i>)	46
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47
4	METODOLOGIA	48
4.1	Obtenção e caracterização química dos óleos essenciais	48
4.2	Animais	49
4.3	Citotoxicidade	49
4.4	Cultivo dos Parasitos	50
4.5	Atividade tripanocida	51
4.6	Análise do perfil de citocinas produzidas por células de exsudato peritoneal infectadas por <i>T. cruzi</i>	51
4.7	Produção de óxido nítrico por células de exsudato peritoneal infectadas por <i>T. cruzi</i>	52
4.8	Estudo ultraestrutural	52
4.9	Análise do mecanismo de morte celular induzido pelos óleos essenciais de	53

	plantas da Caatinga	
4.10	Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial e geração de radicais livres	53
4.11	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Caracterização química dos óleos essenciais de plantas da Caatinga	55
5.2	Atividade citotóxica e tripanocida dos óleos essenciais de plantas da Caatinga	60
5.3	Atividade imunomoduladora dos óleos essenciais de plantas da Caatinga	64
5.4	Alterações ultraestruturais induzidas pelo tratamento com os óleos essenciais de <i>E. brejoensis</i> e <i>H. pectinata</i>	68
5.5	Avaliação da morte celular induzida pelo tratamento com os óleos essenciais de <i>E. brejoensis</i> e <i>H. pectinata</i>	73
5.6	Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais de <i>E. brejoensis</i> e <i>H. pectinata</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial	76
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A – Manuscrito submetido: The chemical composition and trypanocidal activity of essential oils from Brazilian Caatinga Plants	112
	APÊNDICE B – Artigo publicado: <i>In vitro</i> cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products	134
	APÊNDICE C – Artigo publicado: Antimicrobial activity of <i>Buchenavia tetraphylla</i> against <i>Candida albicans</i> strains isolated from vaginal secretion	162
	ANEXO A – Declaração do Instituto Chico Mendes	169
	ANEXO B – Certificado do CEUA / CPqAM	170

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*. A doença é endêmica na América Latina, afeta entre 7 e 8 milhões de pessoas em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013) e acarreta 7.000 mortes por ano (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2015). Nenhuma vacina está disponível e apenas benzonidazol e nifurtimox são os medicamentos clinicamente disponíveis para o tratamento desta patologia. Estes fármacos apresentam elevada toxicidade e sua eficácia na fase crônica da doença é questionável (BERMUDEZ et al., 2016). Devido à elevada toxicidade, o nifurtimox teve seu uso descontinuado em alguns países, incluindo o Brasil (BOIANI et al., 2010). Tais fatos tornam relevante a pesquisa por novas alternativas terapêuticas que sejam mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento da doença de Chagas (BEAUMIER et al., 2016).

Os produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, são considerados uma fonte promissora de compostos bioativos contra vários microrganismos infecciosos. Em acréscimo, geralmente são considerados seguros, acessíveis e mais eficazes do que os produtos farmacêuticos sintéticos (HAMEDT et al., 2014). Os óleos essenciais (OEs) são produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados por misturas complexas de substâncias com baixo peso molecular, lipofílicas e geralmente de natureza terpênica (BAKKALI et al., 2008). Estudos reportam que diversos OEs e seus componentes apresentam atividades biológicas contra bactérias, fungos (CARDOSO; SOARES, 2010) e protozoários, incluindo *Trypanosoma cruzi* (BORGES et al., 2012; SANTORO et al., 2007a, 2007b, 2007c). Os OEs podem atuar tanto diretamente sobre o agente patogênico como através de suas propriedades imunomoduladoras (ANTONY et al., 2005).

Tendo em vista que o bioma Caatinga é marcado por severas condições climáticas bastante adversas, suas plantas desenvolvem características químicas peculiares que as tornaram excelentes fontes de compostos bioativos contra diversos microrganismos (ALMEIDA et al., 2006; SILVA et al., 2013). Além do mais, muitas espécies nativas da Caatinga são utilizadas na medicina popular devido a propriedades curativas (ALBURQUERQUE et al., 2012; MOURA et al., 2015). Embora vários estudos tenham demonstrado o potencial farmacológico de OEs de plantas da Caatinga (MENDES et al., 2010; MOTA et al., 2012; SANTOS et al., 2015) sua vasta diversidade biológica é ainda pouco explorada.

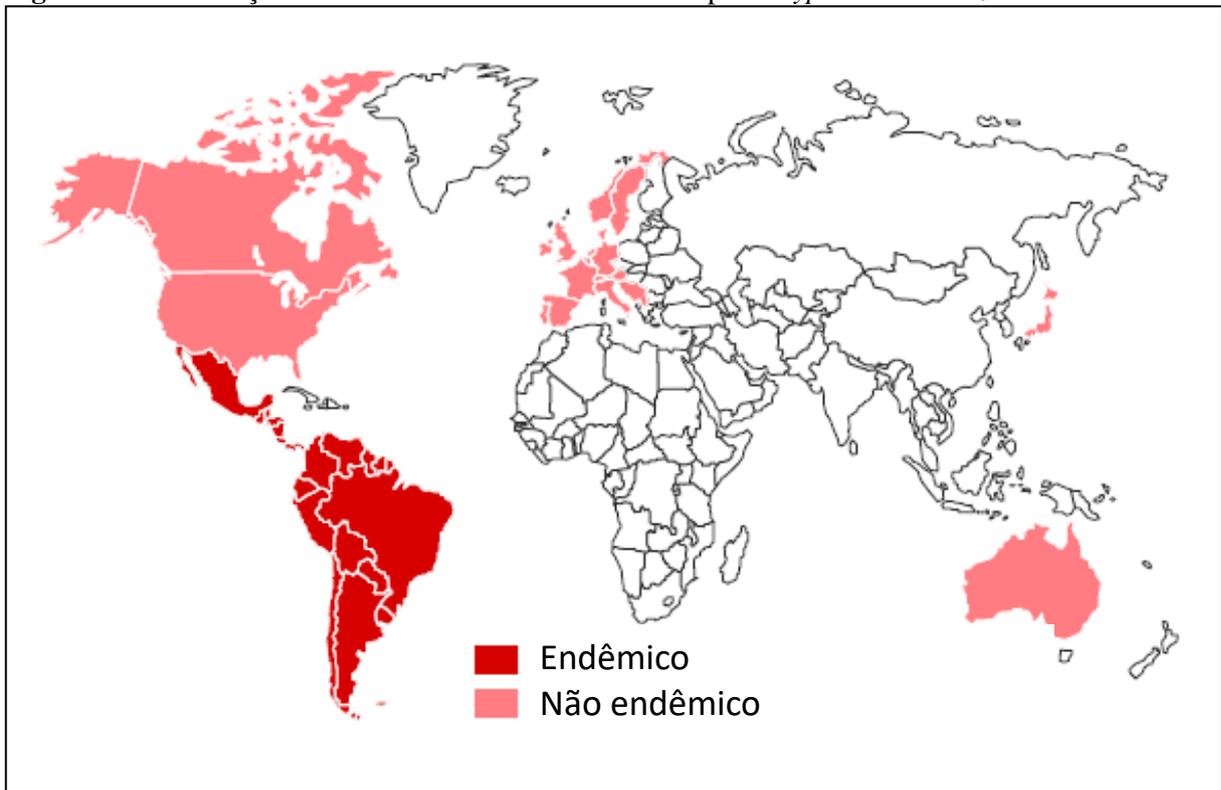
Aliando a necessidade de identificar novos agentes terapêuticos para a doença de Chagas e o potencial bioativo de plantas da Caatinga, o presente trabalho investigou a composição química e as atividades citotóxica, tripanocida e imunomoduladora *in vitro* dos óleos essenciais das plantas *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa* (sin. *Eplingiella fruticosa*), *Hyptis pectinata* (sin. *Mesosphaerum pectinatum*), *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*, oriundas do Parque Nacional do Vale do Catimbau (uma região de preservação da Caatinga), com a finalidade de encontrar terapias alternativas mais eficazes e menos tóxicas para a doença de Chagas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é endêmica em países tropicais e subtropicais da América Latina, afeta 7 milhões de pessoas em todo o mundo, causa 7.000 mortes anualmente e 25 milhões de pessoas estão em risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Inicialmente, a doença de Chagas era restrita às populações pobres das áreas rurais, todavia, os processos de urbanização fizeram com que a patologia se tornasse um problema médico e social também nas grandes cidades. Além disso, o número de casos nos Estados Unidos, Austrália, Europa e Japão, tidos como locais não endêmicos (Figura 1), tem aumentado principalmente devido à migração de indivíduos infectados de regiões endêmicas para estas áreas. Desta maneira, a doença vem emergindo como problema global de saúde pública com impacto econômico relevante (DIAS, 2013; SCHMUNIS, 2007).

Figura 1 – Distribuição mundial dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Drugs for Neglected Diseases initiative (2015).

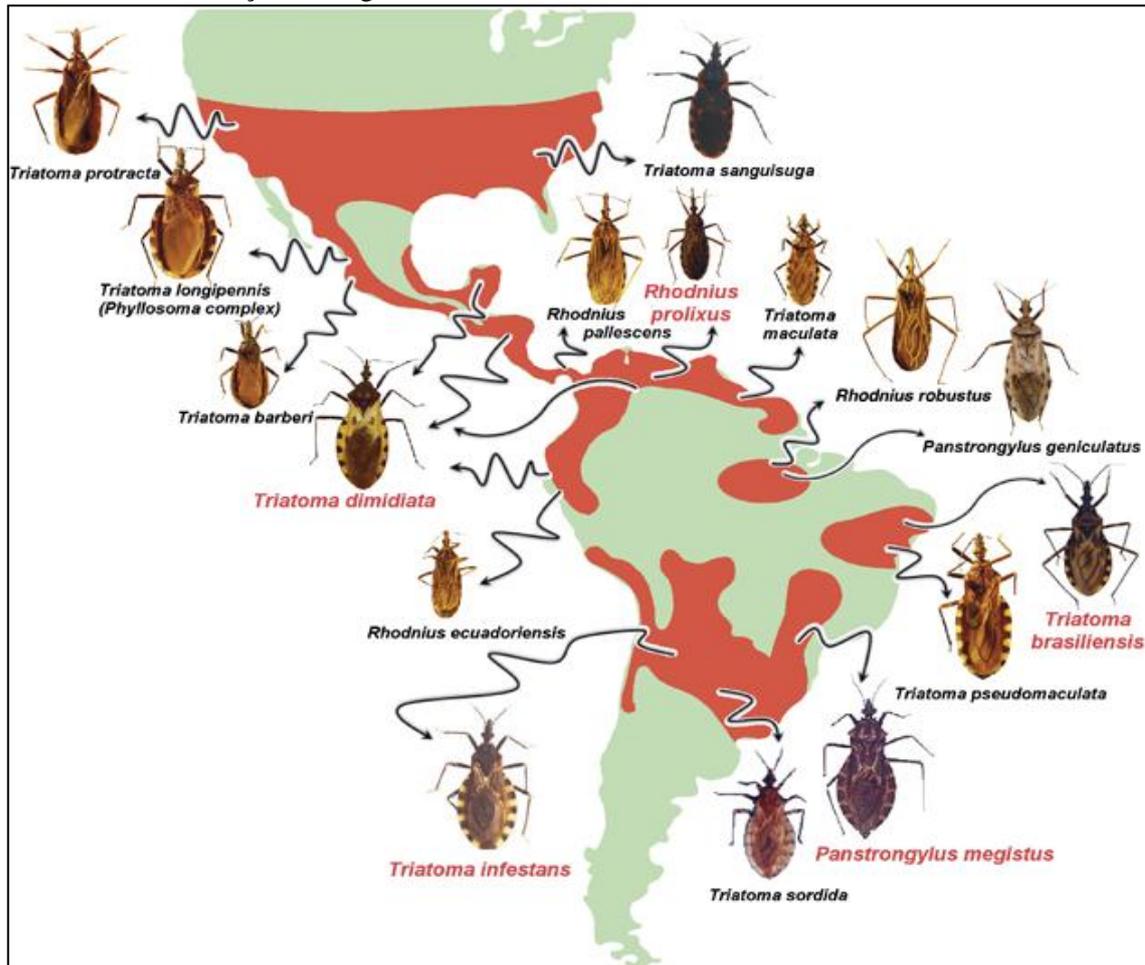
Nota: Endêmica em 21 países da América Latina, os casos em países não-endêmicos (por exemplo, Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos) vem aumentando devido a migração de latino-americanos infectados.

A transmissão da doença de Chagas ocorre geralmente pela via vetorial (70% dos casos em regiões com ausência de controle dos vetores). Neste tipo de transmissão, parasitas eliminados nas fezes e excretas de insetos triatomíneos, durante o repasto sanguíneo, podem penetrar na pele através de microlesões. A doença também pode ser transmitida ao homem por mecanismos não-vetoriais, como por transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e transmissão oral pelo consumo de alimentos ou bebidas contaminados. Existem ainda vias menos frequentes de infecção, tais como: acidentes de laboratório, ingestão de leite materno contaminado e transmissão sexual (COURA; DIAS, 2009; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Mais de 140 espécies de triatomíneos são consideradas potenciais vetores da DC, das quais 52 já foram descritas no Brasil. Cinco espécies têm grande importância epidemiológica no ambiente doméstico, sendo a mais importante *Triatoma infestans*, devido aos seus hábitos estritamente domésticos, alta capacidade de infestação e taxa de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012). Embora em 2006 o Brasil tenha sido certificado como livre da transmissão de *T. cruzi* pelo *Triatoma infestans*, nos países do cone Sul outras espécies tais como *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e *Triatoma dimidiata* se tornaram mais importantes na epidemiologia da DC, em decorrência da pressão antrópica sobre seus ecótopos naturais (SILVEIRA; DIAS, 2011).

No México e na América Central os principais vetores da DC são *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescans* e *Triatoma dimidiata*. Já nos países andinos o *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata*, *Triatoma venosa* e *Triatoma infestans* assumem papel importante na transmissão vetorial. Nos países do Cone Sul, dentre os quais o Brasil, espécies de triatomíneos responsáveis pela doença de Chagas são, em ordem de importância, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e *Triatoma dimidiata* (Figura 2). Embora existam triatomíneos nos EUA, apenas casos raros de doença de Chagas autóctone causado por estes vetores foram relatados (SÁNCHEZ-SANCHO; CAMPILLO; PÁEZ, 2010).

Figura 2 - Distribuição das espécies de triatomíneos de grande relevância epidemiológica da transmissão da doença de Chagas.



Fonte: Gourbière et al. (2012).

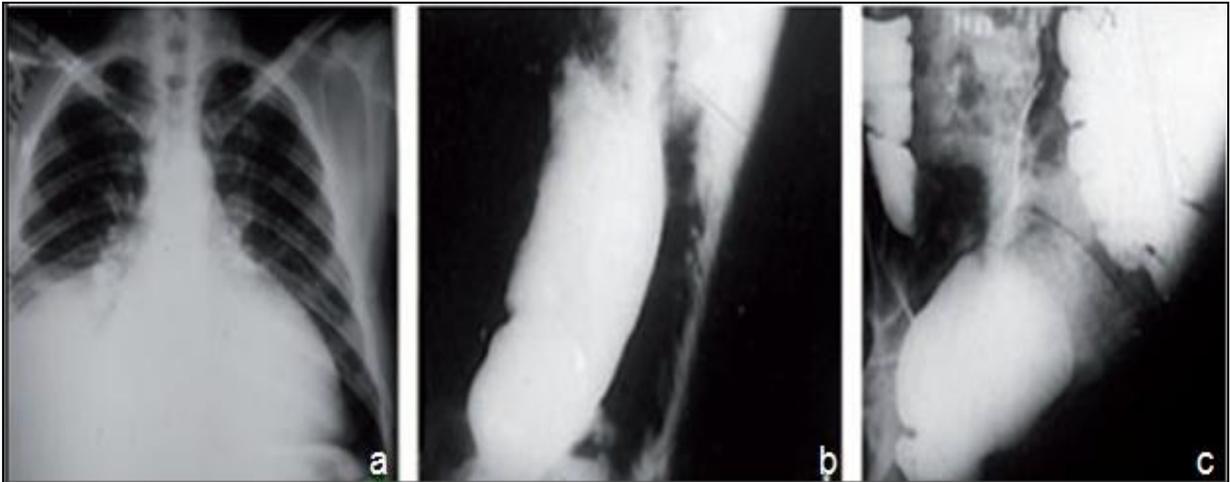
Nota: As áreas vermelhas indicam a distribuição geográfica de espécies aproximadas. As espécies destacadas em vermelho são consideradas os mais importantes vetores do *Trypanosoma cruzi*.

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases clínicas bastante distintas, a fase aguda e a fase crônica. Inicialmente o indivíduo apresenta uma fase aguda que surge 6-10 dias após a inoculação dos parasitas, com duração de cerca de 4-8 semanas. Na maioria dos casos, esta fase passa despercebida por apresentar sintomas clínicos pouco específicos tais como: febre, hepatoesplenomegalia ou linfadenopatia. Normalmente o local de infecção é caracterizado por edema inflamatório, também chamado de chagoma de inoculação, caso a porta de entrada do *T. cruzi* tenha sido a pele. Nos casos, nos quais a infecção ocorre na região dos olhos, este edema é chamado de sinal de Romana. Durante a fase aguda, as formas tripomastigotas circulantes podem ser facilmente encontradas no sangue de pacientes. Eventualmente, a doença evolui para a fase crônica, na qual a parasitemia é bastante reduzida e os pacientes tornam-se assintomáticos. A miocardite aguda e meningoencefalite aguda

podem ocorrer raramente em crianças de 1-5 anos e na maioria dos casos é fatal (FERNANDES; ANDREWS, 2012; STEVERDING, 2014).

A maioria dos pacientes permanece na fase indeterminada ou latente por toda a vida e não desenvolvem quaisquer sintomas crônicos evidentes. No entanto, 15-30% das pessoas infectadas evoluem para a fase crônica sintomática da doença, geralmente 10-25 anos após a infecção inicial, apresentando cardiomegalia (cardiopatia chagásica crônica) (Figura 3a) ou ainda apresentam acometimento do aparelho digestivo (megaesôfago e megacólon) (Figura 3.b e 3.c). O megaesôfago e o megacólon são condições debilitantes, porém o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é na maioria dos casos um problema de risco de vida (AYO et al., 2013; COURA; VIÑAS, 2010; STEVERDING, 2014).

Figura 3 – Radiografias demonstrando as manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas.



Fonte: Coura e Viñas (2010).

Legenda: a) cardiomegalia, b) megaesôfago e c) megacólon.

A CCC é caracterizada por hipertrofia cardíaca e dilatação, as quais causam arritmias graves e disfunção sistólica progressiva. Células miocárdicas destruídas em conjunto com infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos formam microabscessos que evoluem para fibrose. A doença dos mega-órgãos está associada à destruição do plexo mioentérico no trato gastrointestinal (BERMUDEZ et al., 2016).

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda é baseado na presença de sinais clínicos específicos associados aos métodos parasitológicos diretos, como por exemplo, o teste de gota espessa. Devido à baixa parasitemia, o diagnóstico parasitológico é pouco eficiente na fase crônica da doença. No entanto, outros métodos são utilizados nesta fase, dentre os quais, os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* do

isotipo imunoglobulina G (ELISA, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, quimiluminescência, e TESA-blot) e ensaios de biologia molecular baseados na amplificação de sequências específicas do DNA do parasita no sangue (PEREIRA; NAVARRO, 2013). Para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* é recomendado no mínimo dois métodos com princípios e antígenos diferentes (BARCAN et al., 2005).

Algumas hipóteses sobre as interações parasita-hospedeiro são consideradas para a patogênese da doença de Chagas crônica, sendo estas, a auto-imunidade por mimetismo molecular; disfunção autonômica; e dano tecidual pela persistência do parasita. A persistência do parasita no hospedeiro culmina em uma reatividade inflamatória crônica, além disso, a lise celular induzida pelo parasita (consequência da vigorosa movimentação dos tripomastigotas intracelulares) sustenta a manutenção do processo inflamatório. A reativação do *T. cruzi* em indivíduos co-infectados com HIV, transplantados ou pacientes chagásicos crônicos fornece evidências da persistência dos parasitas no hospedeiro (BONNEY; ENGMAN, 2015; TEIXEIRA et al., 2011).

Uma estratégia adaptativa usada pelo *T. cruzi* para otimizar sua persistência no hospedeiro mamífero, consiste em utilizar tecidos-alvos com características particulares. O tecido adiposo tem sido relatado como um reservatório no qual o parasita pode persistir em estado atenuado para evitar os mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro, na qualidade de um possível local de reativação da doença. Desta forma, os adipócitos podem abrigar um número significativo de parasitas, mesmo na fase crônica da infecção, atuando como reservatório a partir do qual pode ocorrer a reativação da infecção, especialmente durante períodos de imunossupressão (MORROT et al., 2016).

2.2 *Trypanosoma cruzi*: agente etiológico da doença de Chagas

O agente etiológico da doença de Chagas é o *T. cruzi* (Família Trypanosomatidae; Ordem Kinetoplastida), um protozoário hemoflagelado cujo ciclo de vida envolve obrigatoriamente hospedeiro vertebrado (mamíferos, incluindo humanos) e invertebrado (triatomíneo hematófago). A adaptação do *T. cruzi* aos diferentes microambientes de seus hospedeiros é acompanhada por uma extensa remodelação do metabolismo primário, expressão gênica, proteoma, morfologia celular e transporte intracelular. Com isto, o parasita pode se apresentar em três formas evolutivas morfologicamente distintas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (Figura 4). Estas formas são diferenciadas pela posição do

cinetoplasto (região da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial) em relação ao núcleo da célula e do local onde o flagelo emerge (COURA; CASTRO, 2002; MARTINS et al., 2012).

Figura 4 – Formas evolutivas do agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Bastien (1998).

Legenda: a) tripomastigota, b) epimastigota e c) amastigota.

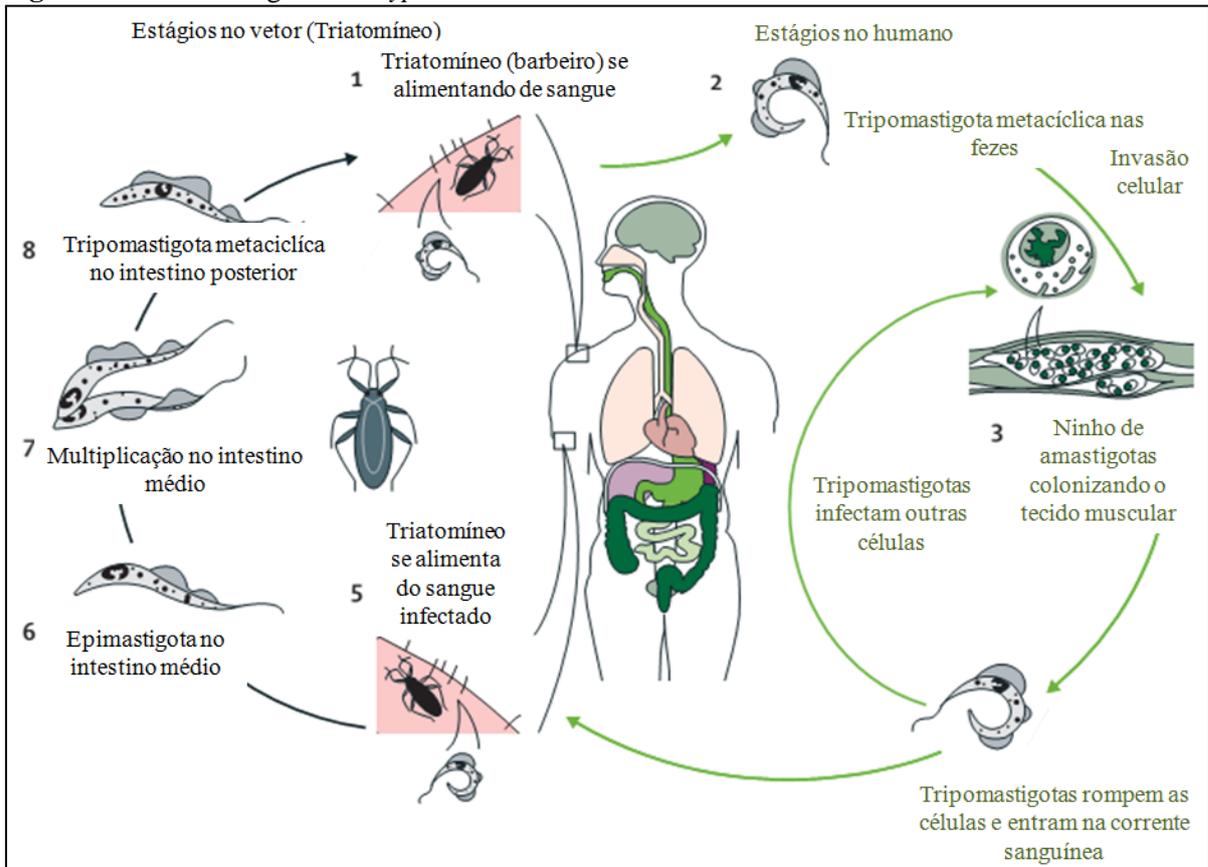
Na forma tripomastigota, o cinetoplasto é localizado na extremidade posterior do parasita e, por conseguinte, do núcleo; e o flagelo emerge da bolsa flagelar localizada próxima ao cinetoplasto. Essa forma não possui capacidade de replicação, corresponde à forma infectante extracelular e está presente em ambos os hospedeiros, sendo chamada de metacíclica no hospedeiro invertebrado e de sanguínea no vertebrado (DE SOUZA et al., 2010; MANDAL, 2014; MARTINS et al., 2012).

Nas epimastigotas por sua vez, tanto o cinetoplasto quanto a bolsa flagelar são anteriores ao núcleo. Esta forma evolutiva é móvel, replicativa e encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (DE SOUZA et al., 2010; MANDAL, 2014; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007).

As amastigotas são as formas intracelulares encontradas em diversas células nucleadas do hospedeiro vertebrado, possuem corpo arredondado e flagelo pequeno que não emerge da bolsa flagelar. Estas se multiplicam por divisão binária longitudinal a cada 12 horas e se transformam em tripomastigotas sanguíneas após um período de 11 a 13 horas antes da ruptura da célula hospedeira (DE SOUZA et al., 2010; MANDAL, 2014; MARTINS et al., 2012; TYLER; ENGMAN, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 5) envolve os três estágios evolutivos (epi-, tripomastigota) e dois tipos de hospedeiros (vertebrados e invertebrados). O ciclo pode ter início quando o vetor triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado. As tripomastigotas se transformam em epimastigotas, as quais se replicam no intestino do hospedeiro invertebrado. As epimastigotas migram para o intestino posterior e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes, que são eliminadas juntamente com as excretas do inseto. Eventualmente durante o repasto sanguíneo, estas formas podem entrar na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através de microlesões na pele e invadir células nucleadas. No citoplasma das células do hospedeiro, tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas intracelulares, as quais se replicam com um tempo de duplicação de aproximadamente 12 horas ao longo de um período de 4 a 5 dias. No final deste período, as amastigotas se transformam em tripomastigotas, a célula hospedeira se rompe e as tripomastigotas são liberadas para a circulação sanguínea. Ocasionalmente as células podem sofrer ruptura precoce liberando amastigotas que também possuem a capacidade de infectar. Os parasitos circulantes podem invadir novas células e iniciar novos ciclos, e estão disponíveis para infectar vetores que possam se alimentar deste hospedeiro infectado. Na ausência de tratamento bem sucedido com drogas tripanocidas, a infecção pode durar por toda a vida do hospedeiro humano (BERN et al., 2011; MANDAL, 2014).

Figura 5 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Blum et al. (2008).

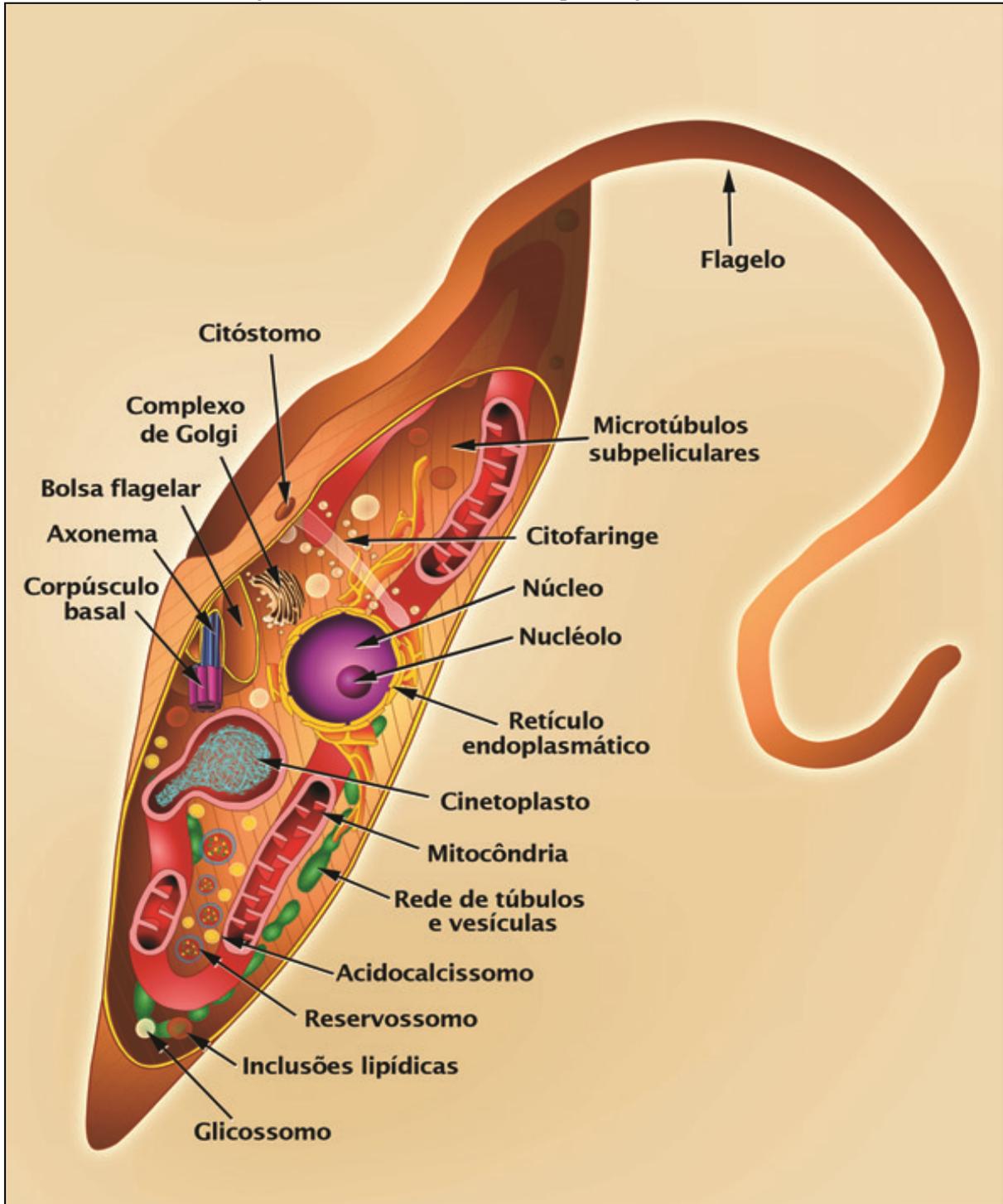
Legenda: (1) Durante o repasto sanguíneo, o inseto triatomíneo infectado libera tripomastigotas metacíclicas através das fezes. (2) As tripomastigotas metacíclicas infectam células no local da picada. No interior das células hospedeiras, as tripomastigotas se transformam em amastigotas. (3) As amastigotas se multiplicam e se transformam em tripomastigotas sanguíneas, as quais rompem as células hospedeiras. As tripomastigotas podem infectar outras células e se transformar em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção (4) ou podem ganhar a corrente sanguínea. (5) O triatomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro infectado e as tripomastigotas sanguíneas são ingeridas. (6) As tripomastigotas se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto. (7) As epimastigotas se multiplicam no intestino médio e são transformadas em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior. (8) As tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas excretas durante novo repasto sanguíneo.

2.2.1 Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

A membrana plasmática do *T. cruzi* recobre o corpo celular, invagina na extremidade anterior da célula na região da bolsa flagelar e continua ao longo do flagelo. Abaixo da membrana plasmática, exceto na região da bolsa flagelar, existe uma camada de microtúbulos, conhecidos como microtúbulos subpeliculares, os quais estão em contato uns com os outros, com a membrana plasmática e com perfis de retículo endoplasmático. O núcleo do protozoário tem localização central e os ribossomos e perfis de retículo endoplasmático estão distribuídos aleatoriamente no citoplasma, entretanto o complexo de Golgi está localizado na

região anterior, próximo da bolsa flagelar (Figura 6) (DE SOUZA, 1999; DE SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2003).

Figura 6 - Estruturas e organelas encontradas na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Teixeira et al. (2013).

A membrana plasmática do *T. cruzi* é composta por proteínas integrais e periféricas, fosfolípidos e glicocálice. Este último componente desempenha papel importante na

interação do parasita com a célula hospedeira (MARTINS et al., 2012). A superfície de *T. cruzi* é composta por mucinas, trans-sialidases, moléculas tipo trans-sialidases, polissacarídeos, lipídios ancorados na camada fosfolipídica externa por glicosilfosfatidilinositol e proteínas integrais de membrana. Algumas destas moléculas possuem papel crucial na invasão de células de mamífero e na modulação da resposta imune frente à infecção (VILLALTA et al., 2008).

Como parte da adaptação evolutiva, os tripanossomatídeos desenvolveram organelas celulares e estruturas anatômicas especializadas. Uma das características dos tripanossomatídeos é a presença de um único flagelo que emerge através da bolsa flagelar (BF) e que confere motilidade ao protozoário. A BF representa um sítio ativo e estratégico para o parasita, participando em diversos processos, tais como polaridade celular, morfogênese e replicação. Além disto, a BF constitui a única superfície no corpo do parasita com ausência da camada de microtúbulos subpeliculares, o que favorece o transporte de vesículas, intercâmbio e tráfego de moléculas associadas aos eventos de endocitose e exocitose que ocorrem nesta região (COLINA, 2003; DURANTE et al., 2015).

Os flagelos de tripanossomatídeos apresentam estrutura paraflagelar filamentosa semelhante ao axonema de células de mamífero. Mudanças de conformação dos microtúbulos axonemais, estruturas associadas e a estrutura paraflagelar são necessárias para o flagelo executar todas as funções com as quais está envolvido. Além disso, o flagelo desempenha papéis cruciais na morfogênese do *T. cruzi*: a ligação ao epitélio do inseto hospedeiro, a segregação do DNA mitocondrial e a divisão celular (BALLESTEROS-RODEA et al., 2012; ROCHA et al., 2010).

As formas epimastigotas realizam intensa atividade endocítica de macromoléculas a partir do meio extracelular, no entanto, neste estágio evolutivo, o principal sítio de endocitose não é a bolsa flagelar, e sim um complexo chamado de citóstoma-citofaringe. Tal complexo consiste de uma invaginação profunda da membrana plasmática, na qual a abertura na superfície da célula é denominada “citóstoma” já o longo tubo que forma a invaginação é chamado de “citofaringe”. Não existe uma delimitação definida entre o citóstoma e a citofaringe. Esta estrutura também é presente em amastigotas, embora sua capacidade endocítica raramente seja demonstrada. Apesar de desempenhar importante função no processo de endocitose, pouco se sabe sobre sua organização estrutural (ALCANTARA et al., 2014; OKUDA et al., 1999).

Outras organelas do *T. cruzi* são: cinetoplasto (corresponde a uma condensação de DNA mitocondrial que se encontra dentro de uma única e ramificada mitocôndria);

acidocalcisomas (organelas ácidas e ricas em fósforo e cálcio); reservossomos (organelas do tipo lisossomos) e os glicosomos (organelas do tipo peroxissomos) (DE SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2003; FERELLA et al., 2008).

As mitocôndrias são organelas que estão envolvidas na síntese do ATP através da fosforilação oxidativa aeróbica e também no equilíbrio redox celular, representando uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula (GONÇALVES et al., 2011). A principal diferença morfológica entre a mitocôndria de eucariontes superiores e a dos tripanossomatídeos é a quantidade e o volume da organela. Nos tripanossomatídeos a mitocôndria é única, ramificada e alongada, fica próxima aos microtúbulos subpeliculares e circunda toda a célula (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

O DNA do cinetoplasto (k-DNA) é localizado dentro da matriz mitocondrial e perpendicular ao eixo do flagelo. A estrutura fina do cinetoplasto, conforme revelado por análise de microscopia eletrônica, mostra que as cadeias de DNA são alinhadas paralelamente ao eixo e que o arranjo do k-DNA dentro do cinetoplasto varia entre as espécies. O k-DNA representa cerca de 30% do DNA celular total e difere do DNA nuclear na densidade, na relação de pares de base e no grau de renaturação. Além disso, o k-DNA de tripanossomatídeos é composto por moléculas circulares que são topologicamente relaxadas e interligadas para formar uma rede única. Dois tipos de arranjos de DNA estão presentes no cinetoplasto, os minicírculos e os maxicírculos. Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, além disto, codificam rRNAs e subunidades do complexo respiratório. Os minicírculos codificam RNAs guia que modificam a transcrição dos maxicírculos por extensa inserção ou exclusão de uridilato através de edição de RNA (DE SOUZA et al., 2009). O aspecto ultraestrutural do cinetoplasto em tripomastigotas de *T. cruzi* é arredondado, diferindo de todos os outros estágios de desenvolvimento, os quais apresentam um formato de barra em cortes ultrafinos (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

Em *T. cruzi*, tal como em outros organismos pertencentes ao subtipo protista Kinetoplastida, a maior parte da via glicolítica está compartimentada em glicossomos. Os glicossomos, uma forma especializada de peroxissomas, são microcorpos esféricos de 0,1-0,3 µm com matriz eletrodensa. Os glicossomos também estão envolvidos nas vias biossintéticas de pirimidinas; oxidação de ácidos graxos e esteróides; e via de salvação de purinas. Esta organela, circundada por uma única membrana formada por proteínas funcionais, é responsável por (1) realizar as trocas de metabolitos entre a matriz glicosomal e o citoplasma

e (2) importar metabolitos (glicose, fosfato e fosfoenolpiruvato) do citoplasma para a matriz glicossomal (GONZÁLEZ-MARCANO et al., 2016; QUIÑONES et al., 2004).

Descritos inicialmente em tripanosomatídeos, os acidocalcisomas são organelas ácidas de armazenamento de cálcio encontradas em vários organismos. Os grânulos densos de procariotos e plaquetas humanas também têm características semelhantes aos acidocalcisomas. Os acidocalcisomas de *T. cruzi* são arredondados, ácidos, ricos em Ca^{+2} , pirofosfato (PPi) e polifosfato (NIYOGI et al., 2015). De acordo com Docampo e Moreno (1999) os acidocalcisomas estão relacionados a diversos processos biológicos, sendo estes: (1) armazenamento de Ca^{+2} para ser usado em determinados momentos do ciclo de vida do parasita; (2) armazenamento de energia, a partir do estoque em grande quantidade de PPi inorgânico; (3) regulação do pH citoplasmático devido a presença de uma H^{+} -ATPase na membrana do acidocalcisoma; (d) e também pode desempenhar papel no controle da osmoregulação.

Os tripanosomatídeos encontram mudanças radicais nos ambientes osmóticos após passagem de um hospedeiro invertebrado para vertebrado ou vice-versa. Desta forma, presume-se que os mecanismos de regulação osmótica desempenham um papel essencial na sobrevivência do parasita durante esta transição. Tem sido demonstrado que a liberação celular de íons e osmólitos, incluindo aminoácidos e potássio, ocorrem para permitir que as tripomastigotas metacíclicas ajustem seu volume após a tensão induzida durante a transição hipo-osmótica. No entanto, este mecanismo é incapaz de explicar a recuperação total do volume celular. A principal hipótese é de que acidocalcisomas em conjunto com o complexo vacúolo contrátil sejam responsáveis por este processo osmorregulatório em *T. cruzi* (MORENO; DOCAMPO, 2009).

T. cruzi não sintetiza colesterol, no entanto, as epimastigotas adquirem colesterol por captação de LDL da dieta do inseto hematófago pelo citostoma-citofaringe e pela bolsa flagelar. As vesículas endocíticas se fundem com os endossomos iniciais formando o reservossomo. Os reservossomos são organelas relacionadas aos lisossomos, responsáveis pela digestão celular do material endocitado e por fornecer substratos para as demandas metabólicas celulares e da metaciclogênese (PEREIRA et al., 2011). Os reservossomos foram descritos como organelas exclusivas de formas epimastigotas de *T. cruzi* e de espécies de *Trypanosoma* de morcegos. Estas organelas são caracterizadas como compartimentos pré-lisossomais ácidos, morfologicamente arredondados (400-600 nm), ricos em cruzipaina (cisteíno-proteinase), contendo gotas lipídicas e proteínas no seu interior. A análise bioquímica preliminar de reservossomos isolados revelou colesterol (ésteres de colesterol) e

ergosterol como os principais lípidos neutros nestas organelas (PEREIRA et al., 2011). Foi demonstrado na literatura que durante o processo de diferenciação de epimastigota para tripomastigota, as inclusões lipídicas e proteicas dos reservosomos são consumidas levando a alterações significativas na morfologia e no volume relativo do reservosomo até o seu desaparecimento nas formas tripomastigotas (FIGUEIREDO et al., 2004). Tais observações sugerem que os reservosomos são essenciais para o armazenamento de nutrientes necessários para o passo de diferenciação celular (SOARES, 1999; VIEIRA et al., 2005). A análise proteômica dos reservosomos isolados e de suas membranas confirmou a presença de proteases e enzimas associadas ao metabolismo lipídico, bem como membros da família transportadora ABC e um homólogo de Rab 18 de mamífero, que estão envolvidos no transporte de lipídeos (PEREIRA et al., 2011).

2.2.2 Mecanismos de morte celular programada em *Trypanosoma cruzi*

A morte celular programada (MCP) é um importante mecanismo na homeostase de organismos multicelulares, desempenhando o papel fundamental na morfogênese, fisiologia e defesa do hospedeiro contra patógenos. Embora que por um longo período, a MCP estava limitada a organismos multicelulares, características semelhantes às descritas nos processos de apoptose de células multicelulares foram descritas em uma variedade de organismos eucariotos unicelulares, incluindo membros da família Kinetoplastida. Dentre essas características incluem a condensação da cromatina nuclear, fragmentação do DNA, perda do potencial de membrana mitocondrial e exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática. No entanto, as informações sobre as vias e moléculas envolvidas nos processos de MCP em Kinetoplastida são limitadas. Além disto, o *Trypanosoma cruzi* foi o primeiro organismo unicelular no qual a MCP foi descrita (IRIGOÍN et al., 2009).

Foi enunciado que a MCP do parasita tem papel importante no controle, proliferação e diferenciação celular, sendo um evento crucial para a manutenção e disseminação da infecção durante o ciclo de vida do parasita. Em adição, a MCP neste microrganismo pode funcionar para evadir a resposta imune do hospedeiro através de uma ativação alternativa mediada por macrófagos, que atua inibindo a inflamação e conseqüentemente aumentando a proliferação do parasita no hospedeiro vertebrado. De forma interessante, *Trypanosoma cruzi* tipo-apoptótico foi encontrado em tecidos de mamíferos após a infecção *in vivo*. Além disto, a ausência de genes que codificam caspases e homólogos da família de proteínas Bcl-2 de mamífero deixa evidente que a via de MCP de Kinetoplastidas difere dos processos de

apoptose típicos de mamífero, tornando-a um alvo promissor para quimioterapia (PIACENZA et al., 2007).

MCP está bem caracterizado em eucariotas superiores, incluindo apoptose, autofagia e necrose. A apoptose (ou tipo de MCP I) é um processo regulado de auto-morte, envolvido em várias patologias. Dentre as principais características encontradas em células de mamífero em processo de apoptose, pode-se mencionar a clivagem proteolítica por caspases, encolhimento celular, fragmentação inter-nucleosomal de DNA, exposição da fosfatidilserina, bolhas na membrana plasmática, formação de corpos apoptóticos e perda de potencial de membrana mitocondrial com liberação de citocromo c ao citosol (MENNA-BARRETO et al., 2009). Devido à ausência de caspases - principais efetores moleculares dos processos de apoptose - no genoma de *T. cruzi* (como nos demais protozoários, bem como fungos e plantas), foi inferido que as metacaspases são os potenciais ortólogos funcionais das caspases. Embora ainda existam controvérsias, evidências sugerem que metacaspases modulam a morte celular em tripanossomatídeos (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012).

A autofagia (ou MCP tipo II) é um processo fisiológico bastante conhecido que está envolvido na renovação protéica, destruição de organelas e reciclagem de materiais durante os períodos de escassez de nutrientes. Tal mecanismo é evolutivamente conservado e tem sido documentado em diversos organismos, incluindo Kinetoplastidas. Nos protozoários, a via autofágica é mais simples do que a descrita em outros tipos celulares, embora possuam todas as proteínas essenciais para realizar esse processo (JIMENEZ et al., 2008).

Originalmente necrose (ou MCP tipo III) significa morte acidental de células e tecidos. Este tipo MCP é caracterizado por alterações drásticas em mitocôndrias, incluindo a despolarização da membrana mitocondrial, a depleção de ATP, a geração de espécies reativas de oxigênio, a perda de homeostase do cálcio, a vacuolização citoplasmática e a degradação da membrana plasmática. Diferente da apoptose, o processo de reciclagem das células mortas pelo processo de necrose é lento, pois os sinais celulares específicos são ausentes, levando a uma importante resposta inflamatória (MENNA-BARRETO et al., 2009).

2.3 Resposta imune da doença de Chagas

O sucesso da infecção pelo *T. cruzi* depende de estratégias elaboradas pelo parasita ao longo da sua evolução, em invadir células hospedeiras e subverter a resposta imune do hospedeiro, facilitando a sua proliferação e sobrevivência no interior destas células. Neste sentido, diversas moléculas de superfície do parasita estão relacionadas à invasão da célula

hospedeira e aos processos de imunomodulação da resposta do hospedeiro. O processo de invasão celular e evasão do sistema imune de *T. cruzi* é bastante complexo e dinâmico e envolve a interação de fatores tanto do parasita quanto do hospedeiro (WALKER et al., 2014). Por exemplo, *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos são capazes de secretar vesículas extracelulares (VE) contendo proteínas associadas com a imunomodulação e virulência, as quais induzem a modulação da produção de citocinas envolvidas na resposta ao parasita. Interessantemente, além de secretarem VE diretamente, o *T. cruzi* também é capaz de induzir a liberação destas vesículas pela célula hospedeira infectada, permitindo a comunicação entre parasitas distantes e facilitando a dispersão de fatores de virulência em um complexo sistema de comunicação intercelular (BORGES et al., 2016; COAKLEY et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2015).

T. cruzi é um exemplo inequívoco da adaptação entre organismos eucariotos inferiores e mamíferos. Este parasita é capaz de invadir quase todas as células nucleadas, fagocíticas (principalmente macrófagos e células dendríticas) e não-fagocíticas em processos ainda pouco elucidados (ROMANO et al., 2013). Este processo de invasão se dá em duas etapas: 1) Adesão à membrana do hospedeiro e 2) interiorização através mecanismos fagocíticos e não fagocíticos que culminam na formação do vacúolo parasitóforo (TcVP). Um grande número de moléculas está envolvido na ligação de *T. cruzi* à célula hospedeira. Estas moléculas estão presentes no glicocálice e compreendem mucinas, trans-sialidases e gp63 proteases, as quais interagem com receptores na célula hospedeira disparando uma série de eventos intracelulares necessários para interiorização do parasita (DE SOUZA et al., 2010; ROMANO et al., 2013).

Dois mecanismos principais de entrada de formas tripomastigotas em células de mamífero têm sido descritos. O primeiro envolve a ativação de uma cascata de sinalização de cálcio e o recrutamento de lisosomos para o sítio de entrada do parasita, onde ocorre a sua fusão com o TcVP em formação. A ativa movimentação das formas tripomastigotas parece desempenhar um papel importante neste processo, uma vez que este movimento causa danos à membrana da célula hospedeira disparando um mecanismo de reparo da membrana mediado pela fusão e exocitose dos lisosomos (FERNANDES; ANDREWS, 2012). Neste sentido, tem sido postulado que o parasita se aproveita deste mecanismo de reparo das células do hospedeiro para ganhar acesso ao ambiente intracelular (ROMANO et al., 2012).

Um segundo mecanismo independente do recrutamento dos lisosomos tem sido proposto. Através deste mecanismo, a internalização de tripomastigotas de *T. cruzi* ocorre por invaginação da membrana plasmática independente de actina e dependente de uma PI-Kinase classe I (SIBLEY, 2011). Adicionalmente, estudos demonstraram parasitas no interior de

compartimentos contendo LC3, um marcador de autofagossoma, levantando a hipótese de que estas estruturas também contribuem como doadoras de membrana para formação do TcVP (ROMANO et al., 2012).

Independente do mecanismo de entrada, a acidificação lisossomal ativa o mecanismo chave que permite ao parasita escapar do TcVP para o citoplasma, e, por conseguinte se diferenciar na forma amastigota replicativa (CARDOSO et al., 2016).

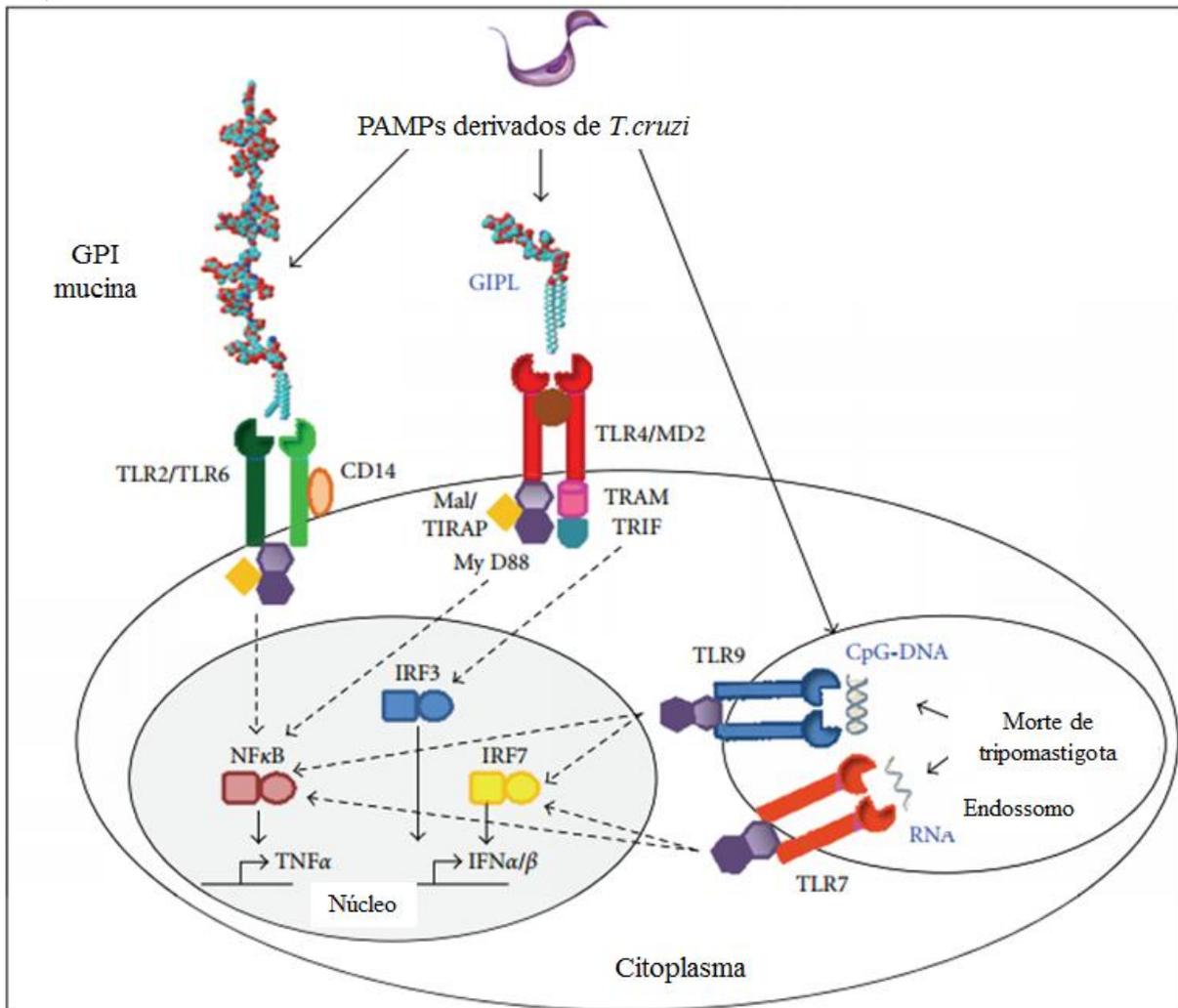
Uma vez no interior do hospedeiro invertebrado o *T. cruzi* enfrenta um sofisticado sistema imune envolvendo células circulantes e moléculas especializadas na defesa contra microrganismos invasores (MACHADO et al., 2012). Desta forma, o sucesso do parasita em estabelecer a infecção no hospedeiro dependerá de um arsenal de estratégias de evasão associadas com alternância da forma infectiva extracelular para a forma amastigota proliferativa intracelular, acompanhada por mudanças adaptativas na expressão gênica (CARDOSO et al., 2015).

O controle do *T. cruzi* e a sobrevivência no hospedeiro dependem tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adquirida, as quais são disparadas durante os primeiros estágios da infecção. Estas respostas envolvem células como macrófagos, células dendríticas, células NK (natural killers), linfócitos T e B, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, tais como IFN- γ , TNF- α , e IL-12 (MACHADO et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que macrófagos, células dendríticas e células NK desempenham papel crucial no controle do *T. cruzi* por disparar intensa resposta inflamatória acompanhada do aumento na produção de citocinas e quimiocinas (MACHADO et al., 2012). Para isso, estas células precisam reconhecer o parasita através da interação de receptores presentes na sua superfície com padrões moleculares (PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns) presentes na membrana deste patógeno. Dentre os receptores que reconhecem os PAMPs, os Receptores do tipo Toll (TLRs - Toll-Like Receptors) são expressos em diferentes populações de células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T e até mesmo em células não pertencentes ao sistema imune, tais como fibroblastos, células do parênquima e células epiteliais. Componentes derivados de *T. cruzi* são reconhecidos por TLR2, TLR6, TLR7 e TLR9 (Figura 7), que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e efetores microbicidas. Os antígenos do parasita e as citocinas produzidas localmente agem em conjunto para promover o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora, que leva ao controle do parasita. Além disso, a sinalização de TLR2 também tem propriedades imunoreguladoras essenciais para impedir a resposta imune induzida pelo parasita (RODRIGUES et al., 2012). Esses receptores

transmitem sinais ao citoplasma desencadeando o recrutamento de moléculas adaptadoras como a proteína MyD88 e subsequentemente induzem o fator nuclear de transcrição NF κ B, levando a produção das citocinas pró-inflamatórias (EGAN et al., 2009).

Figura 7 - Resposta imune inata dependente dos receptores do tipo toll na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Rodrigues et al. (2012).

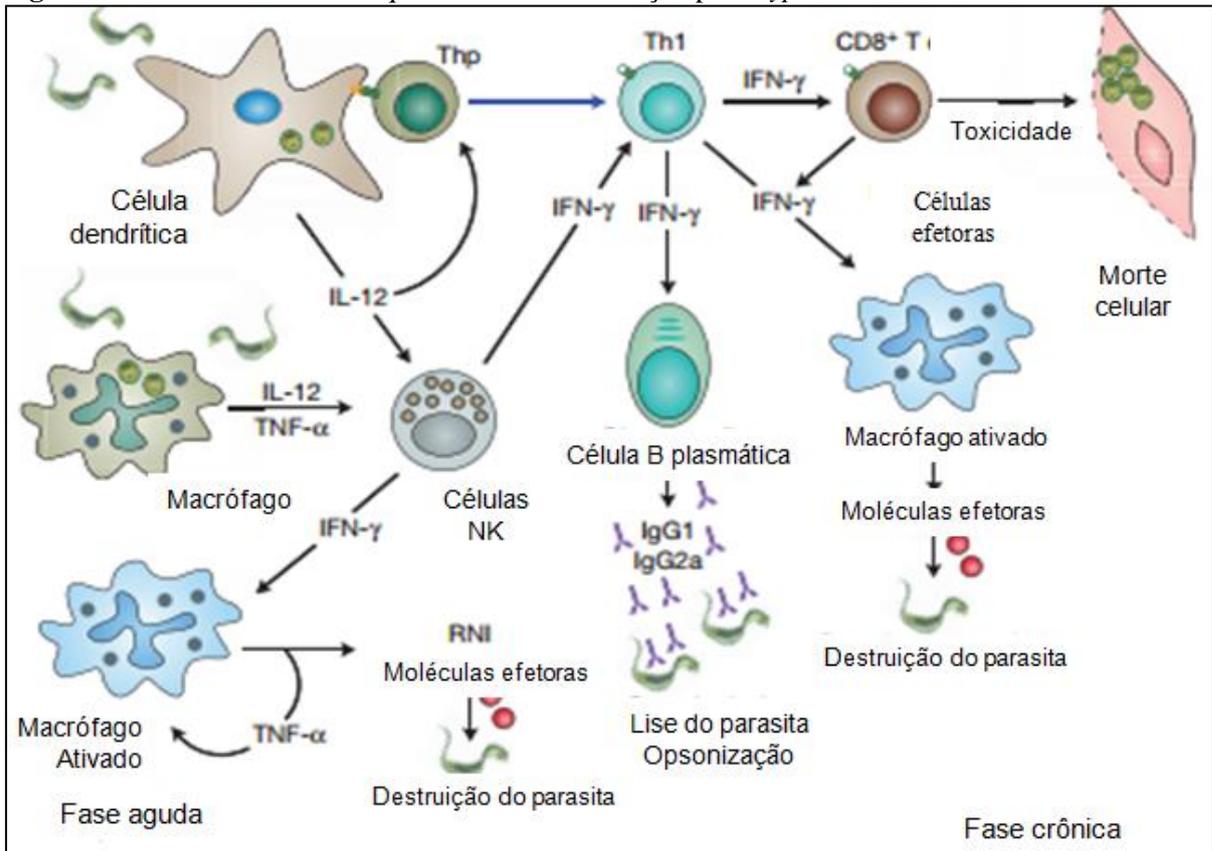
Nota: Os PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos) derivados de *T. cruzi* são reconhecidos por diferentes TLRs (receptores do tipo Toll). O reconhecimento de moléculas de *T. cruzi*, como glicoconjugados de superfície do parasita e seus ácidos nucleicos, ocorre através de distintos TLRs expressos por células da resposta imune inata. A GPI mucina (glicofosfatidilinositol ancorada a mucina) ativa o TLR2 / TLR6, o GIPL (glicoinositolfosfolípido) é um agonista para TLR4, o DNA genômico ativa TLR9 endossomal e TLR7 está envolvido no reconhecimento do RNA do parasita. Os TLRs induzem a ativação de NF- κ B (fator nuclear) e/ou IRFs (fator regulatório de interferon). As proteínas adaptadoras MyD88 e Mal/TIRAP são necessários para a ativação de TLR2 e TLR4 pelo NF- κ B. Já as proteínas adaptadoras TRIF e TRAM ativam IRF3. TLR7 e TLR9 ativam NF- κ B e IRF7 via MyD88. A ativação de NF- κ B leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e os IRFs ativam a transcrição do gene IFN de tipo I.

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, os macrófagos ativados produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) por um processo chamado de "burst" oxidativo, que atua como primeira

linha de defesa contra patógenos. Após a detecção de agentes infecciosos, a NADPH-oxidase (gp91phox ou NOX2) da célula hospedeira é ativada para produzir radicais superóxidos dentro do fagossoma. Em contrapartida, o parasita possui uma maquinaria antioxidante altamente eficaz para regular o "burst" oxidativo através de vias de desintoxicação das EROs, as quais estão localizadas em diferentes compartimentos do parasita ricos NADPH-redutases. Apesar do sistema antioxidante eficaz, macromoléculas do parasita sofrem danos oxidativos que se tornam prejudiciais quando não reparados. No entanto, baixas concentrações de EROs atuam contribuindo para a replicação *in vitro* de amastigotas no interior de células hospedeiras e aumenta os níveis de parasitemia *in vivo*. Desta forma, a rede antioxidante do *T. cruzi* desempenha um papel importante na virulência do parasita e no sucesso da infecção (GOES et al., 2016).

A resposta imune frente à infecção por *T. cruzi* envolve células efetoras e reguladoras. Geralmente a resposta imune inata mediada por macrófagos e células dendríticas (CDs) é responsável pela detecção e destruição do parasita; apresentação de antígeno; e produção de citocinas pró-inflamatórias. Após a ativação, as CDs migram para os órgãos linfóides secundários, apresentam antígenos e ativam células T para produzirem citocinas (IL-12, IL-10, TNF- α e IL-6). Estes eventos culminam na ativação e diferenciação dos linfócitos T específicos. Durante a interação das CDs com linfócitos T, os complexos maiores de histocompatibilidade I e II (CMH I e CMHII) interagem com o receptor de células T (RCT) e moléculas co-estimulatórias, proporcionando sinais moleculares que são necessários para a proliferação e diferenciação celular. IFN- γ produzido por células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativa os mecanismos efetores em macrófagos para destruir as formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas. Por outro lado, a atividade citotóxica mediada por células T CD8⁺ destrói células com amastigotas intracelulares. Os anticorpos produzidos pelas células B lisam a forma tripomastigota e facilitam a fagocitose de parasitas opsonizados com IgG (Figura 8) (AOKI et al., 2012; JUNQUEIRO et al., 2010; NASCENTES et al., 2016).

Figura 8 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Junqueiro et al. (2010).

Nota: Na fase inicial da invasão pelo *T. cruzi*, a imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção: atuando como primeira barreira, as células do sistema imune inato produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e moléculas efetoras [intermediários reativos de nitrogênio (RNI)] que controlam a replicação parasitária. Ao mesmo tempo, as células imunes inatas formam uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo IL-12 para a diferenciação e expansão clonal de células T e B. O IFN- γ ativa mecanismos efetores em macrófagos para destruir amastigotas e tripomastigotas. Anticorpos produzidos por células B lisam a forma tripomastigota extracelular ou facilitam a fagocitose de parasitas opsonizados com IgG. Abreviaturas: IFN, interferon; IL, interleucina; NK, natural killer; Thp, célula precursora de linfócitos T; TNF, factor de necrose tumoral.

Após a interação com o parasita, os macrófagos produzem IL-12 e TNF- α , os quais ativam a produção de IFN- γ por células NKs. O IFN- γ em conjunto com o TNF- α , estimulam os macrófagos na produção de EROs para auxiliar na eliminação das formas intracelulares de *T. cruzi* (MAGALHÃES et al., 2015). Para conter os danos teciduais causados pela resposta pró-inflamatória exacerbada desencadeada pelo *T. cruzi*, esta é regulada por respostas anti-inflamatórias mediadas pela IL-10 e o TGF- β . Ambas as citocinas desempenham importantes funções na regulação da resposta imune do hospedeiro infectado com *T. cruzi* e na promoção da persistência do parasita. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que possui atividade imunossupressora através da regulação negativa da produção de IFN- γ e da ativação de macrófagos *in vitro*. Tal regulação é essencial para evitar uma resposta tóxica sistêmica

durante a infecção pelo *T. cruzi* (DOS REIS, 2011). Já o TGF- β regula uma variedade de respostas celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose. A disfunção na regulação do TGF- β está associada com diversas doenças humanas, incluindo a doença de Chagas. A cruzipaina (a principal cisteíno-protease de *T. cruzi*) ativa diretamente o TGF- β reforçando o papel desta citocina como um alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas. TGF- β participa de processos que influenciam o desenvolvimento de cardiomiopatia que ocorre na doença de Chagas, incluindo: (a) o processo de invasão das tripomastigotas na célula hospedeira; (b) proliferação, diferenciação em tripomastigotas e morte por apoptose das amastigotas dentro das células hospedeiras; (c) regulação da inflamação e respostas imunes; e (d) aparecimento de fibrose e remodelação cardíaca em fases agudas e crônicas da doença (ARAÚJO-JORGE et al., 2012).

A IL-17A é uma citocina que atua no desenvolvimento da inflamação e defesa do hospedeiro contra infecções, por sua capacidade em induzir a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Na doença de Chagas, a IL-17A controla os níveis de parasitemia e modula a produção de IFN- γ e TNF- α , desta forma atua na redução dos danos nas células do hospedeiro. Os níveis de IL-17A estão diretamente relacionados com a infecção e o envolvimento cardíaco, sendo menor em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica do que em pacientes com a forma indeterminada da doença (ALBAREDA et al., 2015; LEON RODRIGUEZ et al., 2015).

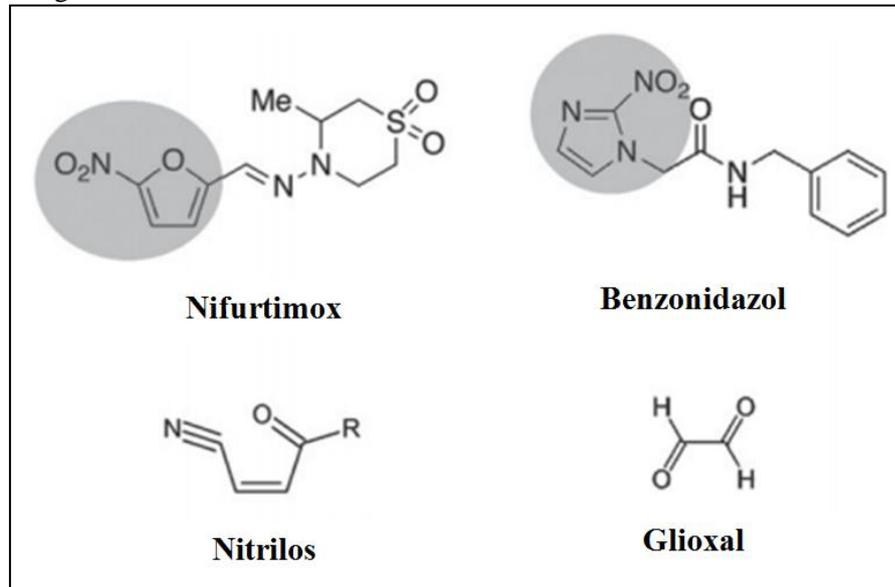
2.4 Quimioterapia da doença de Chagas

Introduzidos nos anos de 1960 e 1970, os medicamentos nitroheterocíclicos Nifurtimox (Nx) e Benzonidazol (Bz), permanecem como únicos quimioterápicos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas (APT, 2010; CHATELAIN, 2017). Estes fármacos apresentam alta eficácia na fase aguda da doença, mas o seu uso na fase crônica ainda é controverso. No entanto, o tratamento com Bz pode restringir a progressão da doença de Chagas e aumentar a soroconversão negativa em pacientes em fase indeterminada (BERN et al., 2007).

Nx exerce sua atividade tripanocida através da indução do estresse oxidativo, enquanto que Bz age na produção de danos no DNA, inibição da síntese de proteínas e na cadeia respiratória. A nitroreductase tripanosomal tipo I desempenha um papel chave na ativação de Bz e Nx através de uma via não sensível ao oxigênio, formando metabólitos altamente citotóxicos, incluindo glioxal e vários nitrilos (Figura 9). Estes tipos de metabólitos

citotóxicos podem facilmente reagir com uma variedade de outras moléculas biológicas para formar aductos, o que pode explicar os efeitos pleiotrópicos observados nos parasitas tratados com estes pró-fármacos (MAYA et al., 2007).

Figura 9 - Estruturas dos fármacos utilizados para tratamento da doença de Chagas.



Fonte: Alsford et al. (2013).

Legenda: As regiões destacadas de nifurtimox e benznidazol correspondem aos grupos 5-nitrofurano e 2-nitroimidazol, respectivamente.

Os efeitos secundários indesejáveis do Bz e Nx, especialmente em adultos, são desvantagens na sua utilização e frequentemente levam os indivíduos acometidos pela doença de Chagas a interrupção do tratamento. Os efeitos colaterais mais frequentes observados na utilização de Nx são: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e problemas digestivos (náusea, vômito, cólica intestinal e diarreia). No caso de Bz, manifestações cutâneas são as mais notáveis, principalmente hipersensibilidade e dermatite com erupções cutâneas. As manifestações mais graves do tratamento com Bz são: depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose. Ambos os medicamentos também apresentam efeitos mutagênicos significativos (SALAS et al., 2011).

Os doentes adultos podem ser tratados com Bz (5-7 mg / kg / dia) em duas doses divididas durante 60 dias, ou com Nx (8-10 mg / kg por dia) em três doses divididas durante 90 dias. Para o tratamento de crianças, Bz (5-10 mg / kg por dia), em duas ou três doses divididas durante 60 dias, ou Nx (15 mg / kg por dia) em três doses divididas, durante 60-90 dias. Bz para tratamento de infecção congênita é altamente eficaz, com taxas de cura > 90% quando instituído nas primeiras semanas de vida. Antes de iniciado o tratamento, durante e

após devem ser realizados exames laboratoriais (hemograma completo, dosagem de provas da função hepática e renal) para monitorar os efeitos adversos nos indivíduos em tratamento (ALONSO-PADILLA; RODRÍGUEZ, 2014; MANDAL, 2014; MOARES, et al., 2014).

O tratamento da doença de Chagas com Bz tem como benefícios a elevada porcentagem de cura parasitológica na fase aguda, prevenção da progressão da doença em decorrência da diminuição da carga parasitária e inibição primária ou interrupção da transmissão congênita. Uma das principais barreiras para o uso generalizado de Bz é a incidência elevada de reações adversas ao medicamento, documentados em até 50% dos pacientes tratados, cerca de um terço dos pacientes interrompem o tratamento devido aos efeitos adversos ou por outros motivos (GROSSO et al., 2011).

O tratamento com Bz é recomendado em todos os casos de infecção aguda e congênita, para os adultos sem cardiopatia chagásica com idades entre 19 e 50 anos e indivíduos que serão submetidos à imunossupressão (indivíduos que passarão por transplante de órgãos ou co-infectados com HIV). No entanto, as decisões de tratamento para adultos devem levar em consideração o benefício, o tempo de tratamento e os efeitos adversos mais frequentes. Para pacientes com cardiopatia chagásica avançada, o tratamento antiparasitário não é recomendado, o foco é dado para a terapia de suporte. Em pacientes com megaesôfago, a absorção do fármaco pode ser prejudicada, desta forma, o tratamento deve ser realizado após a cirurgia corretiva. O Bz e o Nx estão contraindicados na gravidez e em doentes com disfunção renal ou hepática grave (BERN et al., 2007).

Tendo em vista as limitações dos medicamentos utilizados atualmente para o tratamento da doença de Chagas, faz-se necessário a identificação de novos fármacos. Embasado pelo conhecimento atual em relação à fisiologia do parasita e do hospedeiro, uma promissora droga tripanocida deve conter as seguintes características: (i) elevada atividade contra as formas amastigotas e tripomastigotas da corrente sanguínea; (ii) elevada atividade contra diversas cepas de *T. cruzi* para seu uso em diferentes regiões endêmicas; (iii) eficácia nas fases aguda e crônica; (iv) biodisponibilidade oral em poucas doses; (v) baixa toxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade dado o potencial de uso em crianças e mulheres em idade reprodutiva; (vi) baixo custo e boa estabilidade para uma longa vida de prateleira em temperaturas tropicais; (vii) altos níveis de acúmulo em tecido e longas semi-vidas terminais; (viii) baixo risco de cardiotoxicidade, tendo em vista que o coração é o órgão mais afetado em pacientes chagásicos; e (ix) baixo risco de interações com o citocromo P450 hepático para evitar interações medicamentosas, uma vez que muitos pacientes usam antiarrítmicos e anticoagulantes (CASTRO et al., 2011).

Na busca de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, um novo cenário ganhou destaque em 2011, com a pesquisa de novos medicamentos decorrentes de ensaios clínicos na América Latina e na Espanha. Devido ao fato dos antifúngicos derivados de triazol inibirem a biossíntese de ergosterol do *T. cruzi*, componente essencial para o crescimento e sobrevivência do parasita, foram traçados dois desenhos de estudos com o triazol posaconazol (STOP-CHAGAS e CHAGAZAZOL) e um estudo com um pró-fármaco do triazol ravuconazole (E1224) (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2012).

O posaconazol apresentou bons resultados para o tratamento da doença de Chagas aguda e crônica em relação ao Bz em modelo murino. No entanto, este efeito não foi observado em seres humanos, uma vez que 92% dos pacientes tratados com posaconazol dose baixa (100 mg duas vezes por dia em 60 dias) e 81% dos pacientes tratados com posaconazol dose alta (400 mg duas vezes por dia em 60 dias), comparados com 38% no grupo de Bz (5 mg/Kg/dia), foram positivos para *T. cruzi* na RT-PCR após o tratamento (MOLINA et al., 2014). O mesmo perfil foi observado para E1224, um ano após o tratamento: em 92% dos indivíduos tratados foi detectado o DNA do parasito em comparação a 9% para o grupo tratado com Bz (5 mg/Kg/dia) (RIBEIRO et al., 2014).

Na busca de novos fármacos para a doença de Chagas, além dos inibidores da biossíntese de ergosterol, inibidores da cruzipaina (cisteína protease essencial para sobrevivência do *T. cruzi*) estão sendo investigados. Dentre os inibidores de cruzipaina, o K777 estava na fase mais avançada de estudos. Infelizmente, a utilização clínica de K-777 como um agente terapêutico para o tratamento da doença de Chagas foi limitada pela sua hepatotoxicidade (McKERROW et al., 2009; WONG-BAEZA et al., 2015).

O fracasso terapêutico de medicamentos promissores que estavam em ensaios clínicos avançados faz com que a busca por novos compostos eficazes continue essencial para uma terapia eficaz da doença de Chagas. Uma estratégia racional para o desenvolvimento de drogas é a procura de alvos metabólicos críticos para a sobrevivência do parasita ou moléculas que já demonstraram um amplo espectro de atividade antiprotozoária (LECHUGA et al., 2016).

Os compostos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, são considerados uma fonte importante de compostos biologicamente ativos contra vários organismos infecciosos, especialmente parasitas. Diversos estudos relacionados com a atividade *in vitro* de extratos e metabólitos secundários de plantas contra *T. cruzi* foram publicados, e diversas espécies de plantas são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças

parasitarias, embora os dados sobre a toxicidade de tais compostos sejam ausentes (HAMEDT et al., 2014).

2.5 Óleos essenciais

O uso de plantas medicinais, conhecido como Fitoterapia, tem sua origem nas culturas antigas, incluindo os povos egípcios, ameríndios e chineses. No século 19, o isolamento e purificação dos ingredientes ativos de plantas medicinais motivaram o surgimento da indústria farmacêutica (TEIXEIRA et al., 2014). Das 250.000 espécies de plantas no mundo, apenas 21.000 são usadas como fitoterápicos. A fitoterapia é praticada por grande parte da população brasileira, em especial, as mais carentes. Para promover o uso adequado de medicamentos fitoterápicos é fundamental validar cientificamente seus efeitos (MOLINA-GARZA et al., 2014).

A triagem de compostos naturais fornece embasamento para descoberta de novas moléculas, com atividade biológica e elevada seletividade. Novas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas para a doença de Chagas, as quais são baseadas em produtos naturais oriundos de plantas que exibem atividade tripanocida e menor toxicidade (DUSCHAK; COUTO, 2007).

As plantas produzem diversos metabólitos secundários com função de proteção aos predadores e patógenos microbianos. Alguns metabólitos também estão envolvidos em mecanismos de defesa contra o estresse abiótico e são importantes na interação de plantas com outros organismos (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Os óleos essenciais (OEs) – oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas - são compostos voláteis, lipofílicos, complexos e caracterizados por um forte odor. Na natureza, os OEs são responsáveis pela proteção das plantas por atuarem como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs geralmente são líquidos em temperatura ambiente, mas podem também apresentar-se sólidos ou resinosos. Os OEs podem apresentar cores diferentes que vão desde o amarelo claro ao verde esmeralda. São sintetizados por todos os órgãos das plantas, isto é, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca; e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Várias técnicas podem ser usadas para extrair OEs das plantas, incluindo a destilação de água ou vapor, extração com solvente, expressão sob pressão, extração com fluido ou água supercrítico (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; DHIFI et al., 2016).

Os OEs são misturas naturais contendo de 20-60 componentes em concentrações diferentes. Geralmente, de dois a três destes componentes estão em altas concentrações e determinam as propriedades biológicas do OE. Os componentes incluem dois grupos com origens biossintéticas diferentes: o grupo principal é composto de terpenos, e o outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos com baixo peso molecular (ABAD et al., 2012).

Os isoprenos são derivados da condensação do difosfato de isopentilo (IPP) ou do seu isômero 3,3- dimepirofosfatotilatil (DMAPP). Em plantas superiores, acredita-se que duas vias independentes, o mevalonato (MVA) e o metileritritol (MEP) sejam responsáveis pela formação de IPP (difosfato de isopentilo) a partir de acetil-CoA. Os terpenos, hidrocarbonetos formados a partir da combinação de unidades de isopreno (C_5H_8) no citoplasma de células vegetais, são classificados em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e seus derivados oxigenados (terpenóides) (BISWAS et al., 2009). Os terpenóides são terpenos que sofreram alterações bioquímicas através de enzimas que adicionam moléculas de oxigênio e movem ou removem os grupos metílicos. Os terpenóides podem ser subdivididos em álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis e epóxidos (DHIFI et al., 2016; HYLDGAARD et al., 2012).

Geralmente a atividade antimicrobiana do OE depende apenas de um ou dois dos principais constituintes que o compõem. Contudo, evidências indicam que a atividade dos OEs refere-se à proporção em que os principais constituintes estão presentes e suas interações com os constituintes minoritários. Várias atividades antimicrobianas sinérgicas foram relatadas para constituintes ou frações de OEs quando testados em combinações. Quatro mecanismos foram propostos para explicar o mecanismo de sinergia entre os componentes dos OEs: (I) inibição sequencial de vários passos de uma via bioquímica particular, (II) inibição de enzimas que degradam antimicrobianos, (III) interação de vários componentes com a parede celular, (IV) interação com a parede celular ou membrana que leva ao aumento da entrada de outros componentes e (V) componentes com diferentes modos de ação que indiretamente dependem um do outro. Já o antagonismo pode ocorrer quando: (I) combinados compostos bacteriostáticos e bactericidas, (II) componentes que concorrem pelo mesmo alvo de ação, e (III) antimicrobianos que interagem com outros (HYLDGAARD et al., 2012).

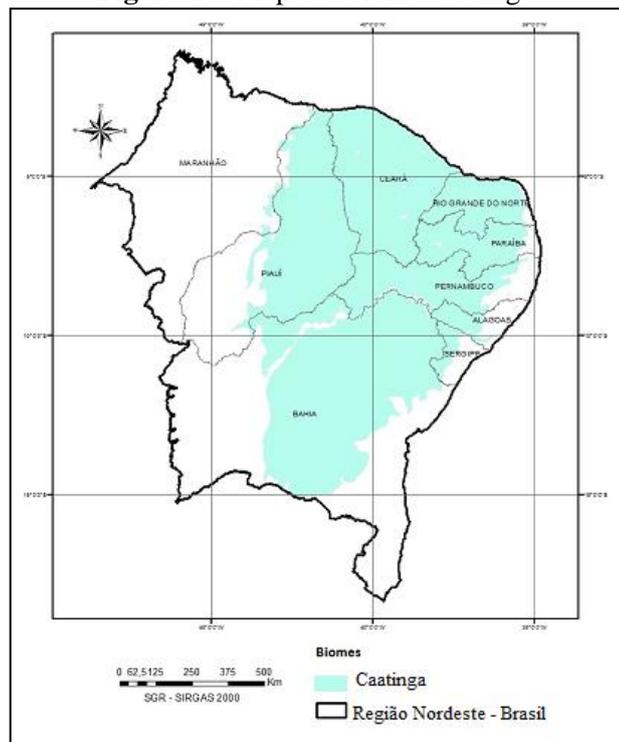
Aproximadamente 3.000 OEs são conhecidos, sendo 10% destes com importância comercial nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. A sua composição química pode variar consideravelmente a depender das condições ambientais, estação do ano, processo de desidratação, condições de armazenamento da planta e método de extração (BILLA et al., 2014).

Os principais mecanismos citotóxicos dos OEs incluem a indução de morte celular por ativação de processos de apoptose e/ou necrose, interrupção do ciclo celular e perda da função de organelas essenciais. Devido à natureza lipofílica e o baixo peso molecular, os componentes dos OEs atravessam membranas celulares causando alterações na composição e fluidez das membranas, levando ao vazamento de íons e moléculas citoplasmáticas e consequente lise celular. As alterações nas membranas leva a redução da produção de ATP, alteração do pH e perda do potencial mitocondrial. Além disto, alguns OEs agem como agentes pró-oxidantes que alteram o estado redox e comprometem a sobrevivência celular (SHARIFI-RAD et al., 2017). Desta forma, os OEs de plantas medicinais são utilizados como substâncias antimicrobianas naturais com papel importante na descoberta de novos fármacos (AKTHAR et al., 2014).

2.6 Plantas da Caatinga

O bioma Caatinga é o principal ecossistema da região Nordeste do Brasil, estendendo-se sobre o domínio de climas semiáridos em uma área de 73.683.649 ha, 6,83% do território nacional, ocupando os estados da Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Maranhão e Minas Gerais (Figura 10) (SÁ et al., 2011).

Figura 10- Mapa do bioma Caatinga.



Fonte: Ribeiro et al., 2016.

A Caatinga é composta por arbustos e plantas pequenas, em sua maioria espinhosas e decídua. Plantas anuais, cactos, bromélias e herbáceas complementam a composição botânica deste bioma (SANTOS et al., 2010). Com precipitação entre 240 e 900 mm/ano e 7-11 meses de estação seca, a flora nativa da Caatinga consiste em 4.478 espécies, sendo 20% destas endêmicas. As famílias arbóreas mais comuns são Fabaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae e Bromeliaceae (ALMEIDA et al., 2014).

Aproximadamente 28 milhões de pessoas vivem no ecossistema da Caatinga. Estudos etnobotânicos na região indicam que as espécies vegetais são utilizadas pela comunidade para tratar várias doenças, incluindo doenças de pele, doenças respiratórias, doenças gastrointestinais e infecções. A realização de estudos das plantas da região semiárida brasileira tem crescido de forma constante com a maioria desses estudos sendo descritiva, com foco em inventariar as plantas junto com suas indicações terapêuticas, padrões de uso e parte da planta usada (ALBURQUERQUE et al., 2012; MOURA et al., 2015).

A Caatinga está entre os biomas mais afetados e ameaçados pela ação humana. O estudo e a conservação da biodiversidade da Caatinga são desafios para a comunidade científica brasileira, devido ao fato de se restringir ao território nacional; ser a área menos estudada e menos protegida (apenas 1% território está em áreas protegidas). Entre as áreas protegidas, o Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA Catimbau), localizado no estado de Pernambuco, distribuído entre as cidades de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, com uma área de 607 km² criado em 13 de dezembro de 2002, é inserido em uma região definida como uma área prioritária para a investigação científica (ALVES et al., 2009; MOURA et al., 2015).

A Caatinga brasileira é um bioma marcado por secura acentuada, por isso, suas plantas desenvolvem características químicas únicas que as tornaram excelentes fontes de compostos com atividade biológica contra microrganismos (ALMEIDA et al., 2006; SILVA et al., 2013). Muitas plantas da Caatinga são usadas na medicina tradicional e vários trabalhos de pesquisa confirmaram seus usos. Dentre elas estão *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hyptenia salzmännii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

2.6.1 *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae)

No Brasil, a família Myrtaceae é ecologicamente importante e representa o maior número de espécies na restinga do Brasil. Entre os gêneros da família Myrtaceae, *Eugenia* é o maior, com aproximadamente 2000 espécies. Recentemente, uma nova espécie da seção

Eugenia racemosae (Myrtaceae) foi descrita na área do Bioma Caatinga localizada no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Esta espécie foi nomeada como *Eugenia brejoensis* Mazine (MAZINE; SOUZA, 2008). Estudos *in vitro* demonstram que extratos de folhas, frutos e ramos de *E. brejoensis*, conhecida popularmente por Cutia, apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (AZEVEDO et al., 2012) e o óleo essencial possui atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (SILVA et al., 2015)

2.6.2 *Hyptis fruticosa* Salzm (Lamiaceae)

O gênero *Hyptis* é constituído por mais de 300 espécies, as quais são frequentemente usadas no tratamento de infecções gastrintestinais, câimbras e dor, assim como em infecções de pele (SILVA et al., 2006). *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth, conhecida popularmente por alecrim de tabuleiro ou alecrim do vaqueiro, é um arbusto que se encontra amplamente distribuído na região Nordeste do Brasil. Estudos científicos demonstraram atividade antibacteriana, antineoplásica, analgésica e antinociceptiva do extrato etanólico desta planta (LIMA et al., 2013).

2.6.3 *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae)

A *Hyptis pectinata* (L.) Poit é popularmente conhecida no Brasil como sambacaitá ou canudinho. Esta planta é bastante utilizada na medicina tradicional em diversas situações, entre elas: rinofaringite, congestão nasal, doenças de pele, problemas gástricos, febre, infecções bacterianas e fúngicas (SILVA, 2002). Além destas atividades, também pode ser utilizada na inflamação, na dor e na cicatrização de feridas (SILVA, 2002). Estudos reportaram que tal planta possui atividade antibacteriana, antifúngica (SANTOS et al., 2008) e anti-*Leishmania* (FALCÃO et al., 2013).

2.6.4 *Hyptis salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)

Hyptis salzmannii (Benth.) Harley é conhecida popularmente como alfazema brava e barrigudinha, pertencente a família Lamiaceae, sendo popularmente utilizada como repelente de insetos e no tratamento de doenças do trato respiratório (FALCÃO; MENEZES, 2003). Na literatura já foi relatada a atividade antibacteriana, antifúngica (MESSANA et al., 1990) e antioxidante (DAVID et al., 2007) desta planta.

2.6.5 *Lippia macrophylla* (Cham.) Linnaea (Verbenaceae)

O gênero *Lippia* inclui cerca de 200 espécies de plantas de regiões tropicais da África, América Central e do Sul. Infusões das folhas, partes aéreas ou flores são tradicionalmente utilizadas como loção tópica para tratamentos respiratórios, gastrointestinais e distúrbios na pele (ESCOBAR et al., 2010). A *Lippia macrophylla* é popularmente utilizada para o tratamento de desordens menstruais e respiratórias (CONCEIÇÃO et al., 2012). O extrato etanólico de *Lippia macrophylla*, antigamente chamada de *Lantana macrophylla* (SANTOS; SALIMENA, 2002), apresentou atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida* (OLIVEIRA et al., 2013) e bactérias gram-positivas (SOUZA JÚNIOR et al., 2005).

2.6.6 *Syagrus coronata* (Mart.) Beccari (Arecaceae)

Plantas da família Arecaceae ocupam um lugar importante na composição da flora dos estados da Região Nordeste do Brasil. Em Pernambuco existem por volta de 18 espécies de palmeiras, algumas destas praticamente restritas ao Nordeste, como *Syagrus coronata* (Mart.) Becc., conhecida como ouricuri ou licuri (RUFINO et al., 2008). Algumas das partes desta planta são usadas em aplicações medicinais, tais como, picadas de cobra, inflamação ocular, micoses e cicatrização de feridas. Já foi demonstrado que o extrato do fruto possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HUGHES et al., 2013), e recentemente o extrato aquoso da casca do fruto apresentou atividade leishmanicida e baixa atividade citotóxica frente a macrófagos peritoneais (RODRIGUES et al., 2011).

Tendo em vista o potencial das plantas da Caatinga como agente quimioterápico contra diversas condições patológicas bem como a diversidade de atividades apresentadas pelos OEs e seus compostos isolados, especialmente a atividade antimicrobiana, no presente trabalho investigaremos os efeitos dos OEs de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa* (sin. *Eplingiella fruticosa*), *Hyptis pectinata* (sin. *Mesosphaerum pectinatum*), *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata* sobre *Trypanosoma cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade dos óleos essenciais de plantas da Caatinga como candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos para terapia da doença de Chagas.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar e quantificar os componentes químicos dos óleos essenciais;
- b) Avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre células de mamífero;
- c) Analisar o efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento de epimastigotas e a viabilidade de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- d) Avaliar *in vitro* a ação dos óleos essenciais na infecção de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais;
- e) Analisar a resposta imune celular induzida por óleos essenciais em células do exsudato peritoneal infectadas com *T. cruzi*;
- f) Identificar os possíveis alvos de ação dos óleos essenciais em *T. cruzi*.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e caracterização química dos óleos essenciais

Seis diferentes óleos essenciais extraídos por hidrodestilação das folhas das plantas *Eugenia brejoensis* (IPA 93702), *Hyptis fruticosa* (sin. *Eplingiella fruticosa*) (IPA 93706), *Hyptis pectinata* (sin. *Mesosphaerum pectinatum*) (IPA 93609), *Hypenia salzmännii* (IPA 93612), *Lippia macrophylla* (IPA 93622) e da semente retirada do fruto maduro de *Syagrus coronata* (IPA 93654) (oriundas do Parque do Catimbau, Buíque-PE – Anexo A) foram cedidos pelo Laboratório do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Estas plantas foram processadas conforme as técnicas taxonômicas e depositadas no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco pelo botânico Dr. Alexandre Silva. A análise bioquímica dos seus constituintes foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa (GC/MS) em colaboração com a Dra. Daniela Navarro do Departamento de Química Experimental. Os óleos essenciais foram guardados a -20°C , protegidos da luz. Foi preparada uma solução estoque solubilizada em DMSO (100 mg/mL), a qual foi diluída em diferentes concentrações para os experimentos.

Para a análise dos óleos essenciais foram injetadas alíquotas de 1 μL em split 1:50 do óleo essencial com concentrações variando entre 2000 a 3000 ppm. Posteriormente injetou-se 1 μL em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: $\text{C}_9\text{-C}_{34}$. E finalmente, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1 μL (0,2 μL de alcanos e 0,8 μL de óleo) sob o modo splitless. A temperatura do CG foi mantida em 60°C por 3 min, depois foi aumentando de $2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 240°C e mantida por 10 min nesta temperatura. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200°C e os espectros de massa registrados em 70 eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de $0,5 \text{ scan}^{-\text{s}}$ de m/z 20-350. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos presentes na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Kratz (1963).

$$IR = 100.i. \frac{(trx - trha)}{(trhd - trha)} + 100.N$$

Onde:

IR: Índice de Retenção de Kratz.

i: Diferença do número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto com o hidrocarboneto que elui antes.

trx: Tempo de Retenção do composto

trhA: Tempo de Retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto.

trhD: Tempo de Retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto.

N: Número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto.

Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). A identificação dos compostos foi realizada a partir da comparação dos índices de retenções e de seus espectros de massa e comparada com dados da literatura (ADAMS, 2009).

4.2 Animais

Os camundongos da espécie *Mus musculus* das linhagens Albino Swiss e BALB/c foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães (CECAL-CPqAM) para a obtenção respectivamente das formas tripomastigotas sanguíneas infectivas de *T. cruzi* e de células do exsudato peritoneal. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal desta mesma instituição (CEUA-CPqAM) sob a licença de número 60/2014 (Anexo B).

4.3 Citotoxicidade

Células do exsudato peritoneal de camundongos foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações (15,625-250 µg/mL) dos óleos

essenciais e do benzonidazol por 48 horas. Após este período, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) e incubados por mais 3 h em estufa de 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e sua absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Poços contendo meio e MTT foram utilizados como controle da reação. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

Adicionalmente, foi avaliada a citotoxicidade dos óleos essenciais em hemácias de humano. Hemácias do tipo O⁺ foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM) a 2% e incubadas em placas de 96 poços fundo “u” com diferentes concentrações dos óleos essenciais (15,625-250 µg/mL). Após um período de 3 horas de incubação a 37° C sob agitação constante, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 4 min a 4 °C e a absorbância do sobrenadante medida a 540 nm para estimar o percentual de hemólise. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% foi utilizado como controle positivo de lise celular e as células em salina como controle negativo. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do controle negativo})}{(\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do controle negativo})} \times 100$$

4.4 Cultivo dos Parasitos

Formas epimastigotas (cepa Dm28c) foram mantidas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico. Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas de 3 dias. Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de camundongos albinos Swiss infectados, através de punção cardíaca, no pico da parasitemia (7 dias). Estas células foram mantidas em cultura de células VERO em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 37 ° C e 5% de CO₂. Formas amastigotas intracelulares de cultura foram obtidas a partir da inoculação de tripomastigotas sanguíneas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, mantidas em meio RPMI 1640 a 37 °C e 5% de CO₂.

4.5 Atividade tripanocida

Formas epimastigotas foram coletadas na fase log de crescimento (2×10^6 parasitas/mL) e incubadas em meio LIT, suplementado com 10% de SFB, por 72 horas, na presença ou ausência de diferentes concentrações dos óleos essenciais (250 $\mu\text{g/mL}$ a 15,625 $\mu\text{g/mL}$). O crescimento da cultura foi determinado através de contagem direta em câmara de Neubauer e a CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada por regressão linear. Cada teste foi realizado em 3 experimentos independentes em triplicata.

Formas tripomastigotas sanguíneas (1×10^7 parasitas/mL), mantidas em meio RPMI à 37°C e 5% de CO_2 , foram incubadas por 24 horas na presença ou ausência de diferentes concentrações dos óleos essenciais (250 $\mu\text{g/mL}$ a 15,625 $\mu\text{g/mL}$) e do benzonidazol. A CL_{50} (concentração que lisa 50% dos parasitas) foi determinada da mesma forma que nas formas epimastigotas. Cada teste foi feito em dois experimentos independentes em quadruplicata.

Para avaliar o efeito dos compostos sobre as células infectadas com *T. cruzi*, macrófagos mantidos em meio RPMI 1640 e 10% SFB foram plaqueados em placas de cultivo de 24 poços (10^6 células/mL), contendo uma lamínula de vidro, e mantidas a 37°C . Após 2 horas de cultivo, as culturas foram lavadas e infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas na proporção de 5:1 parasita/célula. Após 3 horas de interação, os parasitas não internalizados foram retirados por lavagem em PBS estéril e incubados em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações dos óleos essenciais e do benzonidazol. Após 24 horas os macrófagos foram fixados em Bouin e corados com Giemsa, e foi determinado o percentual de infecção (n° de células infectadas/100 macrófagos) e a intensidade de infecção (n° de parasitas/100 células hospedeira) através da microscopia óptica. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.6 Análise do perfil de citocinas produzidas por células de exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*

Para avaliação do perfil de citocinas (Th1, Th2 e Th17), os sobrenadantes de células de exsudato peritoneal infectadas controles (sem tratamento) e infectadas tratadas com $1 \times \text{CL}_{50}$ e $2 \times \text{CL}_{50}$ dos OEs por 24 horas, foram submetidas à dosagem das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A através do Kit CBA Mouse Cytokine assay (BD[®])

Biosciences, CA/EUA). A dosagem de citocinas foi determinada de acordo com as recomendações do fabricante. As medições foram realizadas no citômetro FACS Calibur (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). A aquisição de dados foi realizada utilizando o programa Cell-Quest™ software package fornecido pelo fabricante. A análise de dados foi feita no programa FlowJo software 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Foi realizada uma aquisição de 1800 eventos (mínimo de 300 eventos por *bead*) para cada amostra. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

4.7 Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*

A produção de óxido nítrico pelo os sobrenadantes de células de exsudato peritoneal infectadas controles (sem tratamento) e infectadas tratadas com 1x CL₅₀ e 2x CL₅₀ dos OEs por 24 horas foram testadas através do método reagente de Griess (MOORCROFT et al., 2001). Para medir a concentração de nitrito, 100 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos de cada poço foram incubados com 100 µL do reagente Griess (1% sulfanilamida/0,1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto/2,5% H₃PO₄) à temperatura ambiente por 10 minutos em um agitador de placa. A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.8 Estudo ultraestrutural

Para identificação de possíveis alvos intracelulares de ação tripanocida dos óleos essenciais de plantas da Caatinga, utilizamos formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* do sobrenadante de cultura de células Vero infectadas. Parasitos controles e tratados com 1x CL₅₀ e 2x CL₅₀ dos OEs em tripomastigotas foram lavados e fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50% -100%), infiltrados e incluídos em resina epóxi (Fluka Analytical, Polysciences). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica Microsystem, Wetzlar, ALE) foram coletados em grades de cobre de

malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 à 80 kV.

4.9 Análise do mecanismo de morte celular induzido pelos óleos essenciais

Para avaliarmos o possível mecanismo de morte celular induzido pelos óleos essenciais promissores, epimastigotas e tripomastigotas na concentração de 2×10^6 células/mL respectivamente em meio LIT e meio RPMI suplementado com 10 % de SFB foram tratadas com as concentrações correspondentes a IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ por 48 horas em estufa $27^\circ C$ para epimastigotas e por 24 horas com LC_{50} e $2 \times LC_{50}$ em estufa $37^\circ C$ a 5% de CO_2 para formas tripomastigotas. Após incubação, as culturas foram lavadas 2x em PBS e em seguida submetidas à marcação com iodeto de propídio e anexina V por 10 minutos conforme as indicações do fabricante do kit (Invitrogen). Após esse tempo, as células foram ressuspensas em tampão de ligação e imediatamente submetidas a citometria de fluxo BD Accuri™, usando os detectores 530/30 (FL1) para AV e 582/42 para IP (FL2). A intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos, os dados analisados utilizando o software WinMD12.8, e expressos em porcentagem de células marcadas em cada um dos canais para os seguintes fenótipos: AV^-/IP^- (células não apoptóticas/não necróticas); AV^+/IP^- (células apoptóticas); AV^+/IP^+ (apoptose tardia/necrose) e AV^-/IP^+ (necrose). Células tratadas com H_2O_2 foram consideradas como controle positivo de morte celular. Para a observação da fluorescência, as amostras foram colocadas em placas de cultivo MatTek (MatTek Corp. MA, USA), visualizadas no microscópio confocal Leica SPII-AOBS utilizando o laser HeNe 488nm (para todos os marcadores). As imagens foram adquiridas e processadas através do software Leica Application Suite Lite 2.6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.10 Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial e geração de radicais livres

Para avaliarmos o efeito dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizamos como marcador a rodamina 123, um fluorocromo catiônico que marca mitocôndrias que possuem potencial de membrana preservado. Formas epimastigotas e tripomastigotas (2×10^6 células/mL) foram tratadas como descrito no item 4.9, e em seguida lavadas em PBS. As células foram incubadas com rodamina 123 ($10 \mu g/mL$) por 15 minutos a $37^\circ C$. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo a 488nm. As alterações na

fluorescência foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação $(MT-MC)/MC$, onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento. Foi realizada microscopia confocal a laser de forma semelhante a enunciada no item 4.9. Para a marcação com MitoSOX™, as amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 500 µL de PBS estéril, incubadas com 5 µg/mL de MitoSOX™ por 30 minutos a 37 °C e posteriormente lavadas três vezes em PBS. Células tratadas com H₂O₂ por 20 minutos foram utilizadas como controle tratado para as análises.

4.11 Análise estatística

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 o pós-teste de Kruskal-Wallis no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química dos óleos essenciais

A análise química dos OEs de *E. brejoensis* (OEEB), *H. fruticosa* (OEHF), *H. pectinata* (OEHP), *H. salzmannii* (OEHS), *L. macrophylla* (OELM) e *S. coronata* (OESC), através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, permitiu identificar 115 dos 163 compostos. OELM e OESC tiveram 100% dos seus componentes identificados. Os sesquiterpenos foram os compostos mais abundantes nos OEs de EB (93,83%), HF (69,57%), HP (77,51%) e HS (56,07%). Enquanto o OELM foi constituído predominantemente por monoterpenos (98,08%) e o OESC por ácidos graxos (100%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos químicos dos componentes dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hyphenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

Grupo químico	Óleo essencial (%)					
	EB	HF	HP	HS	LM	SC
Monoterpenos hidrocarbonados	-	4,02	11,65	11,94	12,9	-
Monoterpenos oxigenados	-	1,34	2,83	0,82	85,18	-
Monoterpenos	-	5,36	14,48	12,76	98,08	-
Sesquiterpenos hidrocarbonados	55,18	51,26	49,95	40,86	0,79	-
Sesquiterpenos oxigenados	38,65	18,31	27,56	15,21	0,74	-
Sesquiterpenos	93,83	69,57	77,51	56,07	1,53	-
Ácidos graxos	-	-	0,22	-	-	100
Outros compostos	0,68	5,02	2,46	26,39	0,3	-

Fonte: A autora.

Legenda: EB, *Eugenia brejoensis*; HF, *Hyptis fruticosa*; HP, *Hyptis pectinata*; HS, *Hyphenia salzmannii*; LM, *Lippia macrophylla*; SC, *Syagrus coronata*.

Os principais componentes do OEEB foram δ -cadineno (15,88%), trans-cariofileno (9,77%) e α -Muurolol (9,42%), enquanto que o OEHF teve como constituintes mais abundantes o trans-cariofileno (15,24%), bicilogermacreno (7,33%) e cis-calameneno (7,15%). O principal componente do OEHP foi o trans-cariofileno (30,91%), seguido de óxido de cariofileno (13,19%) e espatulenol (5,68%). Xantoxilina (17,20%) foi o constituinte principal seguido de trans-cariofileno (14,34%) e metil eugenol (5,60%) do OEHS. O timol (49,81%), carvacrol (31,62%) e o-cimeno (10,27%) foram identificados como os principais componentes do OELM. Ácido octanóico foi o principal componente do OESC (38,83%)

seguido pelo ácido dodecanóico (38,45%) e ácido decanóico (20,51%) (Tabela 2). As estruturas dos compostos majoritários estão expostas na figura 11.

Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

(Continua).

Nº	Composto	Kratz		Kovatz		Composição (em % do total do óleo essencial)					
		Calc	Lit ⁽¹⁾	Calc	Lit ⁽¹⁾	EB	HF	HP	HS	LM	SC
1	<i>n</i> -Nonano	898	900	898	900	-	0,53	-	-	-	-
2	α -Tujona	925	924	928	930	-	-	0,71	0,12	-	-
3	Propil Ciclohexano	926	927 ⁽²⁾	930	-	-	0,47	-	-	-	-
4	α -Pino	931	932	935	939	-	1,73	0,72	0,87	-	-
5	Canfeno	945	946	950	954	-	0,24	0,11	-	-	-
6	Sabineno	971	969	975	975	-	-	3,04	0,13	-	-
7	β -Pino	974	974	977	979	-	0,77	3,34	4,52	-	-
8	3-Octanona	979	979	982	983	-	-	0,27	0,69	-	-
9	Mirceno	991	988	992	990	-	-	-	-	1,01	-
10	Misistileno	992	994	992	995	-	0,66	-	-	-	-
11	<i>n</i> -Decano	1000	1000	1000	1000	-	1,12	-	-	-	-
12	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	1002	1003	1003	1004	-	-	-	0,27	-	-
13	δ -3-Careno	1009	1008	1010	1011	-	-	-	0,21	-	-
14	Trimetilbenzene	1021	1021	1023	1025	-	0,40	-	-	-	-
15	<i>o</i> -Cimeno	1023	1022	1026	1026	-	0,78	3,15	1,63	10,27	-
16	Limoneno	1027	1024	1030	1029	-	-	0,58	-	-	-
17	β -Felandreno	1028	1025	1031	1029	-	0,50	-	4,09	-	-
18	<i>trans</i> -Decahidro Naftaleno	1052	1053	1055	1059	-	0,38	-	-	-	-
19	1-Etil-3,5-Dimetil-benzeno	1058	-	1061	1058	-	0,21	-	-	-	-
20	γ -Terpineno	1059	1054	1062	1059	-	-	-	0,10	1,62	-
21	Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	1066	1065	1069	1070	-	-	0,32	-	-	-
22	Fenchona	1087	1083	1089	1086	-	-	1,39	0,34	-	-
23	Hidrato de <i>cis</i> -Sabinene	1097	1098	1098	0198	-	-	0,26	-	-	-
24	<i>n</i> -Undecano	1101	1100	1101	1100	-	0,88	-	-	-	-
25	<i>trans</i> -Tujona	1108	1112	1109	1114	-	0,12	-	-	-	-
26	Cânfora	1144	1141	1147	1146	-	0,96	0,11	-	-	-
27	Terpineol-4	1178	1174	1180	1177	-	0,15	0,62	0,21	0,44	-
28	ρ -Cimanol-8	1186	1179	1187	1182	-	-	0,13	-	-	-
29	Criptona	1186	1183	1188	1185	-	-	-	0,22	-	-

Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

Nº	Composto	Continuação									
		Kratz		Kovatz		Composição (em % do total do óleo essencial)					
		Calc	Lit ⁽¹⁾	Calc	Lit ⁽¹⁾	EB	HF	HP	HS	LM	SC
30	α -Terpineol	1191	1186	1192	1188	-	0,11	-	0,18	-	-
31	Ácido octanóico	1194	1167	1195	1171	-	-	-	-	-	38,83
32	<i>n</i> -Dodecano	1201	1200	1201	1200	-	0,10	-	-	-	-
33	Metil Éter de Timol	1236	1232	1238	1235	-	-	-	-	0,27	-
34	Timol	1294	1289	1294	1290	-	-	-	-	49,81	-
35	Carvacrol	1303	1298	1303	1299	-	-	-	-	31,62	-
36	δ -Elemeno	1340	1335	1341	1338	-	0,23	1,55	-	-	-
37	α -Cubebeno	1352	1348	1354	1351	0,67	2,16	0,10	0,13	-	-
38	Acetato de Timol	1356	1349	1358	1352	-	-	-	-	1,68	-
39	Ciclosativeno	1370	1369	1372	1371	-	0,15	-	-	-	-
40	α -Ilangeneno	1374	1373	1375	1375	-	-	-	0,18	-	-
41	Acetato de Carvacrol	1375	1370	1376	1372	-	-	-	-	1,36	-
42	α -Copaeno	1379	1374	1380	1376	1,36	4,66	1,13	0,91	-	-
43	α -Funebreno	1383	1380	1384	1382	-	-	-	0,10	-	-
44	β -Bourboneno	1388	1387	1388	1388	-	0,19	1,02	1,77	-	-
45	Ácido Decanóico	1388	1364	1389	1366	-	-	-	-	-	20,51
46	β -Cubebeno	1393	1387	1393	1388	-	0,54	-	-	-	-
47	β -Elemeno	1395	1389	1395	1390	0,73	0,95	2,31	0,91	-	-
48	<i>cis</i> -Jasmone	1401	1392	1401	1392	-	-	-	0,14	-	-
49	Metil Eugenol	1407	1403	1407	1403	-	-	-	5,60	-	-
50	α -Gurjuneno	1413	1409	1413	1409	1,77	-	-	0,27	-	-
51	α -Cedreno	1415	1410	1416	1411	-	-	0,62	-	-	-
52	<i>trans</i> -Cariofileno	1423	1417	1424	1419	9,77	15,24	30,91	14,34	0,47	-
53	β -Copaeno	1432	1430	1434	1432	0,46	0,16	0,20	0,42	-	-
54	β -Gurjuneno	1435	1431	1436	1433	-	-	-	0,08	-	-
55	α - <i>trans</i> -Bergamoteno	1438	1432	1440	1434	-	-	-	0,09	-	-
56	Aromadendreno	1442	1439	1444	1441	1,88	0,58	0,08	0,91	-	-
57	Miltaileno-4(12)	1446	1445	1448	1447	-	-	0,28	-	-	-
58	α -Himachaleno	1447	1449	1448	1451	0,23	-	-	0,22	-	-
59	<i>trans</i> -Muuroala-3,5-dieno	1454	1451	1456	1453	-	0,50	-	-	-	-
60	α -Humuleno	1457	1452	1459	1454	1,60	3,41	1,57	0,74	-	-
61	Allo-Aromadendreno	1463	1458	1464	1460	-	0,10	-	-	-	-

Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

(Continuação)

Nº	Composto	Kratz		Kovatz		Composição (em % do total do óleo essencial)					
		Calc	Lit ⁽¹⁾	Calc	Lit ⁽¹⁾	EB	HF	HP	HS	LM	SC
62	6- Dimetóxi-Ageratocromeno	1464	1461	1466	1463	-	-	0,16	-	-	-
63	9-epi-(E)-Cariofileno	1465	1464	1466	1466	2,01	0,27	-	0,41	-	-
64	cis-Muurolo-4(14),5-dieno	1466	1465	1468	1466	-	-	-	0,11	-	-
65	β -Acoradieno	1470	1469	1471	1479	-	-	0,17	0,26	-	-
66	trans-Cadina-1(6),4-dieno	1477	1475	1478	1476	0,45	-	-	-	-	-
67	γ -Muurolo	1480	1478	1481	1479	2,18	0,43	0,58	2,19	-	-
68	Germacreno D	1485	1480	1486	1481	-	3,84	4,47	3,87	-	-
69	Hidroxianisole Butilado	1487	1488	1487	1489	-	-	-	-	0,40	-
70	β -Selineno	1490	1489	1490	1490	1,40	0,11	0,37	0,60	-	-
71	trans-Muurolo-4(14),5-dieno	1496	1493	1496	1493	0,44	0,45	-	-	-	-
72	Viridifloreno	1499	1496	1499	1496	-	-	-	4,60	-	-
73	Biciclogermacreno	1500	1500	1500	1500	5,13	7,33	1,46	-	-	-
74	α -Muurolo	1504	1500	1504	1500	3,68	0,55	0,29	1,29	-	-
75	Germacreno A	1509	1508	1510	1509	-	0,26	0,32	0,22	-	-
76	β -Bisaboleno	1512	1505	1512	1505	-	-	-	-	0,32	-
77	γ -Cadineno	1518	1513	1519	1513	5,78	0,94	0,47	1,88	-	-
78	Espirovetiva-1(10),7(11)- dieno	1521	-	1522	1523	-	-	0,56	-	-	-
79	δ -Cadineno	1527	1522	1528	1523	15,88	-	1,32	3,89	-	-
80	Metil éster do Ácido Dodecanóico	1527	1524	1528	1525	-	-	-	-	-	0,07
81	cis-Calameneno	1527	1521	1528	1522	-	7,15	-	-	-	-
82	trans-Cadina-1,4-dieno	1536	1533	1537	1534	0,24	1,21	-	0,09	-	-
83	α -Cadineno	1542	1537	1543	1538	0,93	0,12	0,37	0,54	-	-
84	α -Calacoreno	1547	1544	1548	1545	0,60	-	-	0,25	-	-
85	Elemol	1553	1548	1554	1549	-	0,27	-	-	-	-
86	Germacreno B	1561	1559	1562	1561	-	-	0,36	-	-	-
87	<(E)->Nerolidol	1567	1561	1568	1563	-	-	0,24	-	-	-
88	β -Calacoreno	1567	1564	1568	1565	-	-	-	0,09	-	-
89	Palustrol	1572	1567	1573	1568	0,83	0,24	0,17	0,91	-	-
90	Espatuleno	1582	1577	1583	1578	7,84	5,86	5,68	2,89	-	-
91	Ácido Dodecanóico	1583	1565	1584	1566	-	-	-	-	-	38,45

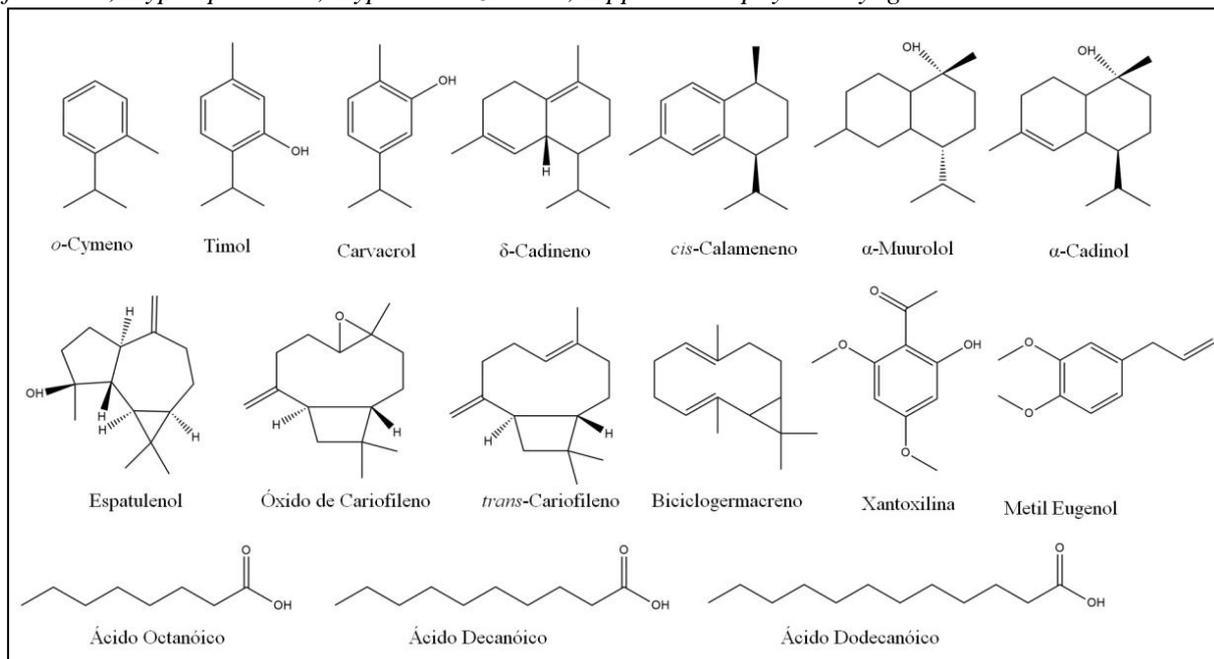
Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

Nº	Composto	(Conclusão)									
		Kratz		Kovatz		Composição (em % do total do óleo essencial)					
		Calc	Lit	Calc	Lit	EB	HF	HP	HS	LM	SC
92	Óxido de Cariofileno	1588	1582	1588	1583	4,61	2,92	13,19	5,45	0,74	-
93	Viridiflorol	1596	1592	1596	1592	0,70	2,18	1,45	0,72	-	-
94	Guaiol	1602	1600	1602	1600	1,14	0,38	-	-	-	-
95	Ledol	1607	1602	1607	1602	1,98	-	-	0,25	-	-
96	β-Oplopenono	1613	1607	1614	1607	0,63	-	-	-	-	-
97	Epóxido de Humuleno II	1614	1608	1614	1608	-	0,32	0,46	0,23	-	-
98	<1,10-di-epi-> Cubenol	1619	1618	1620	1619	0,59	0,68	0,23	0,27	-	-
99	Junenol	1623	1618	1623	1619	-	-	0,33	-	-	-
100	Eremoligenol	1630	1629	1631	1631	-	-	0,22	-	-	-
101	γ-Eudesmol	1636	1630	1637	1632	-	0,83	-	0,16	-	-
102	Epóxi-allo-aromadendreno	1642	1639	1643	1641	0,68	-	-	-	-	-
103	α-Muurolol	1645	1644	1646	1646	9,42	1,99	3,48	1,85	-	-
104	α-Eudesmol	1655	1652	1656	1653	-	1,50	-	-	-	-
105	α-Cadinol	1659	1652	1660	1654	8,33	1,14	1,55	1,75	-	-
106	Ageratochromeno	1663	1658	1664	1660	-	-	1,25	-	-	-
107	cis-Calamenenol-10-ol	1664	1660	1665	1661	-	-	-	0,32	-	-
108	trans-Calamenenol-10-ol	1672	1668	1673	1669	0,57	-	-	-	-	-
109	Xantoxilina	1677	1675	1678	-	-	-	-	17,20	-	-
110	Ácido Tetradecanóico	1768	1767	1768	-	-	-	-	0,15	-	1,99
111	Éster 2-fenil Etilico do Ácido Benzenoacético	1917	1913	1918	1913	-	-	0,19	-	-	-
112	Farnesil Acetona	1921	1913	1921	1913	-	-	0,37	-	-	-
113	Ácido Hexadecanóico	1964	1959	1965	1960	-	-	0,22	1,45	-	0,15
114	(Z,Z,Z)-9,12,15-Ácido Octadecatrienóico	2142	-	2142	2143	-	-	-	0,84	-	-
115	Acetato de Fitol	2221	2218	2220	2218	-	-	-	0,10	-	-
115 de 163	Compostos não identificados					5,46	19,03	5,23	4,62	-	-
	Compostos identificados					94,51	79,95	94,45	95,22	100	100
	Total					99,97	98,98	99,68	99,84	100	100

Legenda: EB, *Eugenia brejoensis*; HF, *Hyptis fruticosa*; HP, *Hyptis pectinata*; HS, *Hypenia salzmannii*; LM, *Lippia macrophylla*; SC, *Syagrus coronata*.

Fonte: A autora.

Figura 11 - Principais componentes encontrados nos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

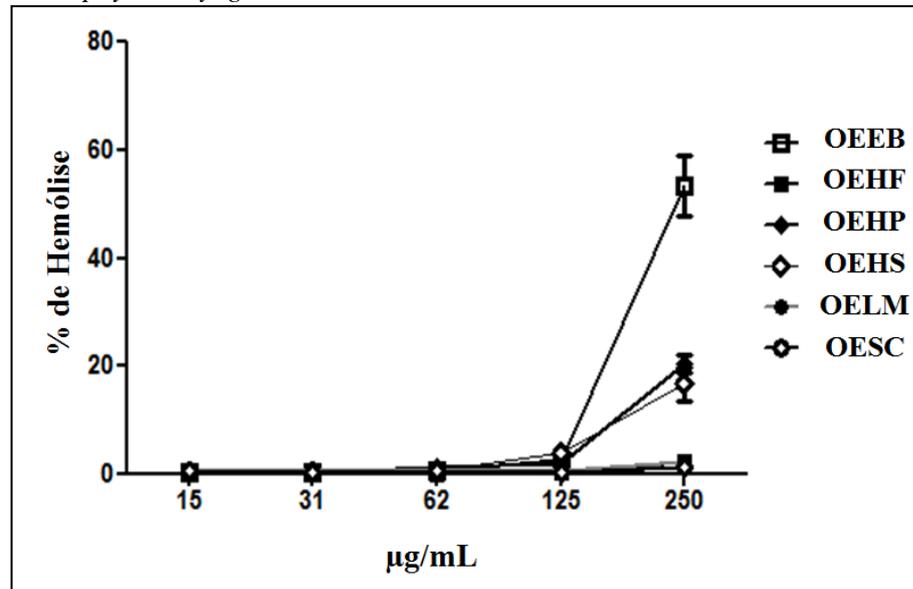


Fonte: A autora.

5.2 Atividade citotóxica e tripanocida dos óleos essenciais

Nossos resultados mostraram que na maior concentração testada (250 $\mu\text{g/mL}$) os OEs de HS, HP e EB foram capazes de induzir respectivamente 16,7; 20,5 e 53,4% de hemólise. Entretanto, em concentrações menores que 125 $\mu\text{g/mL}$ esse percentual foi inferior a 4% para todos os OEs estudados (Figura 12). A avaliação da citotoxicidade em células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c, mostrou que o OELM foi o menos citotóxico ($\text{CC}_{50} = 400,66 \pm 11,36 \mu\text{g/mL}$), seguido pelo OEHF ($\text{CC}_{50} = 333,71 \pm 40,41 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 3).

Figura 12 – Atividade hemolítica dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.



Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHF, óleo essencial de *Hyptis fruticosa*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; OEHS, óleo essencial de *Hyptis salzmannii*; OELM, óleo essencial de *Lippia macrophylla*; OESC, óleo essencial de *Syagrus coronata*.

Tabela 3 - Atividade tripanocida e citotóxica dos óleos essenciais de *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis salzmannii*, *Lippia macrophylla* e *Syagrus coronata*.

Óleo essencial	CI ₅₀	CL ₅₀	CC ₅₀	Células do Exsudato Peritoneal	CI ₅₀ Amastigota	Tripomastigota	Amastigota
	Epimastigota	Tripomastigota	µg/mL				
EB	29 ± 4,5	17,39 ± 0,62	251,4 ± 44,3		12,5 ± 1,74	14,45	20,11
HF	57,8 ± 9	49,3 ± 5,5	333,71 ± 40,41		53,7 ± 7,8	6,76	6,2
HP	56,1 ± 17	25,64 ± 3,26	261,05 ± 53,67		25,5 ± 0,5	10,18	10,2
HS	42,13 ± 9,34	36,27 ± 3,2	303,71 ± 44,10		35,25 ± 3,07	8,37	8,6
LM	37,6 ± 5	70,6 ± 7,5	400,66 ± 11,36		51,76 ± 5,65	5,67	7,7
SC	100,6 ± 38	182,49 ± 58,05	244,22 ± 24,35		408,33 ± 23,36	1,38	0,6
Bz	-	0,8 ± 0,18	1,69 ± 0,3		1,36 ± 0,4	2,11	1,2

Fonte: A autora.

Legenda: EB, *Eugenia brejoensis*; HF, *Hyptis fruticosa*; HP, *Hyptis pectinata*; HS, *Hyptis salzmannii*; LM, *Lippia macrophylla*; SC, *Syagrus coronata*; Bz, benzonidazol; CI₅₀ concentração inibitória de 50%; CL₅₀ concentração de lise de 50%; CC₅₀, concentração citotóxica de 50%; ISe, Índice de seletividade.

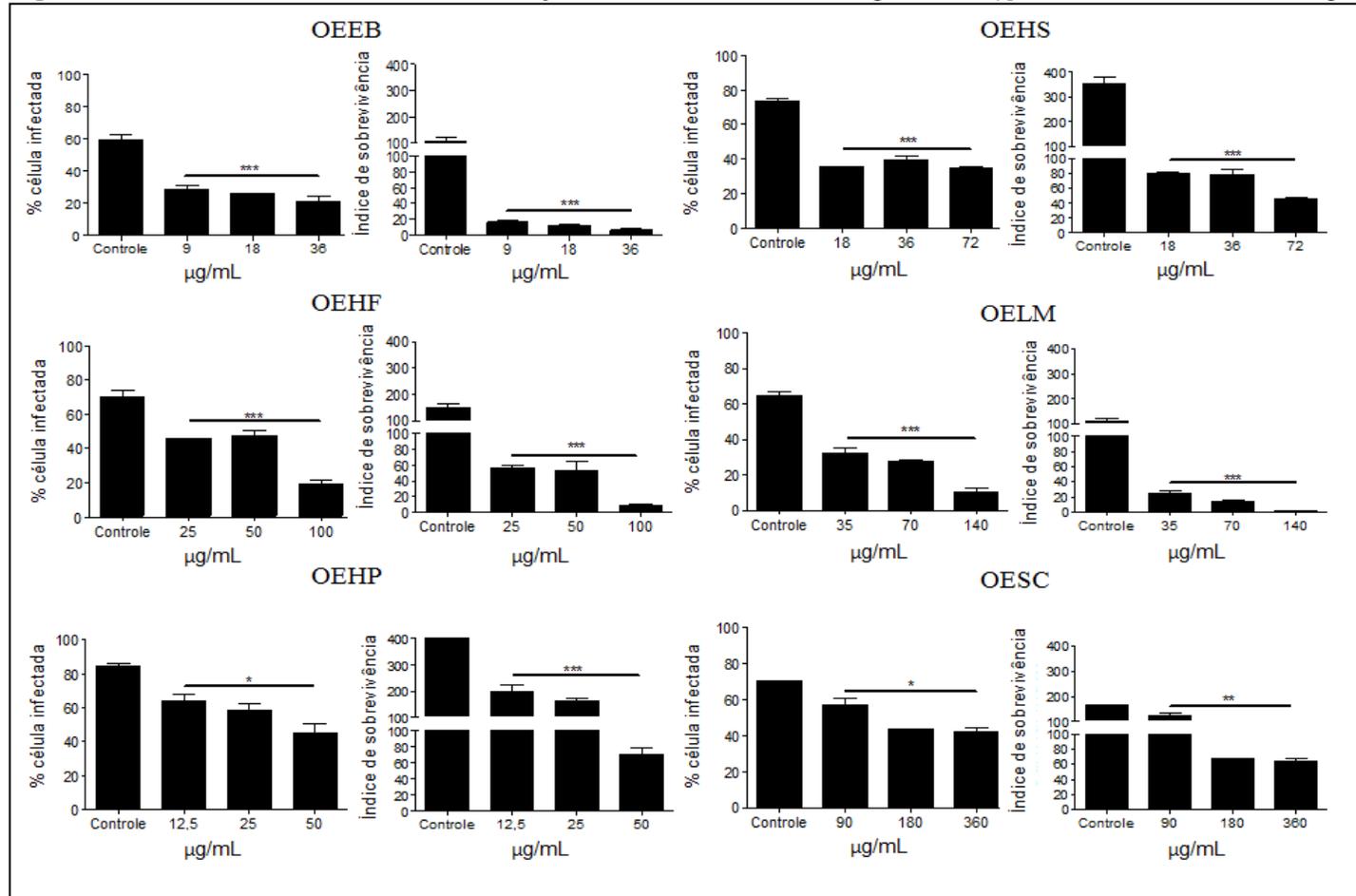
A melhor atividade inibitória para formas epimastigotas de *T. cruzi* foi obtida pelo OEEB (CI₅₀ / 48h = 29 ± 4,5 µg/mL) seguido por OELM (CI₅₀ / 48h = 37,6 ± 5 µg/mL) e OEHS (CI₅₀ / 48h = 42,13 ± 9,34 µg/mL). O OEEB foi o mais eficaz para tripomastigotas

($CL_{50} / 24h = 17,39 \pm 0,62 \mu g/mL$), seguido pelo OEHP ($CL_{50} / 24h = 25,64 \pm 3,26 \mu g/mL$) e o OEHS ($CL_{50} / 24h = 36,27 \pm 3,2 \mu g/mL$). O OEEB apresentou a melhor concentração inibitória para as formas amastigotas de *T. cruzi* ($CI_{50} / 24h = 12,5 \pm 1,74 \mu g/mL$) seguido pelo OEHP ($CI_{50} / 24h = 25,5 \pm 0,5 \mu g/mL$) e OEHS ($CI_{50} / 24h = 35,25 \pm 3,07 \mu g/mL$) (Tabela 3).

Exceto para o OESC (ISE = 1,38), todos os OEs investigados foram mais tóxicos para todas as formas evolutivas de *T. cruzi* em comparação com células do exsudato peritoneal, com índice de seletividade superior ao determinado para o benzonidazol (2,11). Os OEs de EB, HP e HS apresentaram os maiores índices de seletividade para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, respectivamente 14,4; 10,1 e 8,37. Para a forma intracelular os melhores índices de seletividade foram para o OEEB (20,11), seguido pelo OEHP (10,2) e o OEHS (8,6) (Tabela 3).

Os tratamentos de macrófagos peritoneais murinos infectados com *T. cruzi* (Figura 13) mostram uma redução na infecção dos macrófagos para todos os OEs estudados, após 24 horas de tratamento. A maior redução na infecção foi obtida pelo OEEB (36 $\mu g/mL$ reduziu 30% no número de macrófagos infectados em relação ao controle). Além disso, OEEB também apresentou a maior redução na sobrevivência das amastigotas nas células infectadas (36 $\mu g/mL$ reduziu cerca de 90% o número de amastigotas/macrofágo infectado).

Figura 13 - Efeito dos óleos essenciais na infecção e sobrevivência de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos.



Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHF, óleo essencial de *Hyptis fruticosa*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; OEHS, óleo essencial de *Hyptis salzmannii*; OELM, óleo essencial de *Lippia macrophylla*; OESC, óleo essencial de *Syagrus coronata*. Valores estatisticamente significativos pelo teste ANOVA em relação ao controle infectado, * ($p \leq 0,05$); ** ($p \leq 0,01$) e *** ($p \leq 0,001$).

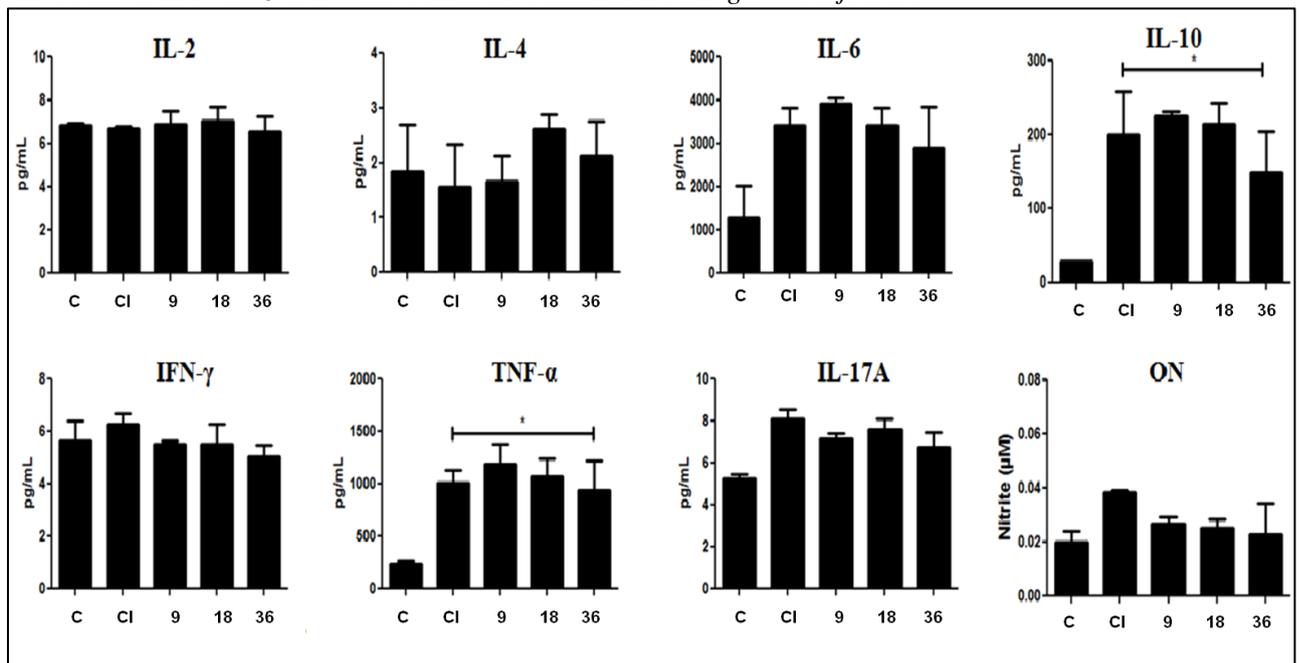
5.3 Avaliação da resposta imune

Com o propósito de avaliar o potencial imunomodulador dos OEs de plantas da Caatinga, células do exsudato peritoneal (CEPs) de camundongos Balb/c infectadas ou não por *T. cruzi* foram submetidas ao tratamento com as concentrações dos OEs correspondentes à 0,5 x, 1 x e 2 x a CL₅₀ contra tripomastigotas, a produção de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 bem como a produção de óxido nítrico (ON) foram analisadas.

Nossos resultados mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* e o tratamento das CEPs infectadas com os OEs não alteraram significativamente os níveis basais de produção de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-17 e ON (Figuras 14-19).

O tratamento das CEPs infectadas com o OEEDB e o OEHS nas concentrações testadas não foi capaz de induzir alterações estatisticamente significativas no perfil de citocinas em relação às CEPs infectadas não tratadas (Figuras 14 e 15).

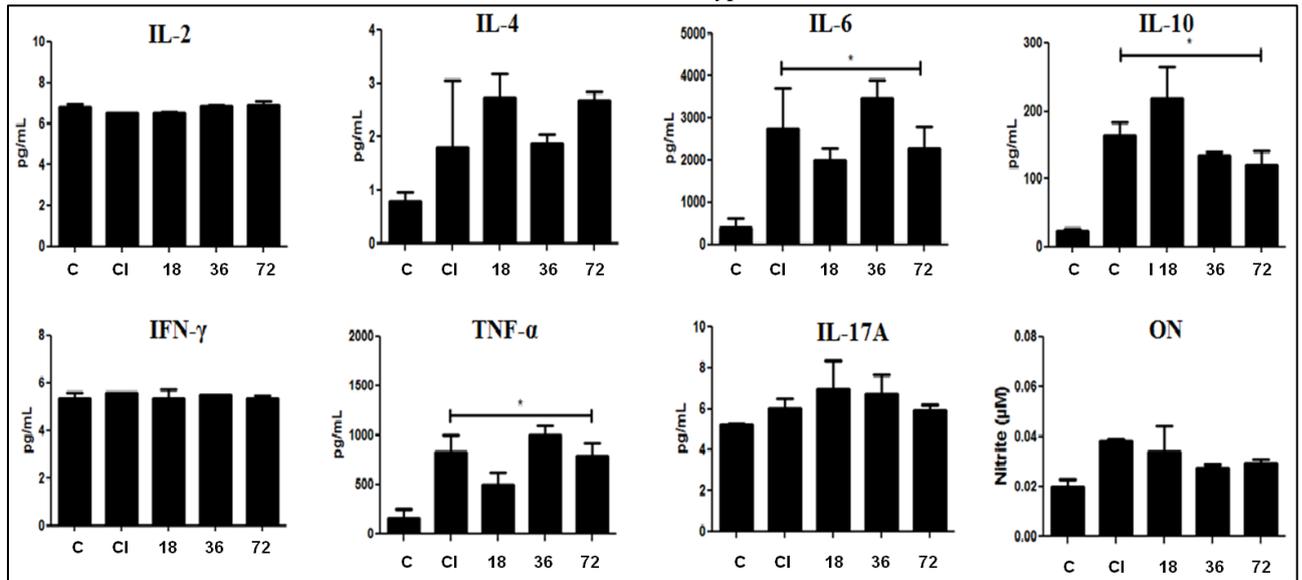
Figura 14 – Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Eugenia brejoensis*.



Fonte: A autora.

Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$).

Figura 15 – Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Hypenia salzmannii*.

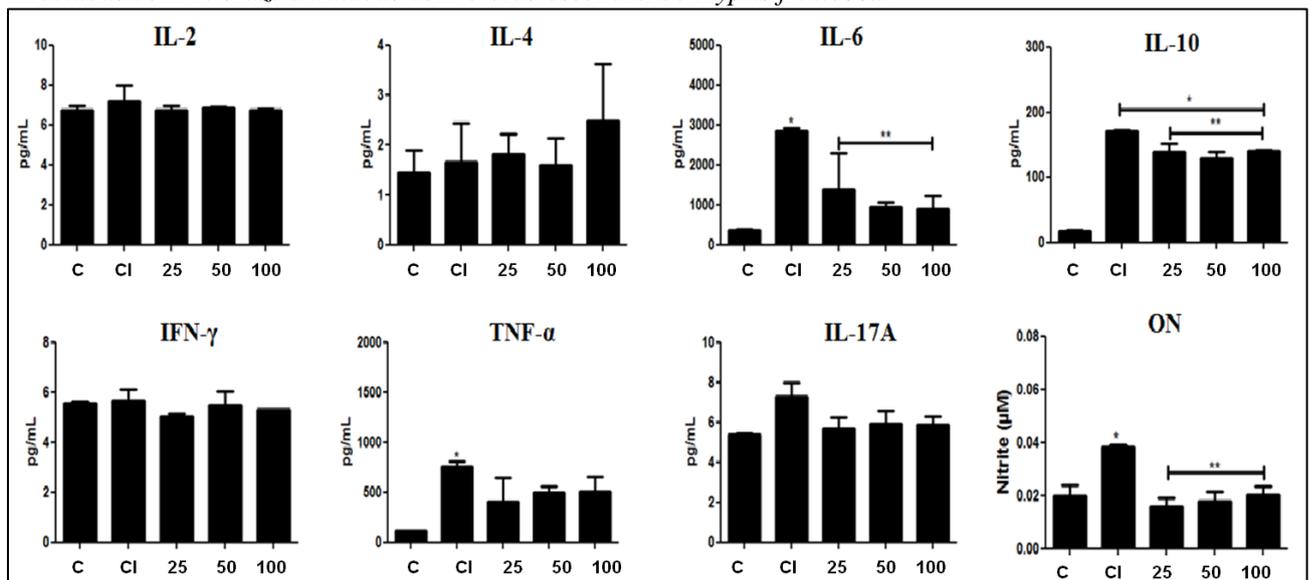


Fonte: A autora.

Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$).

Já o tratamento com OEHF induziu a diminuição significativa nos níveis de IL-6, IL10 bem como de ON em todas as concentrações testadas quando comparado aos níveis destas citocinas em CEPs infectadas não tratadas (Figura 16).

Figura 16 – Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Hyptis fruticosa*.

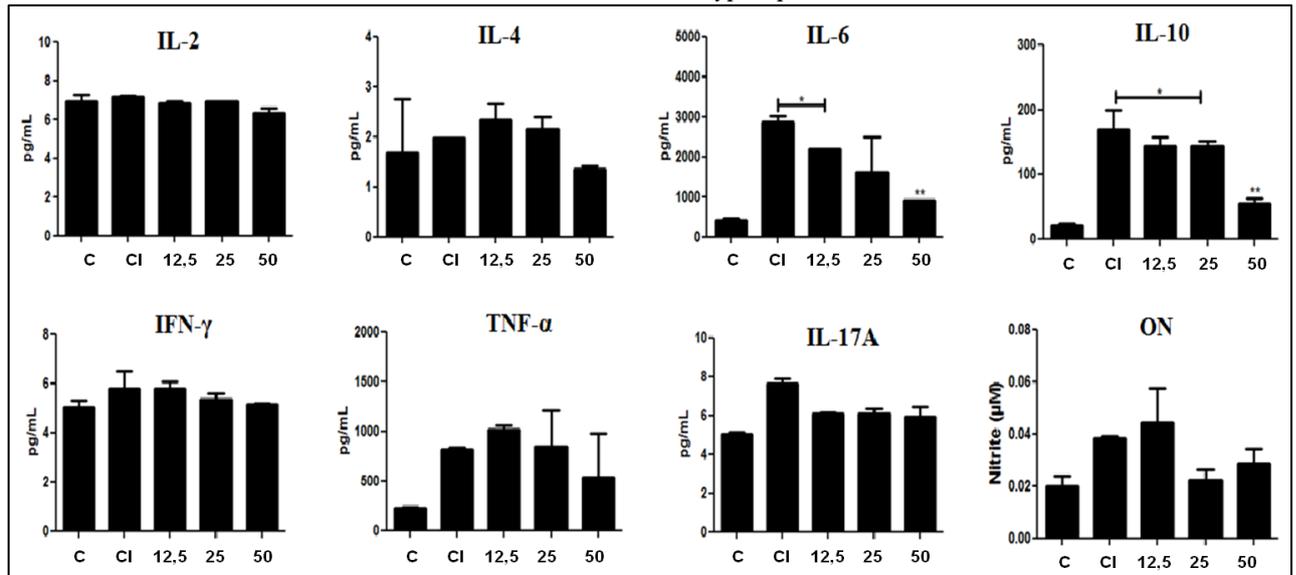


Fonte: A autora.

Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$) e (**) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle infectado ($p \leq 0,05$).

O OEHP, por sua vez, na concentração de 2 x CL₅₀ (50 µg/mL) reduziu a produção de IL-6 e IL-10 em relação ao controle infectado, mas não induziu alterações significativas nos níveis de ON, embora a diminuição deste radical livre em relação as CEPs infectadas não tratadas tenha sido observada (Figura 17).

Figura 17 – Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Hyptis pectinata*.

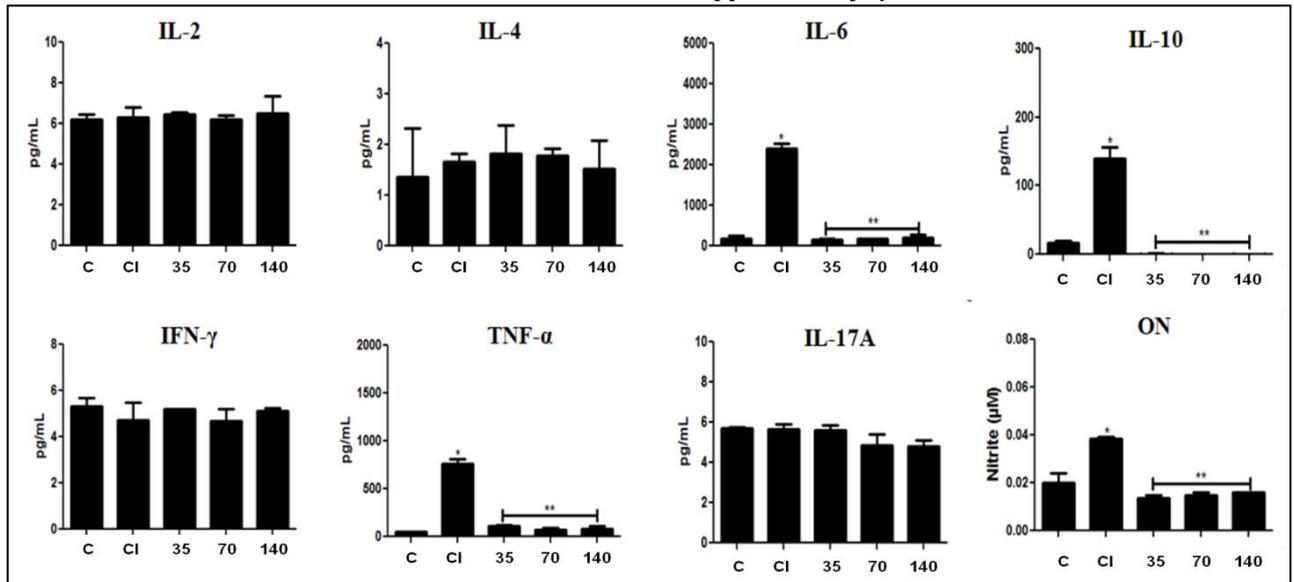


Fonte: A autora.

Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$) e (**) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle infectado ($p \leq 0,05$).

O OELM em todas as concentrações testadas diminuiu significativamente a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 em relação ao controle infectado, reestabelecendo os níveis basais encontrados nas CEPs não infectadas. Da mesma forma o tratamento com este OE diminuiu significativamente os níveis de ON produzido pelas CEPs em resposta a infecção por *T. cruzi* (Figura 18).

Figura 18– Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Lippia macrophylla*.

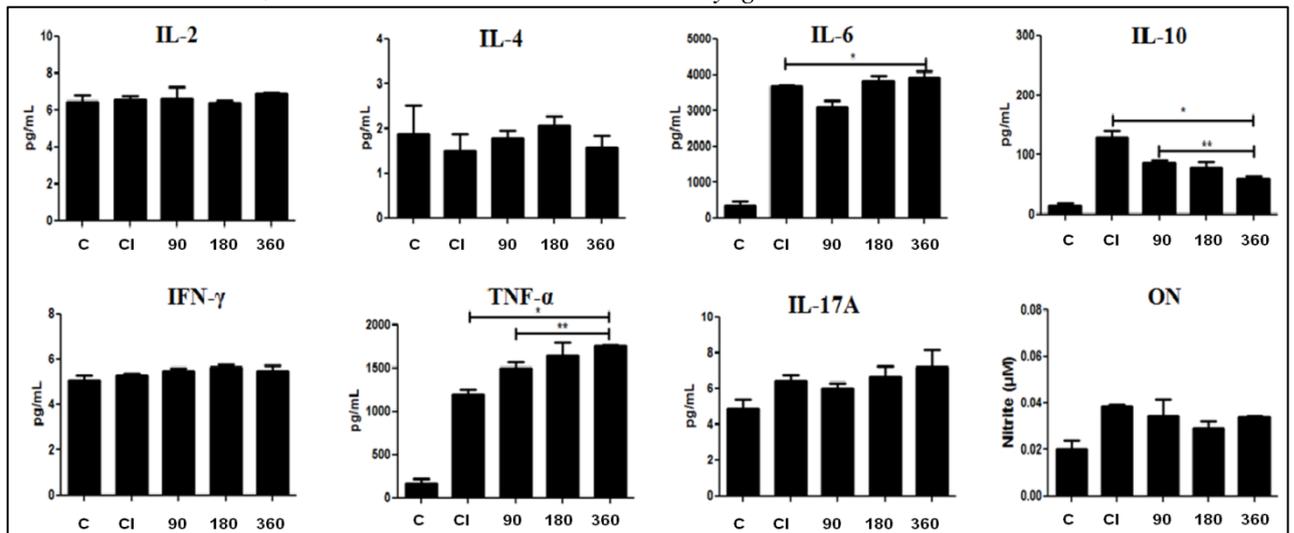


Fonte: A autora.

Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$) e (**) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle infectado ($p \leq 0,05$).

O tratamento com o OESC elevou significativamente os níveis de TNF- α e reduziu IL-10 de forma dose-dependente quando comparados com as CEPs infectadas controle e CEPs não infectadas e não tratadas (Figura 19).

Figura 19 – Produção de citocinas e óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos balb/c infectadas com *T. cruzi* e tratadas com o óleo essencial de *Syagrus coronata*.



Fonte: A autora.

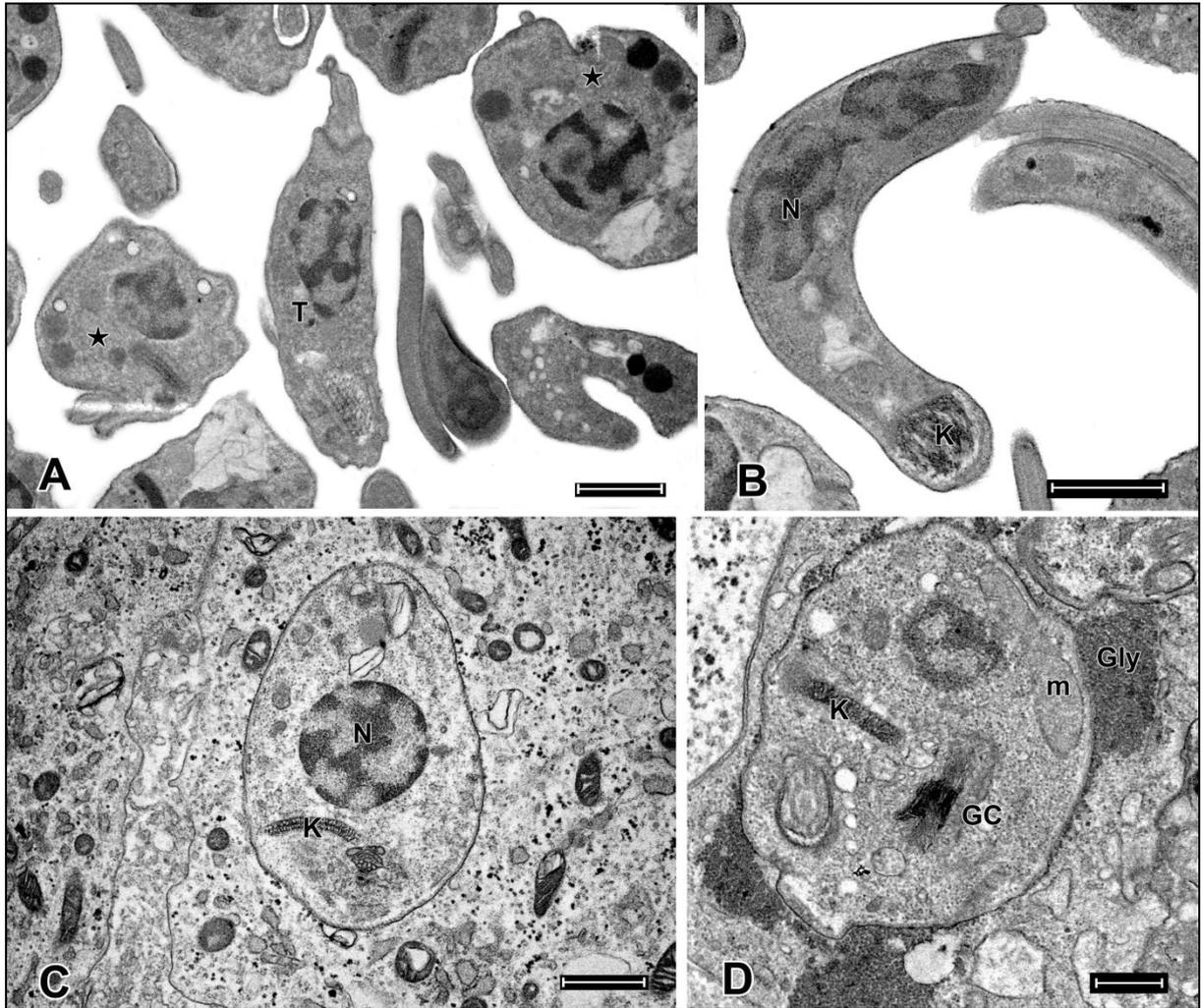
Legenda: C - controle sem infecção, CI - controle infectado, (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle não infectado ($p \leq 0,05$) e (**) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle infectado ($p \leq 0,05$).

5.4 Alterações ultraestruturais induzidas pelo tratamento com os óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata*

Tendo em vista que o OEEB e o OEHP foram os que apresentaram o melhor índice de seletividade contra as formas amastigotas e tripomastigota (ISe > 10), foi realizada a análise ultraestrutural de células Vero infectadas controles e tratadas, no intuito de identificarmos as principais alterações nas formas amastigotas e tripomastigotas, bem como as possíveis organelas alvo da ação destes OEs.

Nossos resultados mostraram a presença de formas tripomastigota e amastigotas com morfologia típica no sobrenadante de cultura não tratados. As formas tripomastigotas controle apresentaram núcleo bem preservado com heterocromatina evidente, forma alongada e cinetoplasto fibrilar em forma de cesta localizado na porção posterior do parasita (Figura 20A-20B). Já as amastigotas apresentaram forma arredondada e cinetoplasto em formato de bastão. Ambas as formas do parasita mostraram citoplasma homogêneo e membrana plasmática íntegra (Figura 20A). Eventualmente, foi possível observar no sobrenadante das culturas formas amastigotas (Figura 20C-20D) bem preservadas no citoplasma de células Vero. Interessantemente, observou-se uma concentração de glicogênio da célula hospedeira ao redor dos parasitas (Figura 20D).

Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de culturas infectadas com *Trypanosoma cruzi*.

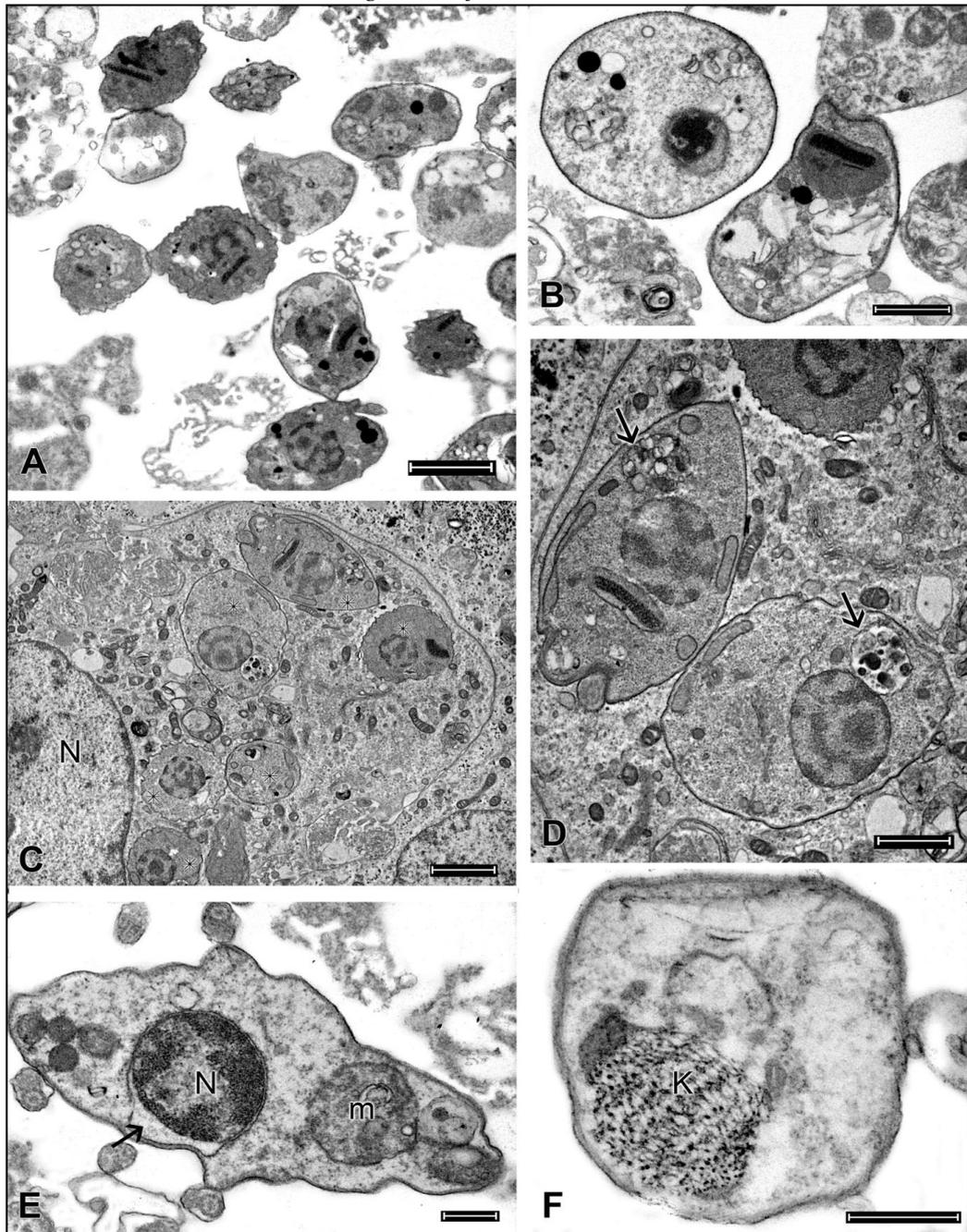


Fonte: A autora.

Nota: A- Detalhe do sobrenadante de cultura infectada controle contendo formas tripomastigotas (T) e amastigotas livres (estrelas) bem preservadas; B- Detalhe em grande aumento de uma forma tripomastigota livre apresentando citoplasma homogêneo e granular, núcleo (N) e cinetoplasto em forma de cesta (K) evidentes. C-D - Detalhe de célula Vero na qual podemos observar a presença de forma amastigota bem preservada em seu citoplasma e organelas como mitocôndria (m) e complexo de golgi (CG). Note em (D) a presença de um grande acúmulo de glicogênio (gly) da célula hospedeira ao redor do parasita. Barras: A-C = 1 μ m e B-D = 500 nm.

O sobrenadante de culturas tratadas com OEEB, na concentração correspondente a CL_{50} de tripomastigota, mostraram drásticas alterações morfológicas nos parasitas livres tais como: aparecimento de espaços eletróluscentes no citoplasma e aumento de vacúolos; perda da forma do corpo celular; desestruturação do material nuclear e do k-DNA. Também foi possível observar aumento de debris celulares no meio extracelular, provenientes dos parasitas e das células hospedeiras (Figura 21A-21B). Apesar das alterações tenderem a serem mais brandas nas formas intracelulares presentes no citoplasma das células hospedeiras (Figura 21C-21D), já se pode observar a presença de vacúolos semelhantes aos autofagosomos e alterações na membrana plasmática nessas formas. A maioria das células Vero presente no sobrenadante da cultura não apresentou alterações significativas quando tratadas com a CL_{50} de tripomastigota (Figura 21C-21D). Na maior concentração de OEEB ($2 \times CL_{50}$ de tripomastigota) a maioria dos parasitas apresentaram perda da organização interna, inchaço da mitocôndria e aparecimento de espaços entre as membranas do núcleo (Figura 21E). Nas células mais drasticamente afetadas não foi possível identificar qualquer organização interna das organelas. A maioria das células apresentava perda de compactação e ruptura do k-DNA (Figura 21F).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de culturas infectadas com *T. cruzi* tratado com o óleo essencial de *Eugenia brejoensis*.



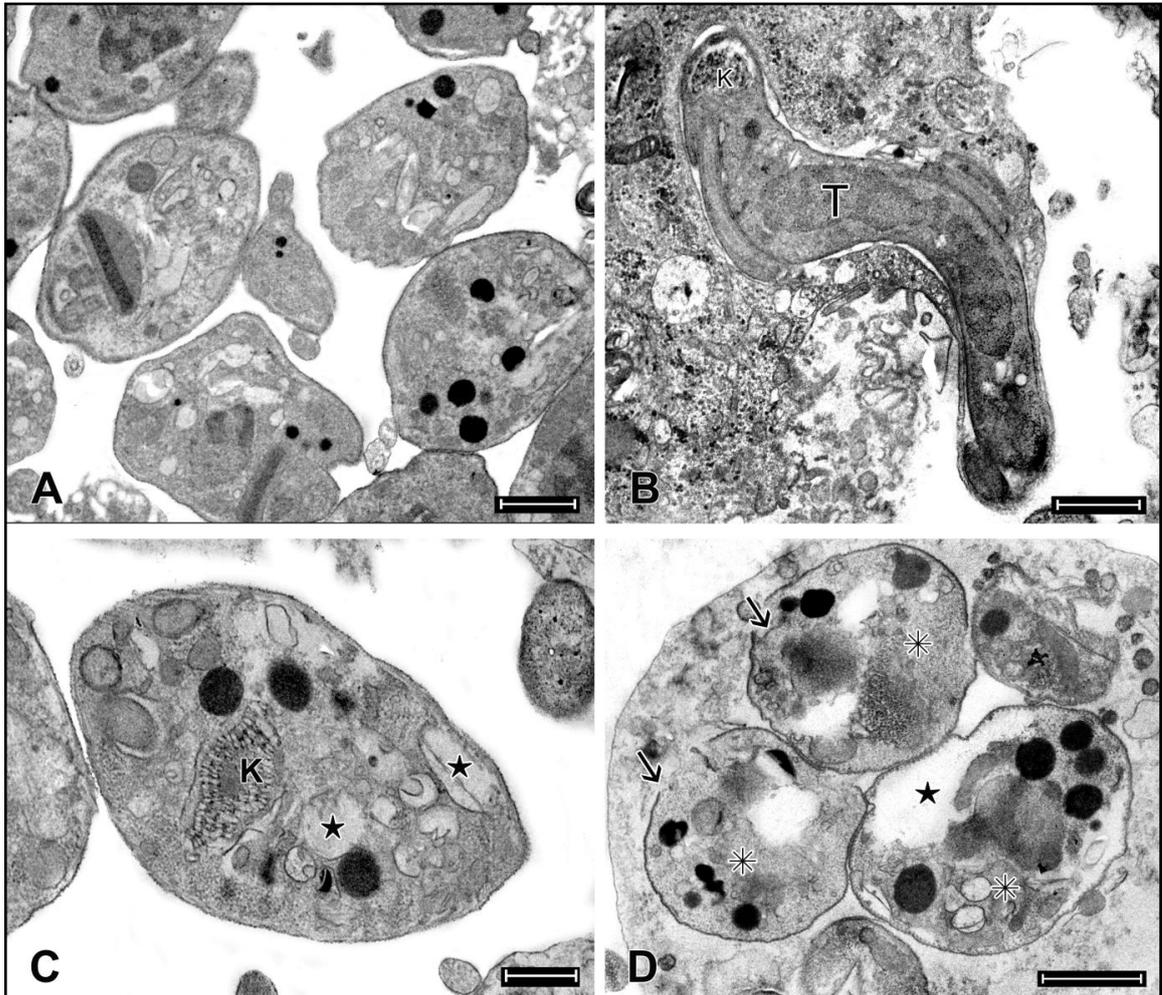
Fonte: A autora.

Legenda: (A-D) Sobrenadante de cultura infectada com *T. cruzi* e tratado com a CL_{50} e (E-F) tratado com a $2x CL_{50}$ do óleo essencial de *Eugenia brejoensis*.

Nota: (A) Aspecto geral do sobrenadante de cultura mostrando a predominância de formas amastigotas morfologicamente alteradas e a presença de debris celulares. (B) Detalhe em maior aumento de formas amastigotas com espaços eletronlucos no citoplasma e perda da organização interna das organelas. (C- D) - Detalhe de uma célula Vero infectada com ultraestrutura preservada, evidenciando o núcleo típico (N) e o citoplasma com formas amastigotas. (D) Maior aumento mostrando em detalhe formas amastigotas com estruturas semelhantes a autofagossoma (seta). (E) Forma tripomastigota drasticamente alterada com inchaço entre os folhetos da membrana nuclear (seta), aumento do volume e desorganização da mitocôndria (m) e perda de material citoplasmático. (F) Forma tripomastigota apresentando perda da compactação do k-DNA (K) e da organização interna do citoplasma. Barras: A e C = 2 μ m; B e D = 1 μ m; E e F = 500 nm.

Alterações similares puderam ser observadas nos parasitas tratados com o OEHP: aparecimento de espaços eletrólucos (Figura 22A), vesículas no citoplasma e desorganização da estrutura do k-DNA (Figura 22C). As formas amastigotas intracelulares, no entanto, mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com 2 x CL₅₀ de tripomastigota do OEHP do que com o OEEB, apresentando amastigotas com ruptura de membrana plasmática e perda de material citoplasmático (Figura 22D). Para o tratamento com ambos os OEs as formas tripomastigotas foram menos afetadas, com um menor número de células alteradas em comparação com as formas amastigotas (Figura 22B).

Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão do sobrenadante de cultura infectada com *T. cruzi* tratado com o óleo essencial de *Hyptis pectinata*.



Fonte: A autora.

Legenda: (A-B) Sobrenadante de culturas tratadas com CL₅₀ e (C-D) com 2 x CL₅₀ do óleo essencial de *Hyptis pectinata*.

Nota: (A) Visão geral do sobrenadante contendo amastigotas livres. (B) Forma tripomastigota (T) invadindo célula Vero. (C) Parasita apresentando desorganização e ruptura da estrutura fibrilar do k-DNA e a presença de vacúolos em todo o citoplasma da célula (estrelas). (D) Detalhe de formas intracelulares (asteriscos) apresentando espaços eletrólucos no citoplasma (estrela) com evidente perda da organização interna e ruptura da membrana (seta). Barras: A-D= 1 µm; B-C =500 nm.

Apesar da maioria das células apresentarem alterações morfológicas significativas não foi possível identificar uma organela alvo específica da ação dos óleos essenciais estudados.

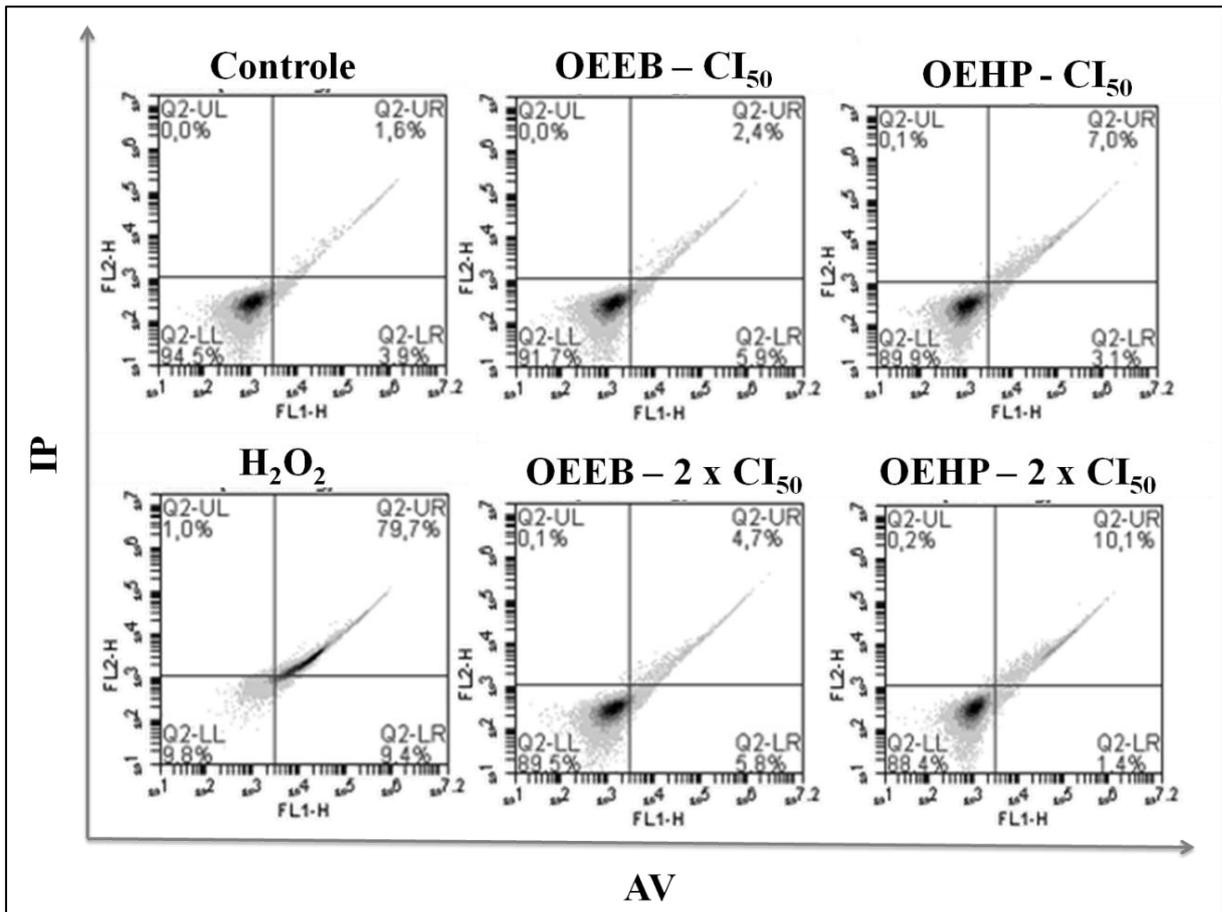
5.5 Avaliação da morte celular induzida pelo tratamento com os óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata*

Para identificarmos o possível mecanismo de morte celular disparado pelos OEs em *T. cruzi*, utilizamos Anexina V-FITC (AV) a qual se liga a fosfatidilserina externalizada nas etapas iniciais de apoptose e o iodeto de propídio (IP), composto fluorescente que se combina com material genético (DNA e RNA) de células cuja a integridade da membrana esteja comprometida.

Devido à praticidade de cultivo e de manipulação, os testes com essas duas sondas foram realizados inicialmente em formas epimastigotas. Como era de se esperar, 94,5% das formas epimastigotas sem tratamento apresentaram negativas para os dois marcadores (AV⁻/IP⁻), indicando que essas células não estavam sofrendo processo de morte celular por apoptose ou necrose. A proporção de células apoptóticas/necróticas não foi superior 5%. Em contrapartida, 79,7% das epimastigotas tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram-se duplo marcadas (AV⁺/IP⁺), sugestivo da perda da viabilidade celular, com comprometimento da integridade da membrana plasmática e morte celular por necrose.

O tratamento das formas epimastigotas com 1x CI₅₀ OEEB não induziu diferenças evidentes no perfil de marcação com AV/IP quando comparados ao controle, com a maioria da população apresentando-se negativa para ambos marcadores (94,5%). Uma pequena porcentagem das células apresentavam o fenótipo apoptótico (5,9%) e 2,4% das células já apresentavam algum grau de comprometimento da integridade da membrana (AV⁺/IP⁺). Um discreto aumento na proporção de células apoptóticas/necróticas em relação ao controle pode ser observado no tratamento com 2x CI₅₀ de OEEB representando aproximadamente 10,6 % do total de células (Figura 23). Resultados semelhantes foram obtidos para o OEHP. O tratamento com esse OE na maior concentração induziu uma proporção de células em processo de morte celular por apoptose/necrose de aproximadamente 11,7 %.

Figura 23 - Análises por citometria de fluxo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP.

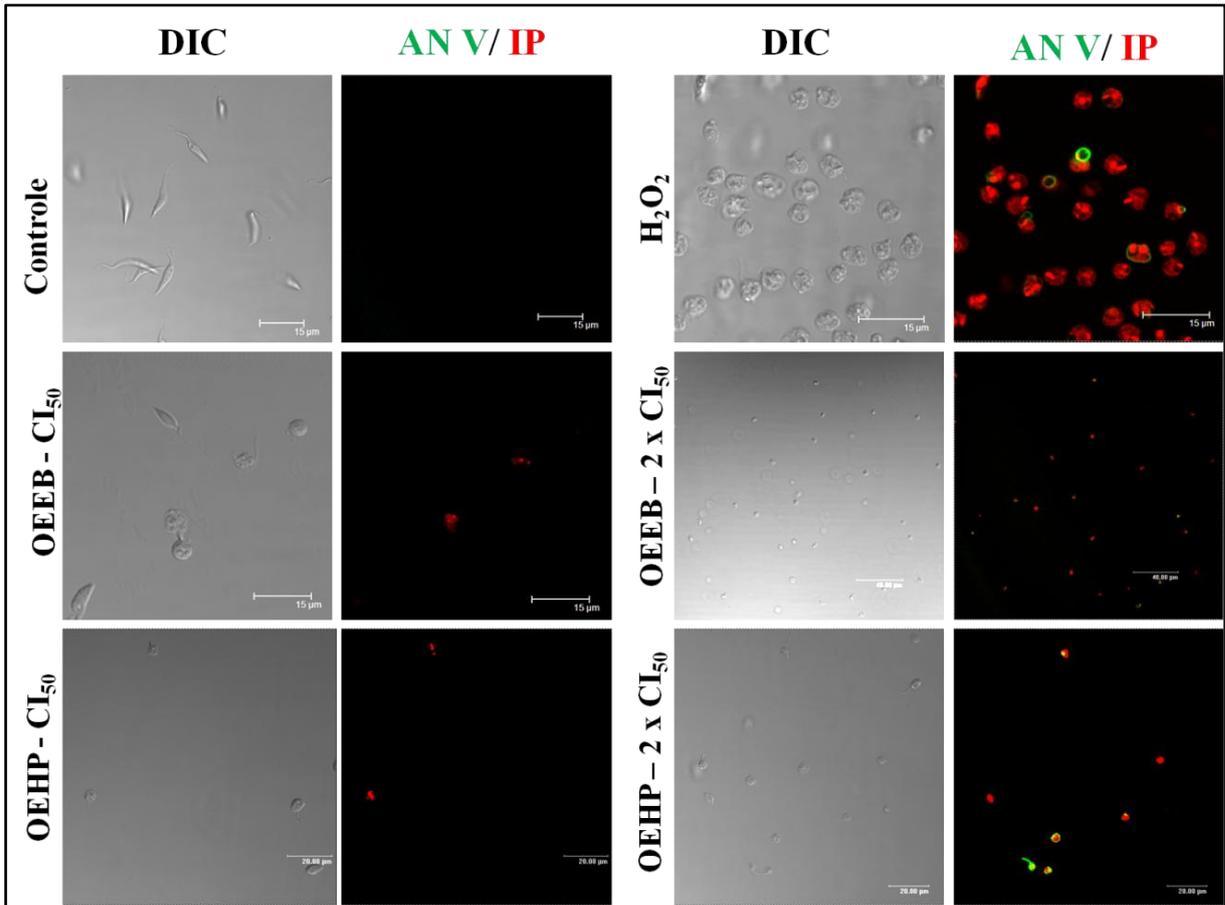


Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CI₅₀, concentração inibitória de 50%; AV, anexina V; IP, iodeto de propídio.

As análises feitas através da microscopia confocal a laser corroboram com esses dados. As imagens obtidas por essa técnica demonstraram a ausência de marcação para ambos marcadores nas células controles e quase a totalidade de células marcadas com IP no tratamento com H₂O₂. Através de contraste diferencial de interferência foi possível observar que as células do controle apresentavam forma alongada e movimentos típicos. Discreta marcação com AV e IP pode ser observada nas células tratadas com ambos os OEs, as quais estavam morfologicamente alteradas e na sua maioria imóveis (Figura 24).

Figura 24 - Análises por microscopia confocal a laser de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP.

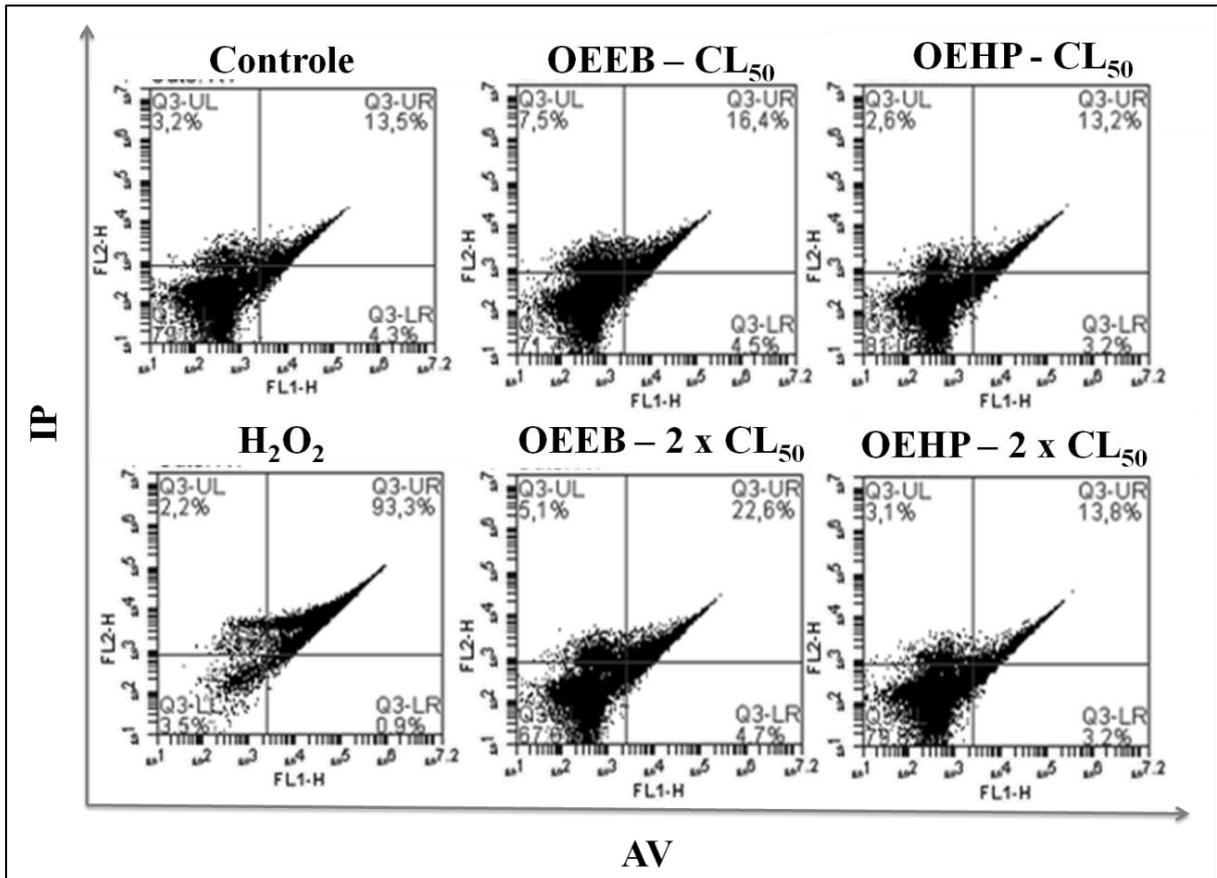


Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CI_{50} , concentração inibitória de 50%; AN V, anexina V; IP, iodeto de propídio; DIC, contraste diferencial de interferência.

Tendo em vista que a tripomastigota é a forma infectiva para o hospedeiro vertebrado, também realizamos o ensaio com AV/PI em células coletadas do sobrenadante de cultura infectadas. A análise de citometria de fluxo destas células demonstrou que 79% dos parasitas controles livres obtidos do sobrenadante da cultura de células Vero infectadas, apresentavam-se negativos para ambos marcadores (AV^-/IP^-). Já as células tratadas com H_2O_2 , controle positivo de marcação, apresentaram uma proporção de 93,3 % AV^+/IP^+ . Células tratadas com o OEEB e o OEHP não apresentaram aumento relevante na proporção de morte celular em relação ao controle. As maiores proporções de morte celular foram obtidas para o OEEB, cerca de 1,35 e 1,5 vezes maior do que as células controle, para as concentrações correspondentes a CL_{50} e $2x CL_{50}$, respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Análises por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com AV/ IP.



Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CL₅₀, concentração de lise de 50%; AN V, anexina V; IP, iodeto de propídio; DIC, contraste diferencial de interferência.

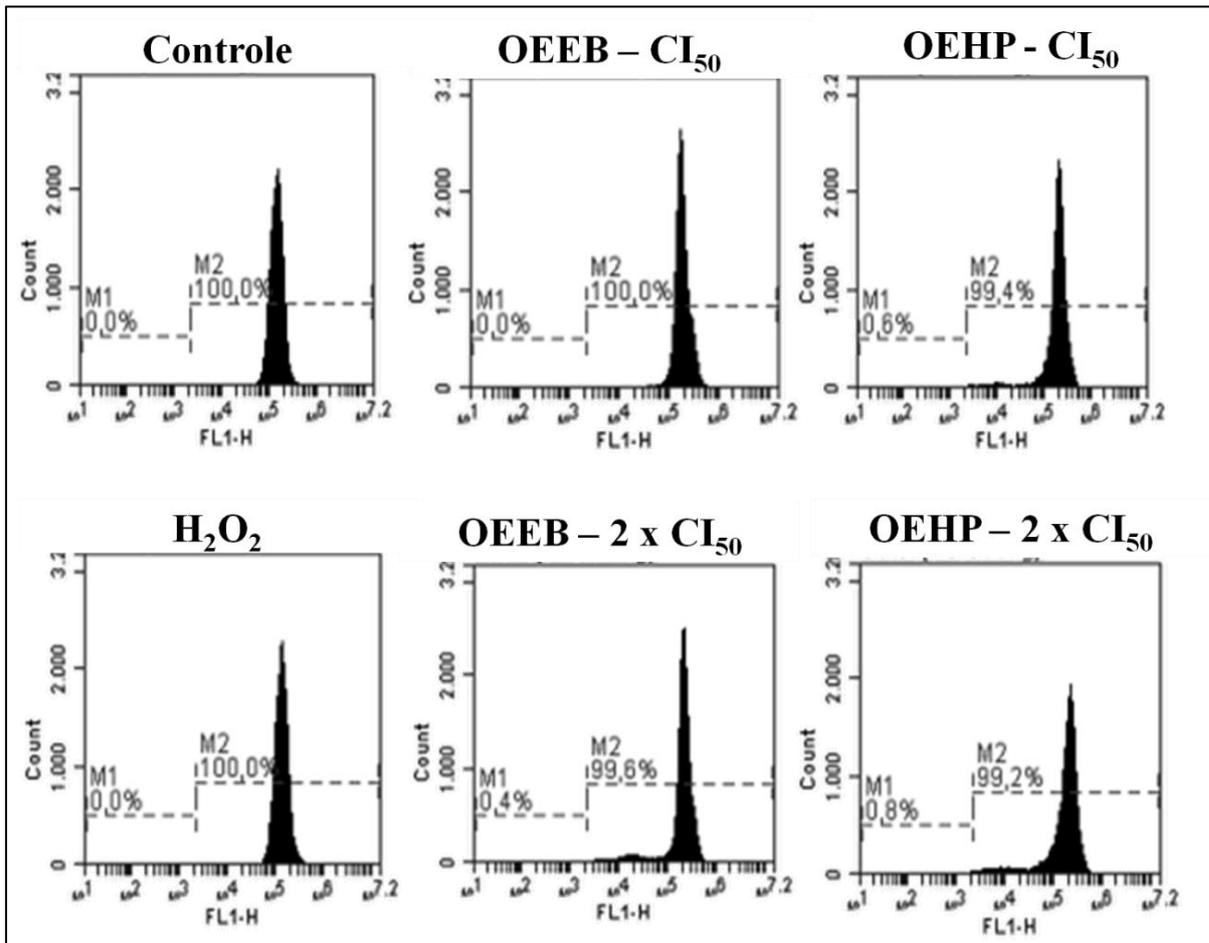
5.6 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata* sobre o potencial de membrana mitocondrial

Para avaliarmos se o tratamento com os OEs era capaz de induzir alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), células tratadas e controles foram submetidas à marcação com rodamina 123 (Rho 123). Este fluorocromo é um composto lipofílico catiônico que se concentra em mitocôndrias ativas permitindo analisar o estado do potencial eletroquímico desta organela (CORONA et al., 2014).

Formas epimastigotas controles apresentaram marcação para Rho 123, evidenciando que o $\Delta\psi_m$ apresentava-se preservado nestas células. O tratamento das células com os ambos os OEs causaram deslocamento do histograma para direita indicativo de um aumento na intensidade de marcação para este marcador (Figura 26). Tal variação pode ser melhor demonstrada através do índice de variação (IV). Valores negativos de IV indicam que houve

perda do potencial da mitocôndria, enquanto valores positivos indicam hiperpolarização da membrana mitocondrial. Desta forma, os valores de IV para formas epimastigotas foram de +0,090 a +0,315 para o OEEB e para o OEHP +0,320 a +0,271 respectivamente para CI_{50} e $2x CI_{50}$ (Tabela 4). Através da microscopia confocal a laser, tanto as células controles quanto as tratadas apresentaram intensa marcação no canal verde em regiões correspondente a mitocôndria e ao cinetoplasto (Figura 27).

Figura 26- Análises por citometria de fluxo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123.



Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CI_{50} , concentração inibitória de 50.

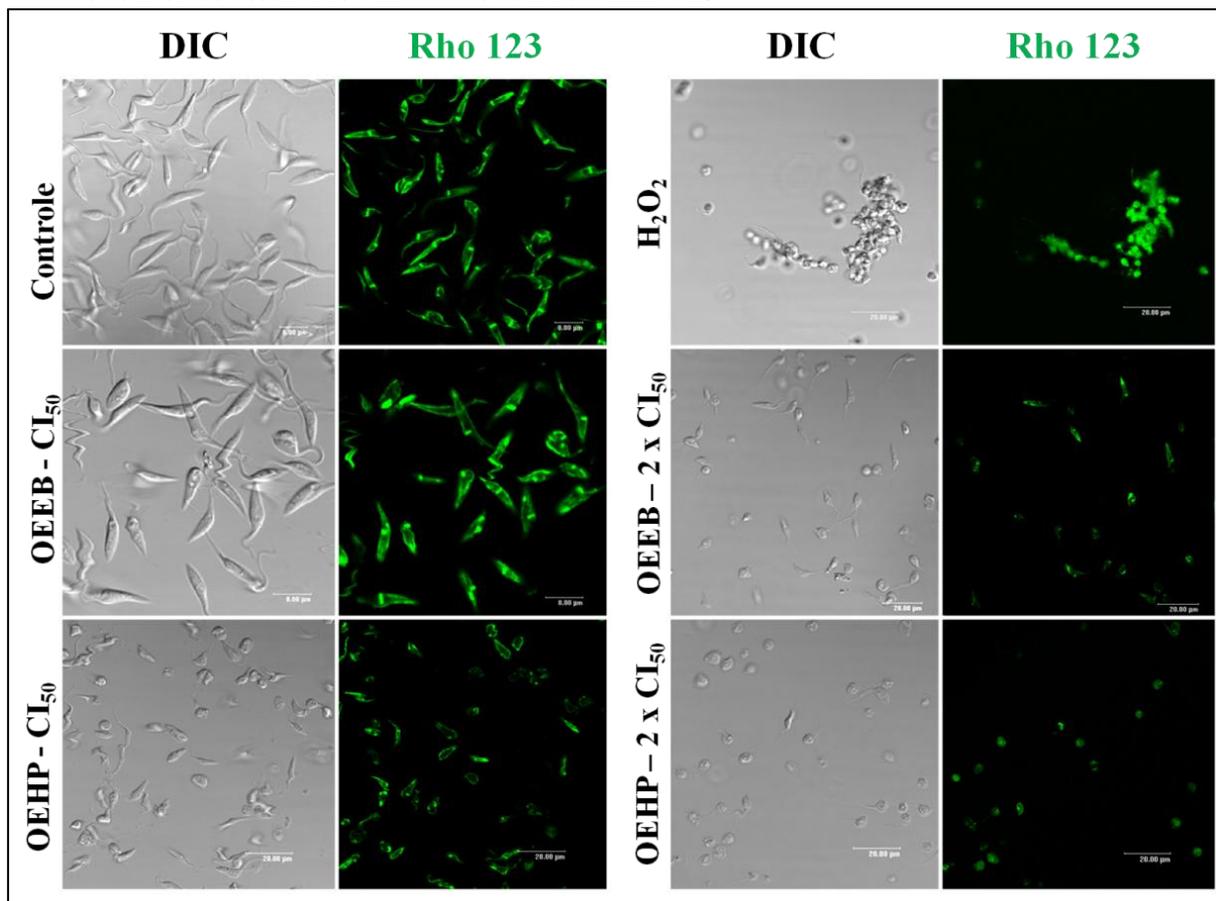
Tabela 4 - Análise através da citometria de fluxo dos efeitos dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas e tripomastigotas utilizando rodamina 123

Óleo essencial	Epimastigota			Tripomastigota		
	µg/mL	Mediana	IV	µg/MI	Mediana	IV
Controle	0	165572,5	0	0	25667,0	0
EB	29	180358,5	+0,090	18	66503,0	+1,591
	58	217689	+0,315	36	112804,0	+3,395
HP	56	218441	+0,320	25	115180,5	+3,487
	112	210553,5	+0,271	50	59504,0	+1,318

Fonte: A autora.

Legenda: IV= $(MT - MC) / MC$, onde MT é a mediana da fluorescência para parasitos tratados e MC para parasitos controles; EB, *Eugenia brejoensis*; HP, *Hyptis pectinata*; IV índice de variação.

Figura 27 - Análises por microscopia confocal a laser de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123.

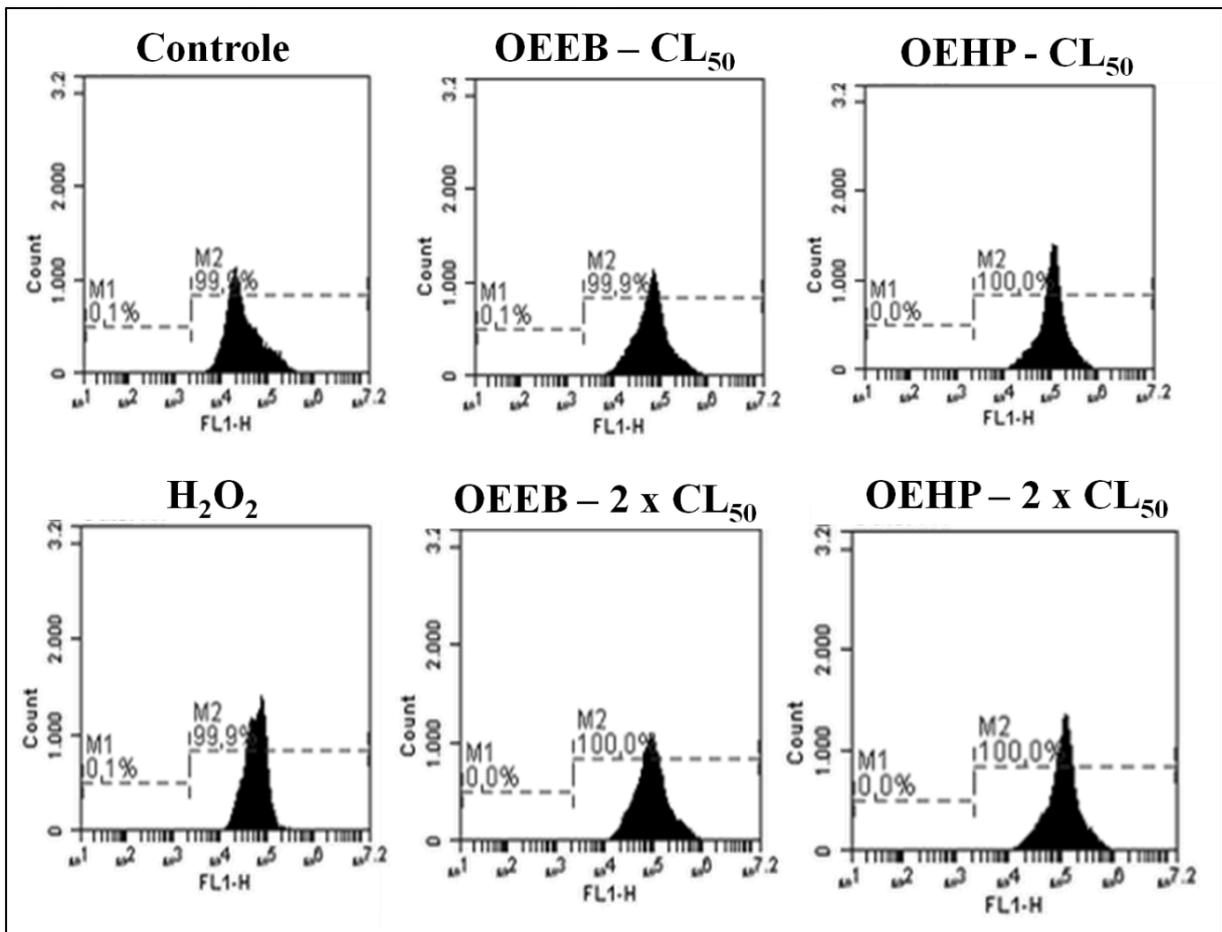


Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CI₅₀, concentração inibitória de 50%; Rho 123, rodamina 123; DIC, contraste diferencial de interferência.

As formas tripomastigotas tratadas com OEEB e OEHP foram mais sensíveis às variações no $\Delta\psi_m$ do que as formas epimastigotas apresentando um maior deslocamento para direita no histograma devido ao aumento na intensidade de fluorescência para Rho 123 (Figura 28). Estas diferenças foram confirmados pelos valores positivos do índice de variação (IV) de +1,59 e +3,39 para células tratadas com a CL_{50} e $2x CL_{50}$ de OEEB; e +3,49 a +1,32 para CL_{50} e $2x CL_{50}$ do OEHP respectivamente (Tabela 4).

Figura 28 - Análise por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com rodamina 123.



Fonte: A autora.

Legenda: OEEB, óleo essencial de *Eugenia brejoensis*; OEHP, óleo essencial de *Hyptis pectinata*; CL_{50} , concentração de lise de 50.

Para avaliar se a considerável hiperpolarização encontrada nas formas tripomastigotas (valores positivos de IV) poderia estar relacionada ao aumento na produção de radicais superóxidos (SO) nesta organela, tripomastigotas controles e tratadas foram marcadas com MitoSOX. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com OEEB nas concentrações correspondente a CL_{50} e $2xCL_{50}$, apresentaram incremento na intensidade de fluorescência

quando comparado ao controle sem tratamento, sendo desta forma, indicativo da produção de superóxidos mitocondriais por essas células (tabela 5).

Tabela 5 - Análises por citometria de fluxo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com óleos essenciais e marcadas com MitoSoxRed.

Óleo essencial	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Mediana
Controle	0	1309,0
EB	18	1429,0
	36	1424,5
HP	25	1264,0
	50	1328,0

Fonte: A autora.

Legenda: EB, *Eugenia brejoensis*; HP, *Hyptis pectinata*.

6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas, causada pelo tripanosomatídeo *T. cruzi*, acarreta mais de 10.000 mortes/ano em todo o mundo devido ao comprometimento das funções do coração e do trato gastrodigestivo em indivíduos infectados (PEREIRA; NAVARRO, 2013). Apesar de ter sido descoberta há mais de um século, não existe uma vacina para esta patologia e a quimioterapia baseada em drogas altamente tóxicas, como o benzonidazol e o nirfutimox, permanece como única alternativa no tratamento desta doença. Estas drogas, introduzidas há mais de 50 anos, requerem longo tempo de tratamento e possuem eficácia questionável na fase crônica da doença (BERMUDEZ et al., 2016). Aliado a estes fatores, esta doença é altamente negligenciada, afetando geralmente uma parcela da população residente em áreas onde o acesso ao sistema de saúde é precário (DIAS et al., 2016). Dessa maneira, torna-se imprescindível a busca por alternativas mais eficazes e com menor custo associado para o tratamento desta patologia (BEAUMIER et al., 2016).

Plantas medicinais fornecem uma série de compostos com comprovadas atividades biológicas contra vários parasitas (HAMEDT et al., 2014). Até o presente momento, mais de 80% da população global depende de remédios obtidos de produtos naturais para tratar vários problemas de saúde (SWAMY et al., 2016). Além do mais, cerca de 80% de 122 drogas derivadas de plantas mostraram-se relacionadas ao seu objetivo etnofarmacológico original (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). Dentre os produtos naturais, os OEs de plantas medicinais são alternativas promissoras, por possuírem compostos que podem ser utilizados como protótipos para a síntese de novos agentes quimioterápicos contra diversas patologias, devido às características singulares dos seus constituintes, os quais são moléculas pequenas e lipofílicas capazes de interagir e/ou atravessar a membrana exercendo seus efeitos em alvos intracelulares essenciais para a sobrevivência dos parasitas (DHIFI et al., 2016). Neste sentido, vários OEs têm demonstrado atividade contra tripanosomatídeos parasitas incluindo o *T. cruzi* (BORGES et al., 2012; SANTORO et al., 2007a, 2007b, 2007c). No presente trabalho, analisamos a composição química e a atividade tripanocida dos OEs de *E. brejoensis* (OEEB), *H. fruticosa* (OEHF), *H. pectinata* (OEHP), *L. macrophylla* (OELM), *H. salzmännii* (OEHS) e *S. coronata* (OESC) provenientes do Bioma da Caatinga e utilizadas na medicina tradicional.

A análise química dos OEs de EB, LM, HS, HP e HF mostrou uma grande diversidade de compostos. Ao total 163 foram identificados, os quais em sua maioria pertencem à classe do monoterpenos e sesquiterpenos. Muitas destas moléculas existem em baixas

concentrações, enquanto outras são encontradas em concentrações superiores a 70% do total do OE, sendo estes compostos majoritários geralmente os responsáveis pela atividade biológica atribuída a estes OEs (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Geralmente monoterpenos e sesquiterpenos, bem como suas formas oxigenadas, são os principais compostos responsáveis pela atividade dos OEs, embora diterpenos e fenilpropanoides possam ser encontrados com relativa frequência. Ainda que os sesquiterpenos sejam moléculas maiores, a estrutura e as propriedades funcionais são semelhantes aos monoterpenos (RUBERTO; BARATTA, 2000). No entanto, a análise química do OESC, obtido a partir da semente desta planta mostrou que a totalidade de seus componentes era derivada do metabolismo de ácidos graxos. Neste OE os ácidos octanóico (38,83%) dodecanóico (38,45%) e decanóico (20,51%) foram os principais componentes encontrados. Belviso et al. (2013) também identificaram o ácido octanóico como o principal composto volátil do OE das sementes do *Syagrus coronata*. No entanto, estes mesmos autores encontraram a presença de outros compostos tais como γ - e δ - lactonas, derivadas do anabolismo de ácidos graxos que não foram encontrados em nossa preparação. Estas diferenças podem ser devido à utilização de métodos de extração distintos para obtenção deste OE.

Tem sido relatado na literatura que compostos terpênicos na sua forma oxigenada (terpenóide) normalmente possuem maior atividade biológica do que os hidrocarbonados (SWAMY et al., 2016). Desta forma, a presença de sesquiterpenóides no OEEB (38,65%) e no OELM (85,18%) pode ter contribuído para a atividade tripanocida, especialmente para o OEEB. A composição química do OE de uma planta pode variar dentro de uma mesma espécie em virtude de fatores como a localização geográfica, o ambiente, o estágio de maturidade, o repertório genético, mudanças sazonais, entre outras. Estas diferenças podem refletir na atividade destes OEs e, portanto, não devem ser negligenciadas (KUMARI et al., 2014; SWAMY et al., 2016). Além disso, as propriedades estereoquímicas de um OE também variam dependendo do método de extração (SWAMY et al., 2015). Em nosso estudo encontramos δ -cadineno (15,88%), trans-cariofileno (9,77%) e α -Muurolol (9,42%) como principais constituintes do OEEB. Os mesmos compostos foram identificados por Silva et al. (2015) para esta planta. No entanto, a abundância relativa destes constituintes diferiu da encontradas para o nosso OE, correspondendo a 22,6%, 14,4% e 9,34% para δ -cadineno, trans-cariofileno e o α -Muurolol, respectivamente. Embora tanto os nossos espécimes de *E. brejoensis* quanto os utilizados no estudo de Silva et al. (2015) tenham a mesma origem, a

variação da composição encontrada para esses OEs pode ter ocorrido devido as diferentes épocas do ano em que estas amostras foram coletadas.

A maior parte dos estudos sobre a atividade biológica de OEs sobre microrganismos patogênicos tem sido realizada em bactérias, fungos e vírus. No entanto, devido às suas atividades promissoras sobre protozoários, nos últimos anos tem crescido o interesse por pesquisas sobre a atividade de OEs como agente quimioterápico no tratamento da doença de Chagas (PIĄTKOWSKA et al., 2016).

Drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas como o benzonidazol e o nifurtimox causam severos danos devido a sua alta citotoxicidade para células de mamíferos. Desta forma, estabelecer o potencial citotóxico dos OEs é importante, considerando o seu uso como um agente alternativo no tratamento da DC (MOHMOD et al., 2015). Nossos resultados mostraram que todos os OEs estudados, com exceção do OESC foram em geral bem tolerados pelas células de mamífero com moderada citotoxicidade (valores de CC_{50} entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) (RIOS et al., 2008). Entre os OEs avaliados o OELM foi o menos tóxico ($CC_{50} = 400,66 \mu\text{g/mL}$) e o mais tóxico foi o OESC ($CC_{50} = 244,22 \mu\text{g/mL}$). Apesar da moderada toxicidade apresentada pelos OEs sobretudo o OESC, todos foram consideravelmente muito menos tóxicos do que a droga de referência, benzonidazol.

A atividade hemolítica (AH) tem sido extensivamente utilizada para avaliar o potencial de drogas em causar danos a membrana plasmática de células (COSTA-LOTUFO et al., 2002; ZOHRA; FAWZIA, 2014). Além do mais, a susceptibilidade de hemácias ao tratamento com um determinado composto contribui para sua citotoxicidade. A anfotericina B, usada no tratamento da leishmaniose, por exemplo, induz cerca de 50% de hemólise na concentração de 50,8 μM (RODRIGUES et al., 2014). Em nosso estudo nenhum dos OEs apresentou AH em concentrações inferiores a 125 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento na AH para os OEs de HS, HP e EB. Interessantemente, exceto para o OEEB, não foi possível em nosso estudo correlacionar a citotoxicidade dos OEs à sua atividade hemolítica. Por exemplo, o OESC foi considerado o segundo OE mais tóxico, mas foi o que apresentou menor AH entre os OEs testados na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Tem se demonstrado que o ácido octanóico, principal constituinte do OESC tem apresentado efeitos controversos sobre células e tecidos de mamíferos. Por exemplo, este ácido tem sido comumente utilizado como estabilizante de proteínas no processo de preservação de embriões. No entanto, estudos têm demonstrado que a depender da concentração e as condições do meio, este ácido pode levar ao rompimento do metabolismo energético e induzir estresse oxidativo nas células *in vitro*, além de apresentar efeito embriotóxico (LEONARD et

al, 2013). Por outro lado os efeitos benéficos do ácido octanóico também têm sido reportados, de acordo com Kim e Rhee (2015, 2013) a atividade antimicrobiana do ácido octanóico se deve a sua ação deletéria sobre a membrana plasmática de bactérias. A alta afinidade dos ácidos octanóico e dodecanóico pela membrana plasmática de patógenos tem sido usada para aumentar a ação de compostos antimicrobiano e antitumoral. Desta forma, futuras investigações são necessárias para melhor compreender os efeitos citotóxicos do OESC.

O potencial tripanocida dos OEs de plantas da Caatinga foi avaliado sobre todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Nossos resultados demonstraram que todos os OEs testados foram mais eficazes comparados com a droga de referência, o benzonidazol, sendo o OEEB o mais efetivo contra as formas epi-, triplo e amastigota do parasita. A atividade relevante deste OE sobre estas últimas formas constitui uma vantagem, já que estas formas são as responsáveis pela infecção e manutenção da doença em hospedeiros vertebrados.

É compreendido na literatura que qualquer droga pode ser citotóxica para células de mamífero, a depender da concentração utilizada. No entanto, muitas vezes a concentração de um composto capaz de causar danos às células do hospedeiro é infinitamente maior do que aquela apropriada para eliminar o parasita, contribuindo para a cura da patologia associada a este composto. Desta forma a citotoxicidade dos OEs em células de mamífero foi comparada com a atividade tripanocida através do índice de seletividade (ISE). Valores altos do ISe indicam que a droga é mais seletiva contra o parasita (SILVA-JÚNIOR et al., 2014). Nossos resultados indicam que os OEs de EB e HP foram os mais efetivos contra formas clinicamente relevantes do parasita (tripomastigota e amastigota) com índices superiores a 10, enquanto OESC devido a sua citotoxicidade e baixa atividade tripanocida, foi o menos efetivo entre os OEs testados.

A citotoxicidade de OEs contra protozoários, bem como a relação entre a atividade dos OEs e seus constituintes tem sido demonstrada na literatura (BARROS et al., 2016, BORGES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009; SANTORO et al., 2007). Em nosso estudo, identificamos o trans-cariofileno como um dos principais compostos dos OEs que apresentaram melhores valores de ISe para tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. As atividades bactericida (BERNADES et al., 2010), antifúngica (KIM; PARK, 2012) e tripanocida (IZUMI et al., 2012) deste composto já foram descritas na literatura. Estudo realizado *in vitro* demonstrou que o trans-cariofileno foi 26,9 vezes mais tóxico para amastigotas de *T. cruzi* em relação às células de mamífero. Em tripomastigota, o trans-cariofileno alterou a permeabilidade da membrana celular, causou perda do potencial da membrana mitocondrial e desorganização do cinetoplasto, levando o parasita a morte (IZUMI

et al., 2012). Além do mais, o trans-cariofileno isolado apresentou baixa citotoxicidade contra células LLCMK2. Esse composto também apresentou atividade anti-inflamatória, assim como propriedades leishmanicida e antimalárica (DE SOUZA et al., 2017).

O OEEB, que teve o maior ISe para as formas tripomastigota e amastigota, apresentou o δ -cadineno como componente majoritário. Este sesquiterpeno foi reportado ter atividade antitumoral em células de câncer de ovário. Nestas células este composto foi capaz de induzir a cascata apoptótica e necrose (HUI et al., 2015). Estudos prévios realizados por Costa et al. (2013) identificaram o δ -cadineno como principal componente de *Annona salzmannii* responsável pelas atividades antitumoral e tripanocida desta planta. A citotoxicidade obtida para células Vero, por estes autores, foi similar a encontrada para o OEEB em células do exsudato peritoneal no presente estudo. δ -cadineno isolado do extrato bruto de *Ocimum sanctum* também demonstrou atividade leishmanicida (ZHELJAZKOV et al., 2008). O OE de *Lippia dulcis*, o qual possui δ -cadinene (8,8%) e trans-cariofileno (10,4%) como componentes majoritários, demonstrou atividade e especificidade contra formas epimastigotas de *T. cruzi* com CI_{50} de 32,2 μ g/mL (ESCOBAR et al., 2010). O δ -cadineno também possui atividade larvicida frente ao *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (GOVINDARAJAN et al., 2016).

O OEHS apresentou uma chalcona, a xantoxilina, como seu principal constituinte. Embora não seja muito comum em OEs, esta classe de moléculas apresenta versatilidade sintética, baixa toxicidade, atividade leishmanicida e tripanocida (LUNARDI et al., 2003). Compostos estruturalmente relacionados às chalconas apresentaram ação tripanocida por atuarem como inibidores da cruzafina de *T. cruzi* (BORCHHARDT et al., 2010). A xantoxilina foi o principal constituinte isolado de *Sebastiania schottiana* com atividade antifúngica (PINHEIRO et al., 1999). Este composto também é usado como matéria prima na síntese de moléculas bioativas, especialmente na obtenção de chalconas com atividade anti-plasmódio e leishmanicida (BOECK et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2006).

No nosso estudo, o OELM apresentou o timol (49,81%) e o seu isômero carvacrol (31,62%) como os seus principais componentes. Esses constituintes são frequentemente identificados em espécies do gênero *Lippia* (CARVALHO et al., 2013) como possuidores de atividade leishmanicida e tripanocida (BORGES et al., 2012; CARVALHO et al., 2013, ESCOBAR et al., 2010). Timol foi efetivo contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células de linhagem Vero infectadas, com índice de seletividade de 11,8 (ESCOBAR et al., 2010). Em leveduras, o timol e o carvacrol causaram perda de permeabilidade da membrana plasmática e alteraram a via de biossíntese do ergosterol (AHMAD et al., 2011). Semelhante

aos fungos, a membrana celular dos tripanosomatídeos contem ergosterol, que atua regulando a fluidez da membrana e contribui para a organização dos domínios membranares (MCCALI et al., 2015). Os OEs de *L. sidoides* e *L. origanoides* analisados por Borges et al. (2012) apresentaram respectivamente 78,4% e 22,4% de timol e foram ativos frente a todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, sendo o OE de *L. sidoides* 18,7 e 4,6 vezes mais seletivo para tripomastigota e amastigota, respectivamente quando comparados às células de mamífero. O OELM analisado no nosso estudo mostrou ser mais seletivo para amastigota (7,7) do que os OEs das espécies de *Lippia* analisados por Borges et al. (2012), provavelmente pela ação sinérgica entre o carvacrol e o timol com outros constituintes do OELM. A presença de grupamentos hidroxil no carvacrol e no timol confere a estas moléculas uma maior hidrofobicidade auxiliando na ação destes compostos sobre a membrana plasmática de patógenos tais como bactérias, fungos e protozoários. Entretanto Santoro et al. (2007) reportou que o efeito do timol sobre o *T. cruzi* ocorre principalmente devido sua interação com as vias metabólicas ou organelas do que sobre a sua atuação direta na membrana do parasita.

Embora a atividade biológica de um OE seja atribuída aos seus compostos majoritários, não se pode descartar a possibilidade de que outros constituintes menos abundantes sejam mais efetivos do que seu composto principal (YAP et al., 2014). Nesse sentido, é importante considerar que a atividade destes OEs seja o resultado de interações de sinergismo, antagonismo ou aditivo entre todos os seus componentes (BASSOLÉ; JULIANI, 2012, YAP et al., 2014). De fato Zheljzakov et al. (2008) demonstraram que δ -cadinene encontrado em pequenas quantidades no OE isolado do *Ocimum basilicum* possui efeito contra *Leishmania donovani*. Por outro lado, os mesmos autores relataram que compostos majoritários como (-)-linanol, eugenol e metilchavicol de *O. basilicum* e *O. sanctum* não tiveram qualquer atividade leishmanicida quando testados isoladamente.

Nossos resultados apontam que o OESC foi o único OE testado que apresentou seletividade para tripomastigotas (1,38) menor que a encontrada para o benzonidazol, além disto, não foi seletivo para as formas intracelulares de *T. cruzi* (0,6). Não existem relatos da atividade tripanocida dos compostos majoritários deste OE na literatura.

A diversidade na estrutura e nas propriedades bioquímicas, ciclos de vida e mecanismos de resistência de protozoários parasitas são responsáveis por disparar diferentes respostas no sistema imune do hospedeiro vertebrado. Muitas infecções por protozoários podem se tornar crônicas devido à habilidade do parasita de evadir da resposta imune inata e/ou apresentar resistência à resposta imune adaptativa. Com isto, muitas drogas

antiparasitárias não são eficientes no combate destes microrganismos (MONZOTE et al., 2012).

Neste cenário, várias pequenas moléculas, incluindo os constituintes de OEs, mostraram exibir atividade imunomoduladora. Por exemplo, Özek et al. (2017) relataram que OEs possuem atividade imunomoduladora sobre fagócitos, a qual depende da fonte e da composição. A ação de alguns OEs sobre as células do sistema imune pode ser útil no tratamento de doenças infecciosas. Tanto sua ação inflamatória (para o combate de patógenos intracelulares) quanto o efeito anti-inflamatório (protegendo o hospedeiro contra componentes da resposta inflamatória exacerbada) contribuem no controle destas infecções (MONZOTE et al., 2012).

As CEPs infectadas com *T. cruzi* produziram elevados níveis de TNF- α , IL-10 e óxido nítrico (ON) em relação à produção basal, e mantiveram IFN- γ ao nível basal. No trabalho realizado por Roggero et al. (2012) durante a infecção aguda por *T. cruzi*, camundongos BALB/c aumentaram gradualmente as concentrações séricas de TNF- α , IL-10 e ON (7, 14 e 21 dias após infecção) em contrapartida o IFN- γ só foi detectado 14 dias após infecção, sendo resultados semelhantes encontrados na infecção de camundongos C57BL/6. Camundongos albinos swiss infectados com a cepa Y apresentaram elevados níveis de IL-10 a partir do 7º dia de infecção e TNF- α a partir do 10º dia de infecção (PUPULIN et al., 2016).

No início da infecção pelo *T. cruzi*, citocinas pró-inflamatórias (perfil Th1) são produzidas com a finalidade de conter a infecção, enquanto as citocinas do perfil Th2 (anti-inflamatórias), como IL-10, quando produzidas em elevadas concentrações, favorecem a susceptibilidade da infecção (KUMAR; TARLETON et al., 2001). As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α ativam macrófagos a produzirem ON. Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o ON modula direta ou indiretamente o mecanismo efetor de células de defesa, podendo atuar com efeitos microbicidas pelos seus derivados tóxicos; e regular/aumentar a resposta inflamatória induzida no período de infecção. Estas ações estão relacionadas com a concentração do ON, entretanto altas concentrações de ON podem causar toxicidade em células hospedeiras, auto-imunidade e persistência do parasita em decorrência da evasão imunológica. O ON atua diretamente no *T. cruzi* por alterar quimicamente proteínas que medeiam importantes processos metabólitos (GUTIERREZ et al., 2009).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por macrófagos. Embora o mecanismo de produção desta citocina não seja claro, sabe-se que é mediado pelas citocinas IL-12, IL-6, TGF- β e IL-27. A IL-10 regula negativamente a produção de IFN- γ e TNF- α , suprimindo desta forma a produção de ON. Neste contexto, a IL-10 reduz a

capacidade das células do sistema imune inato em conter os agentes patogênicos (CYKTOR; TURNER, 2011).

Os OEs de *E. brejoensis*, *H. pectinata* e *H. salzmannii* que apresentaram os maiores índices de seletividade para amastigotas de *T. cruzi* e menores concentrações inibitórias de 50% para forma evolutiva, praticamente não alteraram a produção de citocinas por CEPs em relação ao controle infectado. Logo, podemos supor que a ação tripanocida frente a esta forma evolutiva deve ter ocorrido principalmente pela ação direta dos componentes dos OEs. Em contrapartida, os OEs de *H. fruticosa*, *L. macrophylla* e *S. coronata* que apresentaram para formas amastigotas ISe menor que 7,7 e CI₅₀ de amastigota maior que 51,76 µg/mL, reduziram a produção de IL-10, citocina que regula a resposta inflamatória. Esta redução de IL-10 pode modular a resposta imune frente à infecção favorecendo a atuação de citocinas pró-inflamatórias para reduzir a infecção por formas intracelulares de *T. cruzi*. No caso do OESC houve aumento na produção de TNF- α em relação ao controle infectado. Contudo, mais estudos devem ser realizados para caracterizar melhor o perfil imunomodulador dos óleos essenciais estudados.

Na doença de Chagas em humanos, a ativação de macrófagos e células NK para produção de citocinas e moléculas efetoras, bem como a produção de anticorpos por células plasmáticas, levam ao controle dos níveis parasitários, os quais são observados nos estádios tardios da fase aguda e durante toda a fase crônica. A produção de moléculas anti-inflamatórias, principalmente a produção de IL-10, influencia o controle da resposta imune, diminuindo o dano tecidual e permitindo que a doença progrida para a fase crônica. Existem evidências de que a predominância de um ambiente inflamatório durante a fase crônica está associada a formas sintomáticas (cardíacas e digestivas), enquanto que o predomínio do ambiente antiinflamatório está correlacionado à manutenção da forma indeterminada (ANDRADE et al., 2014). Desta forma, nossos resultados apontam que o OESC apresentou resultado promissor na alteração de produção de citocinas importantes na fase aguda da doença, entretanto, seus resultados não são interessantes na fase crônica da doença, uma vez que pode favorecer ao surgimento das formas sintomáticas da doença.

A composição química do OE influencia diretamente sua ação na produção de citocinas e/ou na modulação de expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (MIGUEL, 2010). O componente majoritário geralmente define a atividade biológica do OE ou pode ser modulado por componentes em menores quantidades (RAMOS et al., 2013).

Estudo prévio demonstrou que em ensaios *in vitro*, o trans-cariofileno (um dos compostos majoritários dos OEs de EB, HF, HP e HS) inibiu a produção de óxido nítrico (ON) mediada por INF- γ ; e teve ação citotóxica seletiva para as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp. e *T. cruzi* em macrófagos (SOARES et al., 2013). Nossos resultados mostraram que o OEHF, o qual apresentou 15,24% trans-cariofileno, diminuiu significativamente a produção de ON em relação ao controle infectado não tratado. O OEHP que apresentou o maior percentual de trans-cariofileno (30,91%) não apresentou alterações estatisticamente significantes na produção desta espécie reativa de oxigênio, devido possivelmente à ação de outros componentes deste OE.

De acordo com Chang et al. (2013), o trans-cariofileno exibe uma potente atividade neuroprotetora dose-dependente relacionada à regulação de mediadores inflamatórios como IL- β , IL-6, ciclo-oxigenase 2, óxido nítrico e prostaglandina E2. Em adição, além de atuar como anti-inflamatório, o trans-cariofileno é agonista do CB-2, age bloqueando sistemas opioídes e colinérgicos (RAYMUNDO et al., 2011).

Foi possível observar que o OELM apresentou ação imunomoduladora com a redução de produção de citocinas envolvidas com o perfil Th1 e Th2 (TNF- α , IL-6, IL-10), bem como a redução da produção de ON. O TNF- α desempenha papel imunoregulador e na infecção pelo *T. cruzi* atua como tripanocida por induzir a produção de ON. Porém, em quantidades exacerbadas o ON pode ser tóxico para células de mamífero (PISSETTI et al., 2011).

A IL-6 é uma citocina inflamatória com ação pleiotrópica que medeia funções fisiológicas, dentre as quais, proliferação celular e sobrevivência celular. Na infecção por *T. cruzi* desempenha papel na proteção de cardiomiócitos (PONCE et al., 2013).

De acordo com Alavinezhad e Boskadaby (2014), os OEs ricos em timol e carvacrol possuem atividade anti-inflamatória por reduzirem a produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-8 e IL-1 β ; inibirem a produção de ON; e estabelecerem um equilíbrio na resposta imune do perfil Th1 e Th2. *In vivo* o carvacrol reduziu a produção de TNF- α , IL-6 e ON em sepse induzida por LPS (KARA et al., 2014). Recentemente Gholijani e Amirghofran (2016) demonstraram que os efeitos imunossupressores do timol e do carvacrol ocorrem devido a mudanças induzidas em fatores-chave de transcrição envolvidos na diferenciação dos subconjuntos de células T em esplenócitos de camundongos. Os resultados da análise da expressão de citocinas e do RNAm (em soro e *ex vivo*) mostraram que timol e carvacrol reduzem a expressão de T-bet, GATA-3 e fatores de transcrição ROR γ c essenciais para a maturação/função das células Th1, Th2 e Th17, respectivamente. Segundo Fachin-Queiroz et al. (2012), o carvacrol possui efeito anti-inflamatório e o timol tem efeito pró-inflamatório.

Talvez esse antagonismo favoreça o estabelecimento do equilíbrio entre a resposta imune do perfil Th1 e Th2, o que é essencial em patologias inflamatórias crônicas, como o caso da doença de Chagas.

O OE de *S. coronata*, rico em ácidos graxos, apresentou potencial imunomodulador por diminuir a produção de IL-10 e aumentar a produção de TNF- α . De acordo com Li et al. (2004), os ácidos graxos de cadeias longas insaturadas (C16-C20) foram os responsáveis pela ação anti-inflamatória do extrato de *Tinospora smilacina*, possivelmente pela competição da enzima de afinidade do ácido araquidônico. Enquanto que o OESC, avaliado no presente estudo, não alterou a produção de ON, o extrato aquoso de *S. coronata* analisado por Rodrigues et al. (2011b) aumentou significativamente a produção de ON em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* em relação ao controle infectado e não tratado. Embora os produtos sejam oriundos da mesma espécie de planta, suas composições são completamente diferentes, enquanto o OE é rico em compostos lipofílicos o extrato aquoso é formado por moléculas hidrofílicas, justificando desta forma suas ações diferentes em relação à produção do ON.

Segundo o manual de triagem de compostos para doenças negligenciadas causadas por protozoários Kinetoplastidas do Drugs for Neglected Diseases initiative (2009), o critério de seleção para o estudo do mecanismo de ação é que os compostos devem ser pelo menos dez vezes mais ativos contra a forma intracelular em relação a célula de mamífero. No nosso estudo, os OEs de *E. brejoensis* e *H. pectinata* apresentaram respectivamente os IS de 20,11 e 10,2 para amastigotas; sendo portanto selecionados para investigação dos mecanismos de ação.

A compreensão da biologia celular dos parasitas e o alvo de ação de drogas conhecidas podem fornecer informações importantes sobre as organelas/vias metabólicas alvos permitindo um desenho mais racional de novos fármacos. A microscopia eletrônica aliada à utilização de sondas fluorescentes em análises através de microscopia confocal e citometria de fluxo podem elucidar os mecanismos de ação de compostos sobre *Trypanosoma cruzi*. Neste sentido, avaliamos o efeito dos OEs que apresentaram ISe >10 sobre a ultraestrutura de formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares e extracelulares presentes no sobrenadante de culturas de células Vero infectadas por *T. cruzi*.

Nossos resultados mostraram que os OEs de EB e HP foram capazes de causar alterações drásticas, de forma dose-dependente, tanto em tripomastigotas e amastigotas livres quanto nas presentes no interior de células Vero preservadas. Interessantemente, nossos resultados demonstraram que os OEs em parasitas intracelulares apresentaram efeito mais

brando do que as formas livres no sobrenadante da cultura. Da mesma forma, tripomastigotas aparentemente foram mais resistentes à ação de ambos os OEs do que as formas amastigotas e formas intermediárias em processo de diferenciação. Estes dados estão compatíveis com os valores de CL_{50} para formas tripomastigotas quando comparadas com as CI_{50} para formas amastigotas.

Dentre as alterações encontradas nas células tratadas com OEEB e OEHP podemos citar o aparecimento de espaços eletróluscentes (provavelmente devido ao inchamento das cisternas do retículo endoplasmático e do complexo de golgi), aumento de vacúolos, perda de material citoplasmático, desorganização do k-DNA, inchaço mitocondrial e aparecimento de estruturas semelhantes a autofagossomos. Intensa vacuolização do citoplasma, desorganização da estrutura interna e o inchaço da mitocôndria destes parasitas também foram relatados em células tratadas com terpenos e OEs (IZUMI et al., 2012). As alterações morfológicas atribuídas a estes compostos em *T. cruzi* podem ser explicadas por sua propriedade lipofílica, que permite atravessar a membrana plasmática e desta forma afetar vias metabólicas e organelas, além de causar danos na membrana plasmática que podem desencadear em lise celular. A ação combinada dos constituintes dos OEs geralmente apresenta citotoxicidade superior aos componentes isolados, por atuar em diferentes alvos intracelulares (AZEREDO; SOARES, 2013). No entanto, a maioria dos parasitas observados por microscopia eletrônica de transmissão apresentou membrana plasmática íntegra, principalmente na menor concentração dos OEs testada. Para investigarmos o efeito dos OEs sobre a integridade da membrana e inferirmos o tipo de morte celular induzido pelo tratamento com o OEEB e o OEHP, utilizamos as sondas fluorescentes anexina V (AV) e o iodeto de propídio (IP). A redistribuição da fosfatidilserina (FS) do folheto interno da membrana plasmática para o externo é uma das características indicativas de células em processo de apoptose. A apoptose pode culminar na perda da integridade da membrana plasmática evoluindo para um processo de necrose. A proteína AV tem afinidade pela FS na presença de íons de Ca^{+2} e é bastante utilizada para identificar células em processo de apoptose. O IP é uma sonda fluorescente que marca o núcleo de células que perderam a integridade de membrana plasmática. O IP utilizado em conjunto com a AV pode distinguir células em início de apoptose (marcadas apenas com AV), células em apoptose tardia (duplo marcadas para AV e IP) e células em processo de morte celular por necrose (marcadas apenas com IP) (BOUCHIER-HAYES et al., 2008). Nossos resultados de citometria de fluxo utilizando os marcadores AV/IP demonstraram que cerca de 80% das tripomastigotas controles apresentaram-se negativas para os dois marcadores. De forma semelhante, o OEHP

e o OEEB em tripomastigotas e epimastigotas não induziram de maneira significativa a morte celular tanto por apoptose quanto por necrose, não chegando a ser 1,5 vezes superior a encontrada nas células controle sem tratamento. Os resultados de marcação com AV/IP para formas tripomastigotas corroboram com os achados da microscopia eletrônica de transmissão mostrando que outro processo pode estar envolvido na morte induzida pelo tratamento com o OEEB e o OEHP. De fato, o aparecimento de estruturas autofágicas em formas amastigotas, observadas através da microscopia eletrônica de transmissão pode ser um indicativo de que o processo de autofagia possa estar ocorrendo. A autofagia representa um mecanismo de homeostase celular para a reciclagem e degradação de organelas, principalmente em resposta a falta de nutrientes permitindo um melhor aproveitamento dos recursos disponíveis. No entanto, sob certas condições como estresse persistente induzido por drogas, a autofagia pode evoluir para um ponto sem volta levando morte celular por apoptose ou necrose (OROGO; GUSTAFSSON, 2015).

As mitocôndrias são organelas celulares essenciais para o metabolismo energético, responsáveis pela respiração e fosforilação oxidativa. A manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) é crucial para os processos metabólicos ocorridos nesta organela e a alteração neste potencial é um indicador de disfunção celular. Uma das características mais marcantes de tripanosomatídeos parasitas é a presença de uma única mitocôndria exibindo características estruturais e fisiológicas que são distintas das encontradas em células de mamífero. Estas características fazem da mitocôndria um alvo interessante para prospecção de novos agentes terapêuticos contra estes parasitas (MACEDO-SILVA et al., 2011). Além do mais, estudos têm demonstrado que esta organela é um dos alvos da ação dos OEs e seus compostos terpênicos (VILLAMIZAR et al., 2017; IZUMI et al., 2012).

Desta forma, investigamos se o tratamento com os OEs era capaz de causar alterações na funcionalidade da mitocôndria. Para analisarmos se os OEs estudados causavam alterações no $\Delta\psi_m$ utilizamos a rodamina 123 (Rho 123). A Rho 123 é um fluorocromo lipofílico que se difunde facilmente através de membranas e se acumula em áreas cujo potencial de membrana é negativo, tais como a matriz mitocondrial. A absorção de Rho 123 é proporcional ao potencial de membrana mitocondrial. A hiperpolarização da membrana induz a entrada de Rho 123, enquanto que a despolarização diminui a fluorescência de Rho 123 (HUANG et al., 2007). As formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com OEEB e o OEHP apresentaram hiperpolarização significativa do $\Delta\psi_m$, conforme demonstrado pelos valores do índice de variação $> + 1$. Apesar das formas epimastigotas apresentarem valores positivos de índices de

variação, o processo de hiperpolarização foi bem mais discreto do que o apresentado pelas formas tripomastigotas, sugerindo uma maior susceptibilidade da mitocôndria nesta forma evolutiva em relação à forma epimastigota.

A cadeia transportadora de elétrons é formada por complexos de proteínas localizados na membrana mitocondrial interna e à medida que os elétrons são transportados, prótons são produzidos e bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Esses eventos formam um potencial eletroquímico através da membrana, conhecido por potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (BOUCHIER-HAYES et al., 2008). Alterações no $\Delta\psi_m$ estão associadas com estresse oxidativo, apoptose e autofagia (SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007).

As alterações ocorridas nas mitocôndrias podem ser originadas pelos efeitos nocivos induzidos por compostos tóxicos endógenos, dentre estes, as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BRITTA et al., 2014). A mitocôndria é a principal fonte intracelular de EROs através da cadeia transportadora de elétrons durante a produção de ATP. Alterações no $\Delta\psi_m$ podem elevar a produção de EROs através da cadeia transportadora de elétrons. Em decorrência da alteração no $\Delta\psi_m$ das formas tripomastigotas tratadas com os OEs, investigamos a produção de EROs através do marcador MitoSox. O MitoSoxRed é marcador específico de produção de EROs pela mitocôndria após estímulos de estresse oxidativo (FERNANDES et al., 2012). Nossos resultados mostraram discreto incremento na produção de EROs em formas tripomastigotas tratadas com o OEEB. O aumento de EROs pode ocasionar danos mitocondriais seguido pelo aumento da permeabilidade de suas membranas, resultando na liberação de EROs para o citosol e contribuindo para ativação de morte celular por apoptose. As EROs podem causar efeitos destrutivos ao reagirem com macromoléculas biológicas, dentre estas, lipídios, proteínas e DNA (DESOTI et al., 2012).

7 CONCLUSÕES

- a) Exceto para o óleo essencial de *S. coronata*, que apresentou como componentes majoritários os ácidos graxos, a análise química dos óleos essenciais permitiu a identificação de monoterpenos e sesquiterpenos e seus derivados oxigenados como principais constituintes;
- b) Todos os óleos essenciais apresentaram moderada toxicidade para células de mamífero e baixa atividade hemolítica;
- c) Com excessão do óleo essencial de *S. coronata*, os demais óleos essenciais foram capazes de inibir o crescimento e a viabilidade de todas as formas evolutivas de *T. cruzi* e apresentaram-se mais seletivos ao parasito em relação ao controle com benzonidazol;
- d) Os óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata* foram considerados mais ativos contra *T. cruzi* e menos tóxicos para células de mamífero como observado pelo ISe;
- e) O óleo essencial de *S. coronata* induziu aumento na produção de TNF- α e diminuição na produção de IL-10;
- f) A análise através de microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo apontam a mitocôndria como uma das organelas alvo e a autofagia como um dos possíveis mecanismos de morte celular induzida pelos óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata* em formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*;
- g) Os nossos dados sugerem que os óleos essenciais estudados, principalmente os óleos essenciais de *E. brejoensis* e *H. pectinata*, são promissores para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.

ABAD, M. J. et al. The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 2542-2566, 2012.

AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Society of Clinical Microbiology**, Berlin, v. 30, p. 441–502, 2011.

AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, Tyler, v.2, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58991d7148954c42d21b169c&assetKey=AS%3A458932964597761%401486429553709>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ALAVINEZHAD, A; BOSKABADY, MH. Antiinflammatory, antioxidant, and immunological effects of *Carum copticum* L. and some of its constituents. **Phytotherapy Research**, London. v. 28, p. 1739-1748, 2014.

ALBAREDA, M. C. et al. Perturbed T Cell IL-7 Receptor Signaling in Chronic Chagas Disease. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 194, n. 8, p. 3883-3889, 2015.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Caatinga Revisited: Ecology and Conservation of an Important Seasonal Dry Forest. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415163/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ALCANTARA, C. L. et al. The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Journal of cell science**, London, v. 127, p. 2227-2237, 2014.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, London, v. 2, n. 15, 2006. Disponível em: <<https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4269-2-15>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ALMEIDA, W. R. et al. The alien flora of Brazilian Caatinga: deliberate introductions expand the contingent of potential invaders. **Biological Invasions**, Tennessee, v. 17, p. 51-56, 2014.

ALONSO-PADILLA, J.; RODRÍGUEZ, A. High throughput screening for anti-*Trypanosoma cruzi* drug discovery. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 12, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256210/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

ALSFORD, S. et al. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. **Parasitology**, London, v. 140, n. 12, p. 1478-1491, 2013.

ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: Uma Investigação Ecogeográfica. **Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.

ANDRADE, D. V. et al. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0003010&type=printable>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

ANTONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant Active Components – A Resource For Antiparasitic Agents? **Trends in parasitology**, Oxford, v. 21, p. 462-468, 2005.

AOKI, M. P. et al. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of parasitology research**, New York, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159004/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug design, development and therapy**, Auckland, v. 4, p. 243-253, 2010.

ARAÚJO-JORGE, T.C. et al. The TGF- β pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. **Clinical pharmacology and therapeutics**, Saint Louis, v. 92, n. 5, p. 613-621, 2012.

AYO, C. M. et al. Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes. **BioMed research international**, New York, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771244/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

AZEREDO, C. M. O.; SOARES, M. J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, p. 762-768, 2013.

AZEVEDO, P. R. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 8, n. 5, 2012. Disponível em: <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/download/806/495>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALLESTEROS-RODEA, G. et al. Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/520380/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BARCÁN, L. et al. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' Disease. **Liver Transplantation**, Philadelphia, v. 11, n. 9, p. 1112-1116, 2005.

BARROS, L. M. et al. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana câmara* L. (Verbenaceae) essential oil. **Molecules**, Basel, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/209>>. Acesso em: 29

jan. 2016.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, Basel, v 17, p. 3989-4006, 2012.

BEAUMIER, C. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. **Vaccine**, Guildford, 2016. Disponível em: < [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264-410X\(16\)30071-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264-410X(16)30071-8) 2016>. Acesso em: 29 jan. 2016.

BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**, Campinas, v. 51, p. 39-45, 2013.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 156, 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747009>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 298, p. 2171-2181, 2007.

BERNARDES, W. A. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 65, p. 588-593, 2010.

BILLA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058161/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

BLUM, J. A. et al. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. **The Lancet Infectious diseases**, New York, v. 8, n. 10, p. 631-641, 2008.

BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BOIANI, M. et al. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 79, n. 12, p. 1736-1745, 2010.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.

BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazide Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 142-150, 2010

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 132, p. 123–128, 2012.

BORGES, B. C. et al. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27921011>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BOUCHIER-HAYES, L. et al. Measuring Apoptosis at the Single Cell Level. **Methods**, San Diego, v. 44, n. 3, p. 222–228, 2008.

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, Parma, 2014. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0236-0>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

CARDOSO, J.; SOARES, M.J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4716143/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 241-244, 2013.

CASTRO, S. L. et al. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International**, Cairo, 2011. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mbi/2011/306928/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

CHANG, H. J. et al. Protective effect of β -caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene, against cerebral ischemic injury. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v. 16, n. 6, p. 471-480, 2013.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Gothenburg, v. 15, p. 98-103, 2017.

COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 477–489, 2015.

COLINA, K. L. Biology and Mechanism of *Trypanosome* Cell Motility. **Eukaryotic cell**, Washington, v. 2, n. 2, p. 200-208, 2003.

CONCEIÇÃO, A. O. et al. *Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) ethanolic extract induces activation of ERK1/2 and p38 MAPKs pathway and Ca²⁺ imbalance in human trophoblasts derived cell lines. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 50, n. 3-4, p. 1001-1012, 2012.

COSTA, E. V. et al. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae) and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 27, n. 11, p. 997-1001, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**, Oxford, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

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

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2010.

CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and Immunity against Prokaryotic and Eukaryotic Intracellular Pathogens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 8, p. 2964-2973, 2011.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, Novara, v. 78, p. 215-218, 2007.

DE SOUZA, G. A. G. et al. *In vitro* and *in vivo* antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 24, p. 111-118, 2017.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 89-100, 2009.

DE SOUZA, W. Uma breve revisão sobre a morfologia do *Trypanosoma cruzi*: 1909-1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 17-36, 1999.

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

DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, New York, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2926652/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Cell fractionation of parasite Protozoa - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 151-170, 2003.

DESOTI, V. C. et al. Trypanocidal Action of (-)-Elatol Involves an Oxidative Stress Triggered by Mitochondria Dysfunction. **Marine drugs**, Basel, v. 10, p. 1631-1646, 2012.

DHIFI, W. et al. Essential oils's chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, Basel, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/25>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

DIAS, J. C. P. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, p. 3-61, 2016.

DIAS, J. C. P. Human Chagas Disease and Migration in the Context of Globalization: Some Particular Aspects. **Journal of Tropical Medicine**, Cairo, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jtm/2013/789758/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

DOOL, H. D.; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, 1963.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **Chagas disease**. [S. l.], 2015. Disponível em: <http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2016/06/Chagas_Factsheet_2015.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2016.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **Drug Screening for Kinetoplastids Diseases - A training manual for screening in neglected diseases**. [S. l.], 2009. Disponível em : <http://www.dndi.org/wpcontent/uploads/2009/04/kinetoplastid_drug_screening_manual_final.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2016.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Azolic compounds - Integration of the evidence of the proof of concept. **News Letter**, Rio de Janeiro, n. 2, p. 6-9, 2012.

DOCAMPO, R.; MORENO, S .N. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 15, n. 11, p. 443-448, 1999.

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian journal of medical and biological research**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

DOS SANTOS, R.; KUHNEN, C. A.; YUNES, R. A. Molecular structure and QSAR study on antispasmodic activity of some xanthoxylone derivatives. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 339, p. 227-237, 2006.

DURANTE, I. M.; CÁMARA, M. D. L. M.; BUSCAGLIA, C. A. A Novel *Trypanosoma cruzi* Protein Associated to the Flagellar Pocket of Replicative Stages and Involved in Parasite Growth. **PLoS ONE**, San Francisco, 2015. Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472858/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

EGAN, C. E. et al. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 156, p. 17–24, 2009.

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.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives**, Triangle Park, v. 109, p. 69–75, 2001.

FACHINI-QUEIROZ, F.C. et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22919415/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 84, p. 69-74, 2003.

FALCÃO, R. A. et al. Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/460613>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

FERELLA, M. et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi* – localization of novel proteins to various organelles. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, p. 2735-2749, 2008.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.

FERNANDES, M. C. et al. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, Cambridge, v. 139, p. 26–36, 2012.

FIGUEIREDO, R. C. B. Q. 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**, Oxford, v. 129, p. 431-438, 2004.

GHOLIJANI, N.; AMIRGHOFAN, Z. Effects of thymol and carvacrol on T-helper cell subset cytokines and their main transcription factors in ovalbumin-immunized mice. **Journal of Immunotoxicology**, London, v. 15, p. 729-737, 2016.

GOES, G. R. et al. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, 2016. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004555>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 43, p. 651–661, 2011.

GOURBIÉRE, S. et al. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heridity**, London, v. 108, n. 3, p. 190-202, 2012.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. δ -Cadinene, Calarene and δ -4-Carene from *Kadsura heteroclita* Essential Oil as Novel Larvicides Against Malaria, Dengue and Filariasis Mosquitoes. **Combinatorial chemistry and high throughput screening**, Hilversum, v. 19, n. 7, p. 565-71, 2016.

GROSSO, N. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of a isolate from an endemic area and its susceptibility to conventional drugs. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 126, n. 2; p. 239-244, 2011.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 236-245, 2009.

HAMEDT, A. L. et al. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal action. **Acta Tropica**, Basel, v. 131, p. 92-97, 2014.

HUANG, M. et al. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v. 35, n. 7, p. 1276 – 1285, 2007.

HUGHES, A. F. S. et al. Antimicrobial Activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 269-274, 2013.

HUI, L. M.; ZHAO, G. D.; ZHAO, J. J. δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. **International journal of clinical and experimental pathology**, Madison, v. 8, n. 6, p. 6046–6056, 2015.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291693> >. Acesso em: 13 nov. 2016.

IRIGOÍN, F. et al. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, London, v. 418, p. 595-604, 2009.

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated *in vitro* Antiparasitic and Synergic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 55, p. 2994-3001, 2012.

JIMENEZ, V. et al. Natural Programmed Cell Death in *T. cruzi* Epimastigotes Maintained in Axenic Cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 105, p. 688-698, 2008.

KARA, M. et al. Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. **Inflammation**, New York, v. 38, n. 3, p. 1020-1027, 2014.

KIM, E.; PARK, I. K. Fumigant antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 10459-10469, 2012.

KIM, S.A.; RHEE, M.S. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 6552-6560, 2013.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 166, p. 4596-4603, 2001.

LAVERRIÈRE, M.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. Antagonic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 19, p. 1358-1369, 2012.

LECHUGA, G. C. et al. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 154-164, 2016.

LEON RODRIGUEZ, D. A. et al. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. **Genes and Immunity**, London, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/gene/journal/v16/n8/full/gene201542a.html>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

LEONARD, P. H. et al. Variability in protein quality used for embryo culture: embryotoxicity of the stabilizer octanoic acid. **Fertility and Sterility**, New York, v. 100, n. 2, p. 544-549, 2013.

LI, R. W. et al. Anti-inflammatory activity, cytotoxicity and active compounds of *Tinospora smilacina* Benth. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 78-83, 2004.

LIMA, A. C. et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, Pretoria, v. 146, n. 1, p. 192-197, 2013.

LUNARDI, F. et al. Trypanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-containing Chalcones. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1449-1451, 2003.

- MACEDO-SILVA, S. T. et al. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Molecular Biology International**, Cairo, 2011. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mbi/2011/876021/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in immunopathology**, Berlin, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147698>>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- MANDAL, S. Epidemiological aspects of Chagas disease - a review. **Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine**, Los Angeles, v. 2, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://www.esciencecentral.org/journals/epidemiological-aspects-of-chagas-disease-a-review-2329-8731.1000117.php?aid=30637>>. Acesso em: 13 nov. 2016.
- MANOEL-CAETANO, F. S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 10, p. 2263-2274, 2007.
- MARTINS, A.V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infection**, Bogotá, v. 16, n. 1, p. 45-58, 2012.
- MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 146, p. 601-620, 2007.
- MAZINE, F.; SOUZA, V. C. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 158, p. 775-777, 2008.
- McCALL, L. I. et al. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768284>>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- 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, p. 263-269, 2009.
- MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Laussane, v. 129, p. 391-397, 2010.
- 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. 157-168, 2009.

MENNA-BARRETO, R. F.; CASTRO, S. L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International**, Cairo, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/614014/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

MESSANA, I. et al. (-)Salzol, na isopimarane diterpene and a chalcone from *Hyptis salzmannii*. **Phytochemistry**, Nantes, v. 29, p. 329-332, 1990.

MOHMOD, A. L.; KRISHNASAMY, G.; ADENAN, M. I. Malaysian plants with potential *in vitro* trypanocidal activity. **Annals of Phytomedicine**, Moosarambagh, v. 4, n. 1, p. 6-16, 2015.

MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 370, p. 1899-1908, 2014.

MOLINA-GARZA, Z. J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Tropica**, Basel, v. 136, p. 14-18, 2014.

MONZOTE, L.; ALARCÓN, O.; SETZER, W. N. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 77, n. 4, p. 167-175, 2012.

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, Seattle, v. 54, p. 785-803, 2001.

MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 4703, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep04703>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Lawrence, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.

MORROT, A. et al. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? **Frontiers in microbiology**, Lausanne, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876113/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

MOTA, M. L. et al. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, p. 658-664, 2012.

MOURA, P.A. et al. Caatinga plants as weapons against microorganisms: advances and challenges. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**. 1. ed. Badajoz: Formatex Research Center, 2015. p. 117-124.

NASCENTES, G. A. N. et al. The Driving of Immune Response by Th1 Adjuvants in Immunization of Mice with *Trypanosoma cruzi marinkellei* Elicits a Controversial Infection Control. **Vector-borne and zoonotic diseases**, New York, v. 16, n. 5, p. 317-325, 2016.

NIYOGI, S. et al. Rab32 is essential for maintaining functional acidocalcisomes, and for growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 128, p. 2363-2373, 2015.

NOGUEIRA, P. M. et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of extracellular vesicles**, Järfälla, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876113/>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

OKUDA, K. et al. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Experimental Parasitology**. Orlando, v. 92, p. 223–231, 1999.

OLIVEIRA, G. S. A. et al. *In vitro* Antifungal Activity of *Irlbachia purpurascens*, *Lantana macrophylla* and *Kielmeyera neglecta* Extracts Against Candida Isolates Collected from Patients with Vulvovaginal Candidiasis. **Research Journal of Medicinal Plant**, Seattle, v. 7, p. 141-149, 2013.

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**, Berlin, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

OROGO, A. M.; GUSTAFSSON, A. B. Therapeutic Targeting of Autophagy: Potential and Concerns in Treating Cardiovascular Disease. **Circulation research**, Baltimore, v. 116, p. 489-503, 2015.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions. **PlosOne**, San Francisco, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022359>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 19, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898031/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

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

PINHEIRO, T. R. et al. *In vitro* Antifungal Evaluation and Studies on the Mode of Action of Xanthoxyline Derivatives. **ArzneimForsch**, Aulendorf, n. 49, p. 1039-1043, 1999.

PIRBALOUTI, A. G. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from *Ferulago angulata*. **Pharmaceutical Biology**, Netherlands, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102982>>. Acesso em: 4 jun. 2016.

PISSETTI, C. W. et al. Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 5, n. 3,

2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3050938/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

PONCE, N. E. et al. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1832, p. 485–494, 2013.

PUPULIN, A. R. T. et al. Canova medication changes TNF- α and IL-10 serum levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi* Y strain. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Heidelberg, v. 9, p. 860-865, 2016.

QUIÑONES, W. et al. The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 106, p. 135–149, 2004.

RAMOS, J. M. O. et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 134, p. 725–732, 2011.

RIBEIRO, I.; BLUM, B.; CORREIA, E. **Proof-of-Concept (PoC), Phase II evaluation for E1224 in adults with chronic indeterminate Chagas disease**. Geneva: DNDi, 2014. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/azoles-e1224/>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

RIBEIRO, K. et al. Land cover changes and greenhouse gas emissions in two different soil covers in the Brazilian Caatinga. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 571, p. 1048-1057, 2016.

RIOS, Y. K. et al. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, Bogotá, v. 37, p. 200-211, 2008.

ROCHA, G. M. et al. Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 6, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613980>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

RODRIGUES, I. A. et al. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 62-66, 2011a.

RODRIGUES, I. A. et al. In vitro anti-*Leishmania amazonensis* activity of the polymeric procyanidin-rich aqueous extract from *Syagrus coronata*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3781-3790, 2011b.

RODRIGUES, J. H. S. et al. A Quinoxaline Derivative as a Potent Chemotherapeutic Agent, Alone or in Combination with Benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PlosOne**, San Francisco, v. 9, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085706>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **Journal of Parasitology Research**, New York, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306967/>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

ROGGERO, E. et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 128, p. 421-428, 2002.

ROMANO, P. S. et al. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/Host Cell Interplay. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology life**, London, v. 64, n. 5, p. 387-396, 2012.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, Norwich, v. 69, p. 167-174, 2000.

RUFINO, M. U. L. et al. Conhecimento e uso do ouricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phalerata*) em Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 22, n. 4, p. 1141-1149. 2008.

SÁ, M. C. A. et al. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SALAS, C. O. et al. Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 18, p. 144-161, 2011.

SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 17, p. 423-452, 2010.

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**, New York, v. 134, p. 1649-2656, 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**, Orlando, v. 116, p. 283-90, 2007b.

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. 783-90, 2007c.

SANTOS, M. V. F. et al. Potencial of Caatinga forage plants in ruminant feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 204-215, 2010.

SANTOS, P. O. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Hyptis pectinata*. Poit. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1648-1652, 2008.

SANTOS, S. N. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Hyptis leucocephala*. **Ata de Saúde Ambiental**, São Paulo, v. 3, p. 3-11, 2015.

SANTOS, T. R. S.; SALIMENA, F. R. Novas combinações e novos sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 40, n. 1-4, p. 57-59, 2002.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 75-86, 2007.

SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, Basel, v. 22, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045446>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

SIBLEY, L. D. Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. **Immunology Review**, Copenhagen, v. 240, p. 72-91, 2011.

SILVA JÚNIOR, E.N. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds: Our Contribution for the Evaluation and Insights on the Mode of Action of Naphthoquinones and Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Belo Horizonte, v. 25, p. 1780-1798, 2014.

SILVA, A. B. L. et al. Avaliação do Efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Cristovão, v. 16, n. 4, p. 475-479, 2006.

SILVA, A. G. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Pune, v. 18, n. 6, p. 1441-1447, 2015.

SILVA, L. C. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural Product Research**, Roma, v. 27, n. 16, p. 1492-1496, 2013.

SILVA, R. L. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, p. 101-105, 2002.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial –História sobre a doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.44, p. 52-63, 2011.

SOARES, D. C. et al. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864897>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

SOARES, M. J. The Reservosome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes: an Organelle of the Endocytic Pathway with a Role on Metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 139-141, 1999.

SOUZA JÚNIOR, A. J. et al. Avaliação da Atividade antimicrobiana dos Extratos etanólicos de *Lantana macrophylla* e *Aeagiphyla vitelliniflora*, Verbenaceae. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC, 12., 2005, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UESC, 2005. p. 306-307.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites and Vectors**. New York, v. 7, n. 317, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105117/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

SWAMY, M. K.; SINNIAH, U. R. Uma revisão abrangente sobre os constituintes fitoquímicos e atividades farmacológicas de *Pogostemon cablin* Benth.: uma planta aromática medicinal de importância industrial. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 8521-8547, 2015.

SWAMY, M. K., AKHTAR, M. S., SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2016. Disponível em: <<http://10.1155/2016/3012462>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

TEIXEIRA, A. H. et al. Conhecimento Popular Sobre o Uso de Plantas Medicinais no Município de Sobral-Ceará, Brasil. **Sanare**, Sobral, v. 13, n. 1, p. 23-28, 2014.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas Didático**: Ciclo biológico do *T. cruzi*. Disponível em: <http://labspace.open.ac.uk/course/view.php?name=PUB_527_1.0>. Acesso em: 12 fev. 2015.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, Washington, v. 31, p. 472-481, 2001.

VIEIRA, M. et al. Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway. **Biochemical Journal**, London, v. 392, p. 467-474, 2005.

VILLALTA, F. et al. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontier Bioscience**, Irvini, v. 13, p. 3714-3734, 2008.

VILLAMIZAR, L. H. et al. Linalool, a Piper aduncum essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 2, p. 131-139, 2017.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Molecular Life Scientific**, Basel, v. 71, n. 7, p. 1245-1263, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 12 fev 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Sixty-fifth world health assembly: Progress reports**. Geneva, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA65/A65_26-en.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2014.

WONG-BAEZA, C. et al. Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. **BMC Pharmacology Toxicology**, London, v. 16, n. 10, p. x-x, 2015.

YAP, P. S. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **Open Microbiology Journal**. Hilversum, v. 8, p. 6-14, 2014.

ZHELJAZKOV, V.D. et al. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 380-385, 2008.

APENDICE A – Manuscrito submetido**The Chemical composition and trypanocidal activity of essential oils from Brazilian
Caatinga plants**

Larissa Isabela Oliveira de Souza^a, Patrícia Cristina Bezzera-Silva^b, Alexandre Gomes da Silva^{c,d}, Maria Tereza dos Santos Correia^{c,d}, Márcia Vanusa da Silva^{c,d}, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^{a,*}

^aDepartamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPQAM-FIOCRUZ/PE, Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, 50670-420, Pernambuco, Brazil.

^bDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

^cNúcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações - INSA/MCTIC, Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, Serrotão, 58429-970, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

^dDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author

Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo,

Departamento de Microbiologia

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE

e-mail address: bressan@cpqam.fiocruz.br

phone/fax: +55 81 2101-25656

Abstract

Background: Essential oils (EOs) are known as a rich source of chemically diverse compounds with relevant biological activities being used in the traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Aim:** In this work we analyzed the chemical composition and the effect *in vitro* of EOs from Caatinga plants *Eugenia brejoensis* (EBEO), *Hyptis pectinata* (HPEO), *Hypenia salzmannii* (HSEO), *Lippia macrophylla* (LMEO) and fruit of *Syagrus coronata* (SCEO) on *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Material and Methods:** The EOs were extracted through steam distillation and its chemical composition analyzed by GC/MS. The trypanocidal activity against epi- and trypomastigote was evaluated by optical microscopy and the cytotoxicity to mammalian cells by MTT. The effects of EOs on parasite infection in macrophages were estimated by determining the survival index and the percentage of infection inhibition. The cytotoxicity for the parasite was compared to those of parasite by determining the Selectivity Index (SI). **Results:** Overall, 115 compounds were identified: The main constituents of EOS were: δ -cadinene (15.88%), trans-caryophyllene (9.77%) e α -Muurolol (9.42%) for EBEO; trans-caryophyllene (15.24%), bicyclogermacrene (7.33%) e cis-calamenene (7.15%) for HFEO; trans-caryophyllene (30.91%), caryophyllene oxide (13.19%) and spathulenol (5.68%) for HPEO; Xanthoxilin (17.20%) trans-caryophyllene (14.34%) and methyl-eugenol (5.60%) for HSEO; Thymol (49.81%), carvacrol (31.6 and σ -cimene (10.27%) for LMEO and octanoic acid (38.83%) dodecanoic acid (38.45%) and decanoic acid (20.51%) for SCEO. All the tested oils showed an inhibitory effect on the growth and survival of all forms of *T. cruzi* and moderate cytotoxicity towards the mammalian cells ($100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$). The EO of *E. brejoensis* was the most effective against the parasite presenting higher Selectivity Index for trypano- (SI= 14.45) and amastigote forms (SI=20.11). Except for SCEO, which presented high cytotoxicity for both parasite and mammalian cells, all the oils demonstrated to be more selective for the parasite than the reference drug benznidazole. **Conclusion:** Taken together our results point the essential oils from Caatinga plants, especially *Eugenia brejoensis*, as promissory agents for the development of new drugs against Chagas disease. **Keywords:** Essential Oils, chemotherapy, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease.

1 Introduction

Essential oils (EOs) are a complex mixture of compounds from the secondary metabolism of plants. They are usually volatile, odorous and may contain up to 100 individual molecules, which are constituted mainly by monoterpenes and sesquiterpenes, phenylpropanoids and

isothiocyanates (Sharifi-Rad et al., 2017). In the nature, these plant derived-compounds confer protection by acting as antimicrobial, antiviral and antifeedant agents (Bakkali et al., 2008, Sharifi-Rad et al., 2017). EOs also exhibit diverse biological activities as analgesic, anti-inflammatory, antiparasitic, antioxidant and antitumoral (Swamy et al., 2016). In this regard, EOs has been used since ancient times by traditional medicine for the treatment of several pathological conditions (Piatkowska and Rusiecka-Ziółkowska, 2016). Furthermore, these secondary metabolites have been proven to be safe with low side effects and toxicity to mammalian cells. So far, only a few studies have addressed the effect of EOs and their components against parasitic trypanosomatids (Barros et al., 2016, Borges et al., 2012, Oliveira et al., 2009, Santoro et al., 2007).

Trypanosoma cruzi is a hemoflagellate parasite protozoan that causes Chagas disease (CD). This illness affects about 7 million people around the world, being endemic in 21 Latin American countries. It is estimated that CD lead to more than 7,000 deaths per year and there are about 25 million people at risk of infection (WHO, 2015). The clinical course of the infection is characterized by two distinct phases: the acute phase, defined by high parasitemia and nonspecific symptoms, and chronic phase, which is long, progressive and potentially fatal, causing severe damage to the cardiac and gastrointestinal systems (Cucunba et al., 2016). In the absence of preventive vaccine, the clinical management of CD relies on the use of two drugs: benznidazole and nifurtimox. Both drugs have high toxicity and its efficacy in the chronic phase of disease is questionable (Bermudez et al., 2016). In face of these drawbacks, the search for new drugs more effective and less toxic for the treatment of CD (Beaumer et al., 2016) has been pursued by many research groups (Paula et al., 2015).

In the prospection of potential chemotherapeutic agent against *T. cruzi* our group has focused on the study of EOs from the Caatinga biome. This exclusive Brazilian biome is one of the most biologically diverse semi-arid regions in the world, covering 10% of the national territory. The Caatinga is characterized by elevated temperatures, seasonally dry forest, irregular rainfall regime and shrubb-spiny vegetation (Almeida et al., 2006). These unique climatic conditions provide singular adaptive features, driving species to evolve specific physiological behaviour to deal with adverse environments (Almeida et al., 2006, Silva et al., 2013). Thus plants from Caatinga constitute a source of compounds, that has been attracted increasing attention in an attempt to develop new antiparasitic drugs (Silva et al., 2014, Trentin et al., 2011). Previous studies have reported the pharmacological potential of Caatinga plants as insecticidal (Melo et al., 2015), antimicrobial (Trentin et al., 2011), antifungal (Biaso-Garbin et al., 2016), anti-inflammatory, antinociceptive (Paiva et al., 2013), antiproliferative, antioxidant (Melo et al., 2010) and leishmanicidal (Vila-Nova et al., 2012). EOs from Caatinga plants have

also demonstrated relevant biological activities. For instance, the EOs of *Vanillosmopsis arborea*, *Lippia sidoides* and *Croton zehntneri* presented antimalarial activity both *in vitro* and *in vivo* (Mota et al., 2012), whereas the EOs from *Annona vepretorum*, *Hyptis leucocephala* and *Lippia gracilis* showed antioxidant, antibacterial, analgesic and anti-inflammatory properties (Araújo et al., 2015, Mendes et al., 2010, Santos et al., 2015).

In this study we aimed to investigate the chemical composition and trypanocidal activity of EOs from leaves of *Eugenia brejoensis* (EBEO), *Hyptis fruticosa* (HFEO), *Hyptis pectinata* (HPEO), *Hypenia salzmannii* (HSEO), *Lippia macrophylla* (LMEO) and seeds of *Syagrus coronata* (SCEO). The choice for these species was due to its use in folk medicine and its antimicrobial activities already reported in the literature (Table 1).

2 Materials and methods

2.1 Plant Materials - The leaves (*Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmannii*, *Lippia macrophylla*) and seeds (*Syagrus coronata*) were collected (March 2013) from mature individuals in Parque Nacional do Catimbau (8° 24 00 e 8° 36 35 S e 37° 09 30 e 37° 14 40 WG) in the state of Pernambuco, Brazil. According to Brazilian law, the permission to collect the plants were authorized by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO authorization number 26743-3). The plants were identified by A.G. Silva and voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA). Voucher numbers are given in Table 1

2.2 Extraction and Chemical composition of the Essential Oils - Powdered plant material was submitted to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus (300 g, 3 h). The EOs obtained were filtered, weighed and then the oil yield was calculated in terms of % (w/w). Essential oils was then stored in a dark flask and refrigerated (at + 5°C) until use. The EOs were subjected to gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS, Agilent Technologies 5975C Series, equipped with a DB-5 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.x 0.25 µm). A sample (1 µL) was injected in split mode (50:1), injector temperature at 250°C. Oven temperature: 40°C for 2 min, then increased to 230°C at 4°C/min and held at 230°C for 5 min. The carrier gas flow was helium (1 mL/min.), constant pressure of 7.0 psi and mass selective detector source and quadrupole temperatures set to 230°C and 150°C, respectively; MS obtained at 70 eV and recorded in the range 35–350 m/z at 1.0 scan/s. The identification of the components of the EOs was proceed by comparison of retention indices, obtained by co-injection of sample with C9–C30 linear hydrocarbons and calculated according to the Van den Dool and Kratz equation (van Den Dool et al., 1963; Bezerra-Silva et al., 2016) with those reported in the

literature. The MS data acquired for each component were matched with those stored in the mass spectral library of the GC–MS system (MassFinder 4, NIST08 and Wiley Registry™ 9th Edition) and with published spectra (Adams RP, 2009) in order to confirm identity. For the experiments, the EOs were dissolved in DMSO at 50 mg/mL (stock solution) and further in culture medium at 1 mg/mL (work solution). All the experiments were carried at concentrations of DMSO that were considered non toxic for the parasites or mammalian cells.

2.3 Parasites - Epimastigote forms (Dm28c strain) were maintained at 28 °C in LIT medium (Tryptose Liver Infusion) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Three-day-old epimastigotes, at the mid-logarithmic phase of growth, were used in the experiments. *T. cruzi* blood trypomastigote forms (strain Y) were obtained from infected Swiss albino mice by cardiac puncture at the parasitemia peak (7 days pi). These cells were maintained in VERO cells in RPMI 1640 medium (Sigma -Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) at 37 °C and 5% CO₂. Intracellular amastigote forms were obtained from the trypomastigote inoculation in cultures of peritoneal macrophages of Balb/c mice, maintained in RPMI 1640 medium at 37 °C.

2.4 Trypanocidal activity - Epimastigotes forms cultivated for 48 h (phase log) were adjusted to a final inoculum of 1×10^6 cells/mL in LIT medium with 10% FBS. Afterwards, they were added to a 24-well microplate containing increasing concentrations of each essential oil (15.6-250 µg/mL). The parasite growth was daily estimated by direct counting in a Neubauer's chamber for 24, 48 and 72 h. The concentration able to inhibit 50% of the parasites (IC₅₀) was estimated by linear regression. Each assay was performed in triplicate and three independent experiments. Trypomastigote forms (10^6 cells/mL) were incubated at 37 °C with different concentrations of essential oils (15.62 to 250 µg/mL) in RPMI medium with 10% FBS in 96 wells microplate. After 24 h the number of viable parasites was estimated by direct counting in a Neubauer's chamber. Each experiment was performed in quadruplicate and control groups (non-treated trypomastigote forms) were cultivated in presence of DMSO 0.1%. To evaluate the effects of EOs on the intracellular amastigote forms, a suspension of murine peritoneal macrophages at 2×10^5 cells/mL were seed in a 24-well microplate containing a round coverslips in the bottom of each well. The cells were cultivated in RPMI supplemented with 10% of FBS at 37 °C for 3 h until complete adhesion to the coverslip. Afterwards, trypomastigote forms were added to the wells at a ratio of 5:1 parasites/host cell. After 3 h, non-internalized parasites were removed and the cells were incubated in the absence (control cells) or presence of different concentrations of EOs and cultivated for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Then the coverslips were fixed with methanol, stained with Giemsa, and permanently mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). A total 200 cells were counted using light microscope and the percentage of infected cells and the number of intracellular parasites/infected cell was

estimated. The survival index (percentage of infected cells \times number of amastigotes per cell) and IC_{50} value were also determined.

2.5 Cytotoxicity assay - Murine peritoneal macrophages were seeded in a 96-well microplate at a concentration of 2×10^5 cells/mL in RPMI medium without phenol red supplemented with 10% FBS and then incubated at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 24 h. Afterwards, the EOs at different concentrations (15.62-250 μ g/mL) were added to each well and the samples were cultivated for 48 h at 37 °C, in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After incubation, the cells were washed and 2 mg/mL MTT was added to each well. The microplate was incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO_2 atmosphere. DMSO was added to each well to solubilise the formazan crystals formed, and absorbance was read at 540 nm using a Benchmark plus (Bio-Rad®, California, EUA) spectrophotometer. The concentration able to kill 50% of the cells (CC_{50}) was calculated by linear regression. Then, the selective index (SI), that indicates the toxicity of the parasite compared to the host, was calculated using the rate both CC_{50} and LC_{50} . Each assay was carried out in quadruplicate and two independent assays.

2.6 Cytotoxicity to erythrocytes - The hemolytic activity was investigated by incubating 100 μ L of serially diluted EOs in saline solution (NaCl 0.85% + $CaCl_2$) with 100 μ L of 2% red blood cells suspension (human O^+) for 3 h at 37 °C in a 96-well microplate (U-bottom shape) under constant agitation. The microplate was centrifuged at 1500 g for 4 min. Cell lysis was then measured spectrophotometrically (540 nm). Erythrocytes in saline and cell treated with Triton X-100 were used as negative and positive control of hemolysis, respectively. The results were determined by the percentage of hemolysis compared to the positive control (100% hemolysis) and negative control (0% hemolysis), and the experiments were performed in quadruplicate in two independent assay.

2.7 Ethical Standards- All experiments involving the use of experimental animals (male BALB/c mice) were performed in accordance to the ethical standards of Fundação Oswaldo Cruz and were approved by the ethics committee (CEUA-FIOCRUZ-CPQAM 60/2014).

2.8 Statistical analysis- Statistical analysis was performed using ANOVA. The data were analyzed by GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 Results and discussion

The essential oils (EOs) and their isolated constituents represent excellent prototypes for the synthesis of new chemotherapeutic agents due to the singular chemical characteristics of their constituents, usually small (< 300 Da) lipophilic molecules able to cross the cellular

membrane and interact with intracellular targets, which play important physiological roles to pathogen survival, proliferation and differentiation (Dhifi et al., 2016).

In this study we analyzed the chemical composition of EOs from leaves and seeds of six Caatinga plants used in the traditional medicine: *E. brejoensis* (EBEO), *H. fruticosa* (HFEO), *H. pectinata* (HPEO), *H. salzmannii* (HSEO), *L. macrophylla* (LMEO) e *S. coronata* (SCEO). These plants have been already reported in the literature as having biological activities against several pathological conditions, including infectious diseases (Table 1).

The chemical analysis of EOs identified 115 of 163 compounds. The LMEO e SCEO have 100% of their constituents identified by GC-MS. The sesquiterpenes were the most abundant compounds found in EBEO (93.83%), HFEO (69.57%), HPEO (77.51%) and HSEO (56.07%), most of them corresponding to hydrocarbon sesquiterpenes. Conversely, the LMEO is basically constituted by monoterpenes (98%), whereas 100% of compounds found in the essential oil from seed of SC were fat acids. Usually, monoterpenes, sesquiterpenes and their oxygenated derivatives are the main components of EOs, though diterpenes and phenylpropanoids can be found to a different extent. Many of these molecules existing in low concentrations, whereas some of them are found in concentration up to 70% of total oil being the main responsible for the biological activities attributed to EOs (Sharifi-Rad et al., 2017).

The main constituents of EBEO were the δ -cadinene (15.88%), trans-caryophyllene (9.77%) e α -Muurolol (9.42%). The same major compounds were identified by Silva et al. (2015) for this plant. Nonetheless, the relative abundance of these constituents differed to some extent from those found in our study, corresponding to 22.6%, 14.4% and 9.34% for δ -cadinene, trans-caryophyllene and α -Muurolol, respectively. Although *E. brejoensis* specimens utilized in our study have the same origin from those used by Silva et al. (2015), the variation on the chemical composition observed for this EO was probably due to the different seasons of year in which the samples were harvested. The HFEO presented trans-caryophyllene (15.24%), bicyclogermacrene (7.33%) e cis-calamenene (7.15%) as major compounds. The HPEO presented trans-caryophyllene (30.91%), followed by the caryophyllene oxide (13.19%) and spathulenol (5.68%). Xanthoxylin (17.20%) was the main constituent of HSEO followed by trans-caryophyllene (14.34%) and methyl-eugenol (5.60%). Thymol (49.81%), carvacrol (31.6 and σ -cimene (10.27%) were identified as the main constituents of LMEO. The octanoic acid (38.83%) dodecanoic acid (38.45%) and decanoic acid (20.51%) were the main SCEO constituents (Table 2). Belviso et al. (2013) also have identified the octanoic acid as the main volatile compound from raw seed of the SCEO. However these authors have also detected the presence of other minor compounds as γ - and δ - lactones, deriving from the fatty acid anabolism pathway not found in our preparation. These differences may be influenced by the extraction

method by which these EOs were obtained. The chemical structures of these compounds were depicted in Figure 1.

Current drugs available for the treatment of Chagas disease, the Benzimidazole (BNZ) and Nifurtimox cause severe adverse side effects due to its high cytotoxicity to mammalian cells. Therefore, establishing the potential cytotoxic effects of EOs is an important issue considering their use as a chemotherapeutic alternative for these drugs (Mohmod et al., 2015). The LMEO was the less cytotoxic with CC_{50} value of about 400.66 $\mu\text{g/mL}$, followed by HFEO ($CC_{50} = 333.71 \mu\text{g/mL}$), HSEO ($CC_{50} = 303.71 \mu\text{g/mL}$), HPEO ($CC_{50} = 261.05 \mu\text{g/mL}$), EBEO ($CC_{50} = 251.4 \mu\text{g/mL}$) and SCEO ($CC_{50} = 244.22 \mu\text{g/mL}$). Ríos et al. (2008) established that EOs presenting $CC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ are considered as having strong cytotoxic activity. Values of CC_{50} between 100 and 500 $\mu\text{g/mL}$ are considered to be moderately toxic. Values between 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ are considered as weak cytotoxic, whereas values greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ were categorized as nontoxic to mammalian cells (Swamy et al., 2017). Accordingly with these criteria all the EOs presented moderate cytotoxicity against mammalian cells. On the other hand, these EOs were considerably less toxic as compared with the reference drug ($CC_{50} = 1.69 \mu\text{g/mL}$) (Table 3).

Haemolytic assay have long been used in many studies to evaluate the potential of drugs to cause damage to the plasma membrane (Costa-Lotufo et al., 2002, Zohra and Fawzia, 2014). Furthermore the haemolytic action contributes for the cytotoxicity of some drugs to mammalian cells. The amphotericin B, used for leishmaniasis treatment, for example is able to induce 50% of haemolysis at 50.8 μM (Rodrigues et al., 2014). In our study none of the EOs presented haemolytic activity at concentrations lower than 125 $\mu\text{g/mL}$, as compared with control cells. However, at high concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$, an increasing haemolytic activity was observed for HSEO (16.7%), HPEO (20.5%) and EBEO (53.4%). The Haemolytic activity of SCEO and LMEO was below to 5% at all concentrations tested. Interestingly, except to EBEO it was not possible to correlate the cytotoxicity of EOs with their haemolytic activity. For instance, SCEO was the second most toxic, but the one that presented the lower haemolytic activity at 250 $\mu\text{g/mL}$ among the oils analysed. Our results suggested that the cytotoxic effect observed for SCEO might be not due to a direct action of this EO on mammalian cell membrane. Conversely, it is highly probable that, at least at concentrations higher than 250 $\mu\text{g/mL}$, the cytotoxic effect observed for EBEO may be attributed to their deleterious effects on the plasma membrane of parasites (Table 3).

Thereafter, the *in vitro* trypanocidal activity of EOs was evaluated against the three evolutive forms of *T. cruzi* and their efficacy compared to the reference drug BNZ. Our results demonstrated that all the tested EOs had an inhibitory dose-dependent effect on epimastigote

forms of *T. cruzi*. The best activity against this evolutive form was obtained for EBEO ($IC_{50/48h} = 29 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$) followed by LMEO ($IC_{50/48h} = 37.6 \pm 5 \mu\text{g/mL}$) and HSEO ($IC_{50/48h} = 42.13 \pm 9.34 \mu\text{g/mL}$) (Table 3). Epimastigote forms of *T. cruzi* can be easily obtained in abundance from axenic culture being useful for preliminary screening of drug efficacy using a variety of approaches. However, the results obtained with this forms may be not actually reflect the efficiency of compounds on the most relevant life cycle stages of parasite present in mammals and responsible by the clinical manifestation of disease: the infective trypomastigotes and intracellular amastigotes (Canavaci et al., 2010). In this regard, we also analysed the effects of EOs on these forms. As in epimastigotes, the EBEO was also the most effective against the trypomastigotes ($CL_{50/24h} = 17.39 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$) and amastigotes ($CC_{50/24h} = 12.5 \pm 1.74 \mu\text{g/mL}$), whereas the less active was the SCEO with values of LC_{50} and IC_{50} of about 182.49 and 408.33 $\mu\text{g/mL}$ for trypto- and amastigote forms, respectively (Table 3).

The treatment of murine peritoneal macrophages infected with *T. cruzi* significantly inhibited the percentage of infected macrophages, as well as the survival of intracellular amastigote forms for all EOs tested (Figure 2). The EBEO was the most effective against amastigote. At 36 $\mu\text{g/mL}$ (corresponding to the LC_{50} value for trypomasitogote) this EO reduces by more than 30% the percentage of infected cells and by 90% the survival index of amastigote into macrophages (Figure 4). The cytotoxicity against peritoneal macrophages and the parasite was compared throughout the Selectivity Index (SI). Higher values of SI, which evaluate the level of selectivity towards *T. cruzi*, indicate that a given compound is promising for developing trypanocidal agents (Silva Júnior et al., 2014). The EBEO and HPEO were the most selective EO presented a $SI > 10$ for both trypto- and amastigote forms. The SCEO was the less selective towards both forms of parasite with $SI = 1.38$ and 0.6 for trypto- and amastigote, respectively. Except for SCEO, the SI towards parasite was always as greater than those found for the reference drug (BNZ) (Table 3).

The cytotoxicity of EOs against pathogens, including *T. cruzi* is well known in the literature (Barros et al., 2016, Borges et al., 2012, Oliveira et al., 2009, Santoro et al., 2007). In this study we identified the trans-caryophyllene as one of most abundant compounds of EBEO, HFEO, HPEO and HSEO, being the main constituent of HFEO and HPEO. Interesting, these oils were those that presented the best SI for trypto- and amastigote forms of *T. cruzi*. The antibacterial (Bernades et al., 2010), antifungal (Kim and Park, 2012) and trypanocidal activities of trans-caryophyllene have been already reported. Izumi et al. (2012) demonstrated that this molecule alone was about 27 times more toxic to intracellular amastigote of *T. cruzi* than mammalian cells. Furthermore, trans-caryophyllene presented low cytotoxicity towards the LLCMK2 cells. In the infective trypomastigote forms this compound altered the parasite

membrane integrity and caused the loss of mitochondrial membrane potential, which lead to desorganization of k-DNA and parasite death. Trans-caryophyllene also has anti-inflammatory, antibacterial and antifungal properties, as well as antileishmanial and antimalarial activities against *L. amazonensis* and *Plasmodium falciparum*, respectively (De Souza et al., 2017)

The EBEO was the most effective against trypomastigote and amastigote forms. The sesquiterpene δ -cadinene, the main constituent of this EO, has been reported as having anti-tumoral activity against ovarian cancer cells. In these cells this compound induced the activation of apoptotic cascade that ultimately lead to necrosis (Hui et al., 2015). Previous study by Costa et al. (2013) identified δ -cadinene as the main constituent of *Annona salzmanni*, which presented antumoral and trypanocidal activities. The cytotoxicity against Vero Cells in this study was similar to those found for macrophages in our work ($CC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$). δ -cadinene alone or in the crude EO of *Ocimum Sanctum* also showed leishmanicidal activity (Zheljazkov et al., 2008).

Xanthoxylin/xanthoxylene, a phenolic compound, was the main constituent of HSEO, the third more effective EO against *T. cruzi*. This molecule was the main antifungal constituent isolated from *Sebastiania schottiana* (Pinheiro et al., 1999) and used as starting point for the synthesis of bioactive molecules, specially chalcone, with antispasmodic (Dos Santos et al., 2006), antifungal (Boek et al., 2005), and leishmanicidal (Boek et al., 2006) activities.

In our study we identify thymol and its isomer carvacrol as the main compounds of LMEO. The EOs bearing these compounds are recognized by their antimicrobial, leishmanicidal and trypanocidal activities (Borges et al., 2012, Carvalho et al., 2013, Escobar et al., 2010). The EOs of *Lippia sidoides* and *L. origanoides* which presented 78.4% and 22% thymol respectively were effective against all the evolutive forms of *T. cruzi* with high selectivity towards trypomastigote (SI=18.7) and amastigote forms (SI=4.6) (Borges et al., 2012). The importance of hydroxyl group for the biological activity of thymol and carvacrol has been reported (Xu et al., 2008). The phenolic hydroxyl group increases the hydrophilic ability of these molecules helping them to destabilize the plasma membrane of pathogens as bacteria, fungi and protozoan. However, Santoro et al. (2007) reported that the effect of thymol on *T. cruzi* was due to its interaction with intracellular metabolic pathways or organelles, rather than a direct effect of this molecule on the parasite membrane.

Although the SCEO was very toxic to both mammalian cells and parasite, resulting in lower SI, the useful effects of their major constituent octanoic acid has been reported. According with Kim and Rhee (2015, 2013) the antimicrobial activity of octanoic acid is due to the disruption of bacterial plasma membrane. The high affinity of octanoic and dodecanoic acids towards the pathogen membrane has been also used to enhance the uptake of antimicrobial and

antitumoral compounds. In this sense, further investigations using the octanoic and dodecanoic acids alone are needed to highlight the mechanism underlying the cytotoxic effects of SCEO.

It is usually assumed that the biological activities of EOs are due to their major compounds. However, it cannot be ruled out the possibility of less abundant molecules in the EO to be more effective than the major compounds (Yap et al., 2014). Indeed, Zheljazkov et al. (2008) showed that the minor constituents as δ -cadinene, found in the EO from basil, have the strongest inhibitory effects against *Leishmania donovani*. On the other hand, the major constituents (-)-linalool, eugenol, and methylchavicol of *O. basilicum* and *O. sanctum* did not show any antileishmanial activity when tested alone. In this regard, further studies are still necessary to identify the main constituent responsible for the trypanocidal effect of EOs and to better characterize their intracellular targets in *T. cruzi*.

4. Conclusion

Taken together, the results obtained herein indicate the essential oils from Caatinga plants, especially *Eugenia brejoensis*, as promissory agents for the treatment of parasitic diseases opening perspectives to development of new drugs against Chagas disease.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest associated with this project.

Funding

This work has been supported by FACEPE, CAPES and CPqAM.

References

- Almeida, C.F.C.B.R., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., Maia, M.B., 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2,1-7.
- Araújo, C.S., De Oliveira, A.P., Lima, R.N., Alves, P.B., Diniz, T.C., Da Silva Almeida J.R.G., 2015. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Pharmacognosy Magazine* 11,615-8.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Barros, L.M., Duarte, A.E., Morais-Braga, M.F.B., Waczuk, E.P., Vega, C., Leite, N.F., De Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Rocha, J.B.T., Kamdem, J.P., 2016. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana câmara* L. (Verbenaceae) essential oil. *Molecules* v10. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020209>.
- Beaumier, C.M., Gillespie, P.M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine* 34, 2996-3000.
- Belviso, S., Ghirardello, D., Giordano, M., Ribeiro, G.S., Alves, J.S., Parodi, S., Risso, S., Zeppa, G., 2013. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. *Food Research International* 51, 39-45.
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J.P., Palma, S., 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica* 156, 1-16.
- Bernardes, W.A., Lucarini, R., Tozatti, M.G., Flauzino, L.G., Souza, M.G., Turatti, I.C., Andrade e Silva, M.L., Martins, C.H., Da Silva Filho, A.A., Cunha, W.R. 2010. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 65, 588-93.
- Bessa, C.M.A.S., Nascimento, R.S., Alves, R.C.C., Anselmo, J.M., Silva, A.P.S., Silva, A.G., Lima, V.L.M., Tavares, J.F., Silva, L.C.N., Silva, M.V., Correia, M.T.S., 2016. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 10,310-317.
- Biasi-Garbin, R.P., Demitto, F.O., Amaral, R.C.R., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., Svidzinski, T.I.E., Baeza, L.C., Yamada-Ogatta, S.F. 2016. Antifungal potential of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* v.18, <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658018>
- Boeck, P., Bandeira Falcão, C.A., Leal, P.C., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Torres-Santos, E.C., Rossi-Bergmann, B., 2006. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14,1538-45.
- Boeck, P., Leal, P.C., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., López, S., Sortino, M., Escalante, A., Furlán, R.L., Zacchino, S., 2005. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. *Archiv der Pharmazie* 338, 87-95.

Borges, A.R., Aires, J.R., Higino, T.M., De Medeiros, M.D., Citó, A.M., Lopes, J.A., De Figueiredo, R.C., 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology* 132, 123–128.

Canavaci, A.M., Bustamante, J.M., Padilla, A.M., Perez Brandan, C.M., Simpson, L.J., XU, D., Boehlke, C.L., Tarleton, R.L. 2010. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLOS Neglected Tropical Diseases* v13, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000740>

Carvalho, R.R.C., Laranjeira, D., Carvalho Filho, J.L.S. 2013. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. *Quimica Nova*. 36, 241-244.

Conceição, A.O., Oliveira, F.F., DE Oliveira, R.A., Takser, L., Reyes-Moreno, C., Lafond, J. 2012. *Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) ethanolic extract induces activation of ERK1/2 and p38 MAPKs pathway and Ca²⁺ imbalance in human trophoblasts derived cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1001-1012.

Costa, E.V., Dutra, L.M., Salvador, M.J., Ribeiro, L.H., Gadelha, F.R., Carvalho, J.E., 2013. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickleii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. *Natural Product Research* 27,997-1001.

Costa-Lotufo, L.V., Cunha, G.M., Farias, P.A., Viana, G.S., Cunha, K.M., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa N.V., Rao V.S., 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40,1231-234.

Cucunabá, Z.M., Okuwoga, O., Basáñez, M.G., Nouvellet, P., 2016. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* v. 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1315-x>.

David, J.P., Meira, M., David, J.M., Brandão, H.N., Branco, A., de Fátima Agra, M., Barbosa, M.R., Queiroz, L.P., Giulietti, A.M., 2007. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*. 78, 215-218.

de Souza, G.A., da Silva, N.C., de Souza, J., de Oliveira, K.R., da Fonseca, A.L., Baratto, L.C., de Oliveira, E.C., Varotti, F.P., Moraes, W.P., 2016. In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. *Phytomedicine* 15,111-118.

Dhifi, W, Bellili, S, Jazzi, S, Bahloul, N, Mnif, W., 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* v.3, <http://dx.doi.org/10.3390/medicines3040025>

dos Santos, R., Kuhnen, C.A., Yunes, R.A., 2006. Molecular structure and QSAR study on antispasmodic activity of some xanthoxyline derivatives. *Archiv der Pharmazie* 339, 227-37.

Escobar, P., Leal, 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 184-190.

Falcão, D.Q., Menezes, F.S. 2003. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 84, 69-74.

Hughes, A.F.S., Lima, F.G., Lucchese, A.M., Goes Neto, A., Uetanabaro, A.P.T., 2013. Antimicrobial Activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56, 269-274.

Hui, L.M., Zhao, G.D., Zhao, J.J., 2015. δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 6046-56.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V., 2012. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 2994-3001.

Kim, E., Park, I.K., 2012. Fumigant antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. *Molecules* 17,10459-69.

Kim, S.A., Rhee, M.S., 2013. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 79,6552-60.

Kim, S.A., Rhee, M.S., 2015. Use of caprylic acid to control pathogens (*Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) in apple juice at mild heat temperature. *Journal of Applied Microbiology* 119, 1317-23.

Melo, B.A., Molina-Rugama, A.J., Haddi K., Leite, D.T., Oliveira, E.E., 2015. Repellency and Bioactivity of Caatinga Biome Plant Powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Florida Entomologist* 98,417-423.

Melo, J.G., Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Cabral, D.L.V., Rodrigues, M.D., Nascimento, S., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2010. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules* 15, 8534-8542.

Mendes, S.S., Bomfim, R.R., Jesus, H.C., Alves, P.B., Blank, A.F., Estevam, C.S., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M., 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 391-7.

- Menezes, I.A.C., Marques, M.S., Santos, T.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R., 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia* 78, 192–195.
- Mohmod, A.L., Krishnasamy, G., Adenan, M.I., 2015. Malaysian plants with potential *in vitro* trypanocidal activity. *Annals of Phytomedicine*. 4, 6-16.
- Mota, M.L., Lobo, L.T., Costa, J.M., Costa, L.S., Rocha, H.A., Rocha e Silva, L.F., Pohlitz, A.M., Neto, V.F., 2012. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Médica* 78, 658-64.
- Nascimento, P.F., Alviano, W.S., Nascimento, A.L., Santos, P.O., Arrigoni-Blank, M.F., de Jesus, R.A., Azevedo, V.G., Alviano, D.S., Bolognese, A.M., Trindade, R.C., 2008. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Diseases* 14, 485-9.
- Oliveira V.C., Moura D.M., Lopes J.A., de Andrade P.P., da Silva N.H., Figueiredo R.C., 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. *Parasitology Research* 104, 1053-1059.
- Oliveira, G.S.A., Oliveira, F.F., Oliveira, M.C.H., Uetanabaro, A.P.T., Sousa, Z.L., Andrioli, J.L., 2013. In vitro Antifungal Activity of *Irlbachia purpurascens*, *Lantana macrophylla* and *Kielmeyera neglecta* Extracts Against *Candida* Isolates Collected from Patients with Vulvovaginal Candidiasis. *Research Journal of Medicinal Plant*. 7, 141-149.
- Paiva, D.C.C., Santos, C.A., Diniz, J.C., Viana, F.A., Thomazzi, S.M., Falcão, D.A., 2013. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. *Journal of Ethnopharmacology* 149, 416-421.
- Paula, J.C., Desoti, V.C., Sampiron, E.G., Martins, S.C., Ueda-Nakamura, T., Ribeiro, S.M., Bianco, E.M., Silva, S.O., Oliveira, G.G., Nakamura, C.V., 2015. Trypanocidal activity of organic extracts from the brazilian and spanish marine sponges. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25, 651–656.
- Piatkowska, E., Rusiecka-Ziółkowska, J., 2016. Influence of Essential Oils on Infectious Agents. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 25, 989-995.
- Pinheiro, T.R., Yunesa, R.A., López, S.N., Santecchia, C.B., Zacchino, S.A.S., Cechinel Filho, V. 1999. In vitro Antifungal Evaluation and Studies on the Mode of Action of Xanthoxyline Derivatives. *Arzneimittel forschung* 49, 1039-1043.
- Queiroz, A.C., Dias, T.L.M.F., Matta, C.B.B., Silva, L.H.A.C., Araújo Júnior, J.X., Araújo, G.B., Moura, F.B.P., Alexandre-Moreira, M.S., 2014. Antileishmanial Activity of Medicinal

Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/478290>.

Raymundo, L.J., Guilhon, C.C., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Antonioli, A.R., Cavalcanti, S.C., Alves, P.B., Alviano, C.S., Fernandes, P.D., 2011. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. Journal of Ethnopharmacology 134, 725-32.

Rios, Y.K., Otero, A.C., Muñoz, D.L., Echeverry, M., Robledo, S.M., Yepes, M.A. 2008. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas 37, 200-211.

Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Gomes, M.T., Silva, D.O., Antoniassi, R., Silva, A.J.R., Bizzo, H.R., Alviano, C.S., Vermelho, A.B., Rosa, M.S.S., 2011. In vitro anti-Leishmania amazonensis activity of the polymeric procyanidinrich aqueous extract from *Syagrus coronata*. Journal of Medicinal Plants Research 5, 3781-3790.

Rodrigues, J.H.S., Ueda-Nakamura, T., Corrêa, A.G., Sangi, D.P., Nakamura, C.V., 2014. A Quinoxaline Derivative as a Potent Chemotherapeutic Agent, Alone or in Combination with Benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. PlosOne v. 2014, <http://dx.doi.org/doi:10.1371/0085706>

Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G., Freire, J.M., Soares, M.J., 2007. 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 134, 1649-2656.

Santos, M.R.V., Carvalho, A.A., Medeiros, I.A., Alves, P.B., Marchioro, M., Antonioli, A.R. 2007. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. Fitoterapia 78, 186–191.

Santos, S.N., Castanha, R.F., Silva, L.J., Marques, M.O.M., Scramin, S., Melo, I.S., 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Hyptis leucocephala*. Ata de Saúde Ambiental 3, 3-11.

Sena, S.A.S., Oliveira, L.M., Dantas, M.C.S.M., Jesus, K.N.S., Araújo, F.M., Ferraz, C.G., Watanabe, Y.N., Jesus, B.O., Souza Neta, L.C., Silva e Silva, L., 2012. Avaliação quanto à atividade antibacteriana dos óleos voláteis e extratos das espécies de Alecrim da Comunidade de Três Lagoas – BA. 52º Congresso Brasileiro de Química.

Sharifi-Rad, J., Surede, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S.A., Iriti, M., 2017. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. Molecules v.70, <http://dx.doi.org/doi:10.3390/molecules22010070>.

- Silva Júnior, E.N., Jardim, G.A.M., Menna-Barreto, R.F.S., Castro, S.L., 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds: Our Contribution for the Evaluation and Insights on the Mode of Action of Naphthoquinones and Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25, 1780-1798.
- Silva Trentin, D., Rigon Zimmer, K., Vanusa Silva, M., Brandt Giordani, R., Macedo, A.J., 2014. Medicinal Plants From Brazilian Caatinga: Antibiofilm And Antibacterial Activities Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Caatinga* 27, 264-271.
- Silva, A.G., Alves, R.C.C., Bezerra Filho, C. M., Bezerra-Silva, P. C., Santos, L.M.M., Foglio, M.A., Navarro, D.M.A.F., Silva, M.V., Correia, M.T.S., 2015. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from Leaves of *Eugenia brejoensis* Mazine (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18, 1441-1447.
- Silva, C.M.A., Costa, B.M.S., Silva, A.G., Souza, E.B., Silva, M.V., Correia, M.T.S., Silva, A.P.S., Lima, V.L.M., 2016. Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 10, 578-583.
- Silva, L.C., Sandes, J.M., DE Paiva, M.M., DE Araújo, J.M., DE Figueiredo, R.C., DA Silva, M.V., Correia, M.T., 2013. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Natural Product Research* 27, 1492-1496.
- Silva, R.L., Melo, G.B., Antonioli, A.R., Lima, S.O., Melo, V.A., Ramalho, F.S., Ramalho, L.N.Z., Zucoloto, S., Silva Júnior, O.C., 2002. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cirúrgica Brasileira* 17, 101-105.
- Souza Júnior, A.J., Oliveira, R.A., Schmitt, A.C., Oliveira, F.F., 2005. Avaliação da Atividade antimicrobiana dos Extratos etanólicos de *Lantana macrophyllae* e *Aeagiphyla vitelliniflora*, Verbenaceae. XII Seminário de Iniciação Científica da UESC.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* v.2016, <http://dx.doi.org/doi:10.1155/2016/3012462>.
- Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Silva, A.G., Silva, M.V., Correia, M.T.S, Baumvol, I.J.R., Macedo, A.J., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 327-335.
- Vila-nova, N.S., Morais, S.M., Falcão, M.J.C., Bevilaqua, C.M.L., Rondon, F.C.M., Wilson, M.E., Vieira, I.G.P., Andrade, H.F., 2012. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 1164-1168.

- WHO - World Health Organization. (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf
- Xu, J., Ji, B.P., Sei, R.S., Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *E. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47,174-179.
- Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, H.E., 2014. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal* 8, 6-14.
- Zheljazkov, V.D., Cantrell, C.L., Tekwani, B., Khan, S.I., 2008. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 380-5.
- Zohra, M., Fawzia, A., 2014. Hemolytic Activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Science and Research* 5:495-500.

Table 1 – Some of most important biological activities of EOs and extracts from *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis salzmanni*, *Lippia macrophylla* and *Syagrus coronata* and their use in the folk medicine.

Family	Scientific name	Voucher no.	Common name	Biological activity	Traditional use	References
Myrtaceae	<i>Eugenia brejoensis</i>	IPA 93,702	Cutia	Antimicrobial (aqueous extract/leaves) and larvicidal (essential oil/leaves)	Diarrhoea, dysentery, pain and fever.	Silva Tretin et al., 2014, Silva et al., 2015, Silva et al., 2016
	<i>Eplingiella fruticosa</i> (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore <i>Hyptis fruticosa</i> (sin.)	IPA 93,706	Alecrim de tabuleiro or Alecrim do vaqueiro	Hypotensive, antinociceptive and antimicrobial activities (essential oil/leaves)	Analgesic and anticonvulsive	Santos et al., 2007, Menezes et al., 2007, Santiago de Sena et al., 2012
Laminaceae	<i>Mesosphaerum pectinatum</i> (L.) Kuntze <i>Hyptis pectinata</i> (sin.)	IPA 93,609	Sambacaitá or Canudinho	Antibacterial, antinociceptive, anti-inflammatory (essential oil/leaves) and leishmanicidal (aqueous extract/leaves)	Rhinopharyngitis, nasal congestion and skin diseases, gastric problems and fever, bacterial and fungal infections	Nascimento et al., 2008, Raymundo et al., 2011, Queiroz et al., 2014
	<i>Hyptenia salzmanni</i> (Benth.) Harley	IPA 93,612	Canela de urubu	Antibacterial and antioxidant (methanolic extract/leaves)	Diseases of the respiratory tract	Falcão, Galvão, 2003, David et al., 2007
Verbenaceae	<i>Lippia macrophylla</i> Cham.	IPA 93,622	Camará, camará or camará-vermelho	Antifungal and antibacterial (ethanolic extract/leaves)	Menstrual and respiratory disorders	Souza Júnior et al., 2005, Oliveira et al., 2013
	<i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Beccari	IPA 93,654	Ouricuri or licuri	Antibacterial (essencial oil, aqueous and methanolic extract/ripe fruits) and leishmanicidal (aqueous extracts/fruits)	Snake bites, eye inflammation, dysentery, cataract, mycoses and wound healing.	Rodrigues et al., 2011, Hughes et al., 2013, Bessa et al., 2016

Table 2. Chemical composition of the essential oils from *Eugenia brejoensis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata*, *Hypernia salzmannii*, *Lippia macrophylla* and *Syagrus coronata*.

Nº	Composto	Kratz		Kovatz		Composition (in % of the total of oil)					
		Calc	Lit ⁽¹⁾	Calc	Lit ⁽¹⁾	EB	HF	HP	HS	LM	SC
1	<i>n</i> -Nonane	898	900	898	900	-	0.53	-	-	-	-
2	α -Thujene	925	924	928	930	-	-	0.71	0.12	-	-
3	Cyclohexane. propyl-	926	927 (2)	930	-	-	0.47	-	-	-	-
4	α -Pinene	931	932	935	939	-	1.73	0.72	0.87	-	-
5	Camphene	945	946	950	954	-	0.24	0.11	-	-	-
6	Sabinene	971	969	975	975	-	-	3.04	0.13	-	-
7	β -Pinene	974	974	977	979	-	0.77	3.34	4.52	-	-
8	Octanone <3->	979	979	982	983	-	-	0.27	0.69	-	-
9	Myrcene	991	988	992	990	-	-	-	-	1.01	-
10	Mesitylene	992	994	992	995	-	0.66	-	-	-	-
11	<i>n</i> -Decane	1000	1000	1000	1000	-	1.12	-	-	-	-
12	Mentha-1(7),8-diene <p->	1002	1003	1003	1004	-	-	-	0.27	-	-
13	δ -3-Carene	1009	1008	1010	1011	-	-	-	0.21	-	-
14	Trimethyl benzene	1021	1021	1023	1025	-	0.40	-	-	-	-
15	<i>o</i> -Cymene	1023	1022	1026	1026	-	0.78	3.15	1.63	10.27	-
16	Limonene	1027	1024	1030	1029	-	-	0.58	-	-	-
17	β -Phellandrene	1028	1025	1031	1029	-	0.50	-	4.09	-	-
18	Naphthalene. decahydro-. trans-	1052	1053	1055	1059	-	0.38	-	-	-	-
19	Benzene. 1-ethyl-3,5- dimethyl-	1058	-	1061	1058	-	0.21	-	-	-	-
20	γ -Terpinene	1059	1054	1062	1059	-	-	-	0.10	1.62	-
21	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1066	1065	1069	1070	-	-	0.32	-	-	-
22	Fenchone	1087	1083	1089	1086	-	-	1.39	0.34	-	-
23	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1097	1098	1098	0198	-	-	0.26	-	-	-
24	<i>n</i> -Undecane	1101	1100	1101	1100	-	0.88	-	-	-	-
25	<i>trans</i> -Thujone	1108	1112	1109	1114	-	0.12	-	-	-	-
26	Camphor	1144	1141	1147	1146	-	0.96	0.11	-	-	-
27	Terpinene-4-ol	1178	1174	1180	1177	-	0.15	0.62	0.21	0.44	-
28	Cymen-8-ol <p->	1186	1179	1187	1182	-	-	0.13	-	-	-
29	Cryptone	1186	1183	1188	1185	-	-	-	0.22	-	-
30	α -Terpineol	1191	1186	1192	1188	-	0.11	-	0.18	-	-
31	Octanoic acid	1194	1167	1195	1171	-	-	-	-	-	38.83
32	<i>n</i> -Dodecane	1201	1200	1201	1200	-	0.10	-	-	-	-
33	Thymol. methyl ether	1236	1232	1238	1235	-	-	-	-	0.27	-
34	Thymol	1294	1289	1294	1290	-	-	-	-	49.81	-
35	Carvacrol	1303	1298	1303	1299	-	-	-	-	31.62	-
36	δ -Elemene	1340	1335	1341	1338	-	0.23	1.55	-	-	-
37	α -Cubebene	1352	1348	1354	1351	0.67	2.16	0.10	0.13	-	-
38	Thymol acetate	1356	1349	1358	1352	-	-	-	-	1.68	-
39	Cyclosativene	1370	1369	1372	1371	-	0.15	-	-	-	-
40	α -Ylangene	1374	1373	1375	1375	-	-	-	0.18	-	-
41	Carvacrol acetate	1375	1370	1376	1372	-	-	-	-	1.36	-
42	α -Copaene	1379	1374	1380	1376	1.36	4.66	1.13	0.91	-	-
43	α -Funebrene	1383	1380	1384	1382	-	-	-	0.10	-	-
44	β -Bourbonene	1388	1387	1388	1388	-	0.19	1.02	1.77	-	-
45	Decanoic acid	1388	1364	1389	1366	-	-	-	-	-	20.51
46	β -Cubebene	1393	1387	1393	1388	-	0.54	-	-	-	-
47	β -Elemene	1395	1389	1395	1390	0.73	0.95	2.31	0.91	-	-
48	<i>cis</i> -Jasmone	1401	1392	1401	1392	-	-	-	0.14	-	-
49	Methyl Eugenol	1407	1403	1407	1403	-	-	-	5.60	-	-
50	α -Gurjunene	1413	1409	1413	1409	1.77	-	-	0.27	-	-
51	α -Cedrene	1415	1410	1416	1411	-	-	0.62	-	-	-
52	<i>trans</i> -Caryophyllene	1423	1417	1424	1419	9.77	15.24	30.91	14.34	0.47	-
53	β -Copaene	1432	1430	1434	1432	0.46	0.16	0.20	0.42	-	-
54	β -Gurjunene	1435	1431	1436	1433	-	-	-	0.08	-	-
55	Bergamotene < α - <i>trans</i> ->	1438	1432	1440	1434	-	-	-	0.09	-	-
56	Aromadendrene	1442	1439	1444	1441	1.88	0.58	0.08	0.91	-	-
57	Myltayl-4(12)-ene	1446	1445	1448	1447	-	-	0.28	-	-	-
58	α -Himachalene	1447	1449	1448	1451	0.23	-	-	0.22	-	-
59	Muurola-3,5-diene < <i>trans</i> ->	1454	1451	1456	1453	-	0.50	-	-	-	-
60	α -Humulene	1457	1452	1459	1454	1.60	3.41	1.57	0.74	-	-
61	Aromadendrene <allo->	1463	1458	1464	1460	-	0.10	-	-	-	-

62	Ageratochromene <6-demethoxy->	1464	1461	1466	1463	-	-	0.16	-	-	-
63	Caryophyllene <9-epi-(e)->	1465	1464	1466	1466	2.01	0.27	-	0.41	-	-
64	Muurolo-4(14).5-diene <cis->	1466	1465	1468	1466	-	-	-	0.11	-	-
65	β -Acoradiene	1470	1469	1471	1479	-	-	0.17	0.26	-	-
66	Cadina-1(6).4-diene <trans->	1477	1475	1478	1476	0.45	-	-	-	-	-
67	γ -Muurolole	1480	1478	1481	1479	2.18	0.43	0.58	2.19	-	-
68	Germacrene D	1485	1480	1486	1481	-	3.84	4.47	3.87	-	-
69	Butylated hydroxyanisole	1487	1488	1487	1489	-	-	-	-	0.40	-
70	β -Selinene	1490	1489	1490	1490	1.40	0.11	0.37	0.60	-	-
71	Muurolo-4(14).5-diene <trans->	1496	1493	1496	1493	0.44	0.45	-	-	-	-
72	Viridiflorene	1499	1496	1499	1496	-	-	-	4.60	-	-
73	Bicyclogermacrene	1500	1500	1500	1500	5.13	7.33	1.46	-	-	-
74	α -Muurolole	1504	1500	1504	1500	3.68	0.55	0.29	1.29	-	-
75	Germacrene A	1509	1508	1510	1509	-	0.26	0.32	0.22	-	-
76	β -Bisabolene	1512	1505	1512	1505	-	-	-	-	0.32	-
77	γ -Cadinene	1518	1513	1519	1513	5.78	0.94	0.47	1.88	-	-
78	Spiroetiva-1(10).7(11)-diene	1521	-	1522	1523	-	-	0.56	-	-	-
79	δ -Cadinene	1527	1522	1528	1523	15.88	-	1.32	3.89	-	-
80	Dodecanoic acid, methyl ester	1527	1524	1528	1525	-	-	-	-	-	0.07
81	cis-Calamenene	1527	1521	1528	1522	-	7.15	-	-	-	-
82	Cadina-1.4-diene <trans->	1536	1533	1537	1534	0.24	1.21	-	0.09	-	-
83	α -Cadinene	1542	1537	1543	1538	0.93	0.12	0.37	0.54	-	-
84	α -Calacorene	1547	1544	1548	1545	0.60	-	-	0.25	-	-
85	Elemol	1553	1548	1554	1549	-	0.27	-	-	-	-
86	Germacrene B	1561	1559	1562	1561	-	-	0.36	-	-	-
87	Nerolidol <(E)->	1567	1561	1568	1563	-	-	0.24	-	-	-
88	β -Calacorene	1567	1564	1568	1565	-	-	-	0.09	-	-
89	Palustrol	1572	1567	1573	1568	0.83	0.24	0.17	0.91	-	-
90	Spathulenol	1582	1577	1583	1578	7.84	5.86	5.68	2.89	-	-
91	Dodecanoic acid	1583	1565	1584	1566	-	-	-	-	-	38.45
92	Caryophyllene oxide	1588	1582	1588	1583	4.61	2.92	13.19	5.45	0.74	-
93	Viridiflorol	1596	1592	1596	1592	0.70	2.18	1.45	0.72	-	-
94	Guaiol	1602	1600	1602	1600	1.14	0.38	-	-	-	-
95	Ledol	1607	1602	1607	1602	1.98	-	-	0.25	-	-
96	β -Oplopenone	1613	1607	1614	1607	0.63	-	-	-	-	-
97	Humulene epoxide II	1614	1608	1614	1608	-	0.32	0.46	0.23	-	-
98	Cubenol <1.10-di-epi->	1619	1618	1620	1619	0.59	0.68	0.23	0.27	-	-
99	Junenol	1623	1618	1623	1619	-	-	0.33	-	-	-
100	Eremoligenol	1630	1629	1631	1631	-	-	0.22	-	-	-
101	γ -Eudesmol	1636	1630	1637	1632	-	0.83	-	0.16	-	-
102	Aromadendrene epoxide <allo->	1642	1639	1643	1641	0.68	-	-	-	-	-
103	α -Muurolol	1645	1644	1646	1646	9.42	1.99	3.48	1.85	-	-
104	α -Eudesmol	1655	1652	1656	1653	-	1.50	-	-	-	-
105	α -Cadinol	1659	1652	1660	1654	8.33	1.14	1.55	1.75	-	-
106	Ageratochromene	1663	1658	1664	1660	-	-	1.25	-	-	-
107	Calamenen-10-ol <cis->	1664	1660	1665	1661	-	-	-	0.32	-	-
108	Calamenen-10-ol <trans->	1672	1668	1673	1669	0.57	-	-	-	-	-
109	Xanthoxylin	1677	1675	1678	-	-	-	-	17.20	-	-
110	Tetradecanoic acid	1768	1767	1768	-	-	-	-	0.15	-	1.99
111	Benzeneacetic acid, 2-phenylethyl ester	1917	1913	1918	1913	-	-	0.19	-	-	-
112	Farnesyl acetone	1921	1913	1921	1913	-	-	0.37	-	-	-
113	Hexadecanoic acid	1964	1959	1965	1960	-	-	0.22	1.45	-	0.15
114	9.12.15-Octadecatrienoic acid (Z,Z,Z)-	2142	-	2142	2143	-	-	-	0.84	-	-
115	Phytol acetate	2221	2218	2220	2218	-	-	-	0.10	-	-
115 of 163											
Undetified compounds						5.46	19.03	5.23	4.62	-	-
Identified compounds						94.51	79.95	94.45	95.22	100	100
Total						99.97	98.98	99.68	99.84	100	100

^a Constituents listed in the order of elution in a non-polar DB-5 column, ^b Retention indices (RI) calculated from retention times in relation to those of a series of C₈-C₃₀ n-alkanes on a 30 m DB-5 capillary column, ^c Values taken from Adams²⁹, - Not detected. Numbers between brackets indicate the number of compounds of a given class.

Figure 1 - Chemical structures of major molecules present in essential oils of *Eugenia brejoensis*, *Hyptis pectinata*, *Hypenia salzmanni*, *Lippia macrophylla* and *Syagrus coronata*

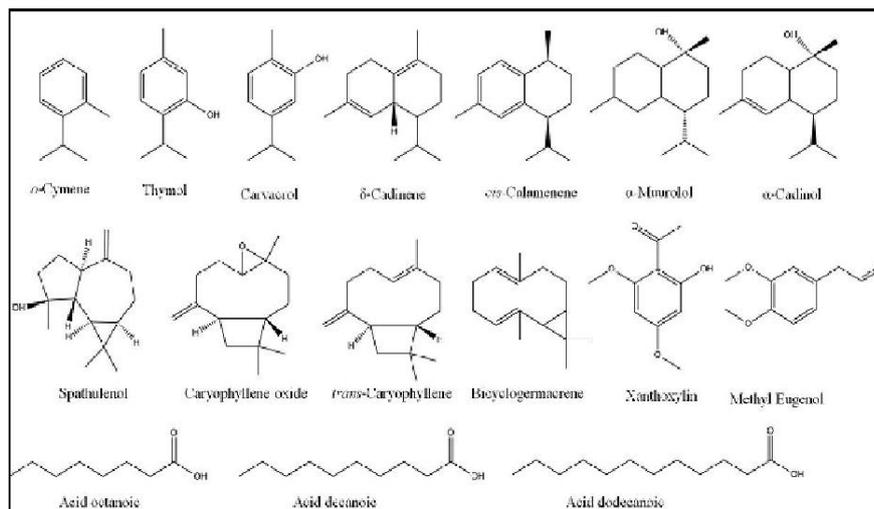
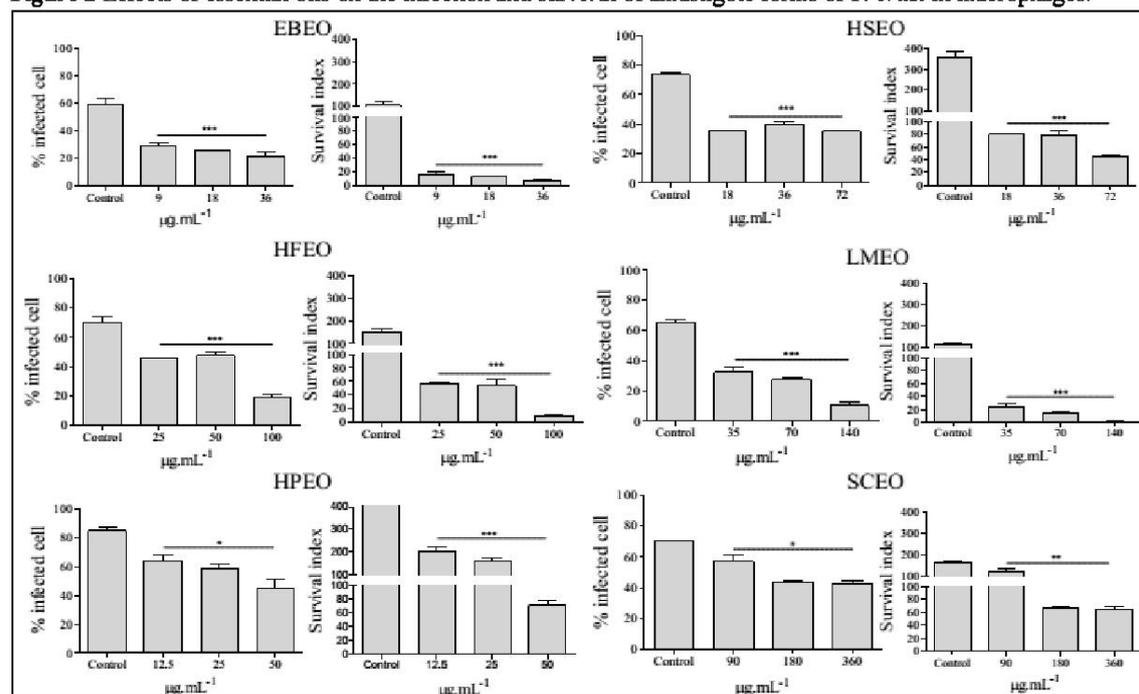


Table 3. In vitro tripanocidal and cytotoxic activities of essential oils from Caatinga plant species.

Essencial Oil	Concentration $\mu\text{g/mL}$				Selectivity Index (SI)	
	Epimastigote IC_{50}	Trypomastigote CL_{50}	Macrophages CC_{50}	Amastigote IC_{50}	Trypomastigote	Amastigote
EBEO	29 \pm 4.5	17.39 \pm 0.62	251.4 \pm 44.3	12.5 \pm 1,74	14.45	20.11
HFEO	57.8 \pm 9	49.3 \pm 5.5	333.71 \pm 40.41	53.7 \pm 7.8	6.76	6.2
HPBO	56.1 \pm 17	25.64 \pm 3.26	261.05 \pm 53.67	25.5 \pm 0.5	10.18	10.2
HSBO	42.13 \pm 9.34	36.27 \pm 3.2	303.71 \pm 44.10	35.25 \pm 3.07	8.37	8.6
LMEO	37.6 \pm 5	70.6 \pm 7.5	400.66 \pm 11.36	51.76 \pm 5.65	5.67	7.7
SCBO	100.6 \pm 38	182.49 \pm 58.05	244.22 \pm 24.35	408.33 \pm 23.36	1.38	0.6
Bnz ^a	-	0.8 \pm 0.18	1.69 \pm 0.3	1.36 \pm 0.4	2.11	1.2

^aBnz= Benznidazole, the reference drug for Chagas disease

Figure 2 Effects of essential oils on the infection and survival of amastigote forms of *T. cruzi* in macrophages.



The data are presented as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

APÊNDICE B



Free Radical Research



ISSN: 1071-5762 (Print) 1029-2470 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ifra20>

In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products

Luís Cláudio Nascimento da Silva, Clovis Macêdo Bezerra Filho, Raiana Apolinário de Paula, Cristiane Santos Silva e Silva, Larissa Isabela Oliveira de Souza, Márcia Vanusa da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia & Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

To cite this article: Luís Cláudio Nascimento da Silva, Clovis Macêdo Bezerra Filho, Raiana Apolinário de Paula, Cristiane Santos Silva e Silva, Larissa Isabela Oliveira de Souza, Márcia Vanusa da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia & Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo (2016): In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products, Free Radical Research

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10715762.2016.1193668>



Accepted author version posted online: 24 May 2016.
Published online: 24 May 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ifra20>

In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products

Several plant-derived compounds have been screened by antioxidant assays, but many of these results are questionable, since they do not evaluate the pharmacologic parameters. In fact, the development of better antioxidants stills a great challenge. In vitro cell-based assays have been employed to assess the antioxidant effect of various compounds at subcellular level. Cell-based assays can also reveal compounds able to enhance the antioxidant pathways, but without direct radical scavenging action (which could not be detected by traditional assays). These methodologies are general of easy implementation and reproducible making them suitable for the early stages of drug discovery. Hydrogen peroxide, a nonradical derivative of oxygen, can be employed as an oxidative agent in these assays due its biochemical properties (presence in all biological systems, solubility) and capacity of induction cell death. Truthfully, if their limitations are understood (such as difference on cell metabolism when in in vitro conditions), these cell-based assays can provide useful information about the pathways involved in the protective effects of phytochemicals against cell death induced by oxidative stress, which can be exploited to develop new therapeutic approaches.

Keywords: natural products, oxidative stress, cell culture, molecular tools.

JUST ACCEPTED

1. Introduction

Free radicals (FR) have the ability to exist independently even containing one or more unpaired electrons in its orbital, which makes them highly reactive and able to interact with any adjacent molecules. These compounds are formed by redox reactions working as donor or acceptor of electrons [1], during the cell respiration, exposition to exogenous factors such as radiation, tobacco and other toxic compounds and high intake of saturated fats (fried foods, sausages etc.) and certain medications [2-5]. FR are also crucial in the defense against invading microorganisms and cancerous cells). FR are derived mainly from oxygen and therefore collectively referred as "reactive oxygen species" (ROS). ROS can also refer to species that are not FR, but some molecules derived from oxygen capable of generating FR, such as hydrogen peroxide (H_2O_2). Among the ROS, the superoxide radical ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxyl radical ($\bullet\text{HO}$) and H_2O_2 are formed in all aerobic cells [3]. Free radicals can also be classified as Reactive Nitrogen Species (RNS) and Sulfur Reactive Species (ERS) [6].

The balance between the factors that promote oxidation and the action of antioxidant defense mechanisms (including enzymatic and non-enzymatic components) is extremely important in all biological systems to minimize the FR levels whereas allow them to perform their physiological functions [2]. However, as the antioxidant defenses cannot completely remove all FR, the organisms developed different mechanisms to repair or replace the oxidative damaged molecules [1]. The excess of reactive species (caused either by the increase of their production and/or lack or fail of the defense mechanisms) may lead to damage biological macromolecules (such as lipids, proteins and DNA), impairing the homeostatic balance and causing oxidative stress [7,8]. The accumulated damage on cellular components may contribute to the degeneration of somatic cells and the induction of pathologies, especially those associated with aging, cancer and Alzheimer's disease. The role of free radicals in many pathological conditions is still unclear as they do harm in some ways and good in others. For example, during chronic inflammatory diseases, they cause tissue damage but can also act as modulators of inflammation, helping to resolve it [9].

When an oxidative imbalance occurs is often indicated the use of exogenous antioxidant substances, including most importantly the plant secondary metabolites [10]. These compounds are able to delay the oxidation of molecules by inhibiting the formation (or interrupting the propagation) of free radicals. They can be also produced by the organism itself as part of its enzymatic antioxidant defense (reduced glutathione, superoxide dismutase, etc.) or acquired as food

and/or dietary supplement [1]. Once in the body, an antioxidant compound can act (1) inhibiting the oxidant enzymes, leading to a reduction of free radicals production; (2) interacting with redox signaling pathways increasing the cellular antioxidant response; (3) directing the inactivation of ROS/RNS [11] (Fig. 1).

Several *in vitro* methods are traditionally used to assess the antioxidant activity of plant compounds. These methods are based on chemical reactions using different types of solvents and molecules as control. Despite the importance of these techniques in the prospection of potential antioxidant molecules, the therapeutic effectiveness of these substances *in vivo* is still controversial [12]. The advances brought by cell and molecular biology techniques, made possible to assess directly the effects of new antioxidants candidates using cell and organism models. Besides making possible the study of the antioxidant action mechanism involved at subcellular level, *in vitro* cell-based assays provide an additional advantage of assessing the potential toxicity of the tested compound [13]. This review discusses the advantages of cell-based methods for the evaluation of antioxidant activity of plant-derived compounds, using hydrogen peroxide as an oxidative agent. Because the antioxidant research has a great impact in the field of basic science and in food, cosmetic and health industries, we expect that this review will be useful for other studies, leading to the development of a standardized and reproducible methodology for prospection of antioxidant compounds, promoting knowledge sharing and scientific collaboration in this fascinating area.

2. Overview on *in vitro* methods used for antioxidant screening

Traditionally, several *in vitro* cells-free systems have been applied for the selection of antioxidant compounds from natural products. These assays are in general of rapid implementation, low cost and allow the screening of several new antioxidant compounds [14, 15], as well the comparison of the antioxidant capacity of different materials which could be applied in food or cosmetic preparation [16- 18]. These methodologies can be useful for the determination of the best extraction method, material characterization, culture condition and plant physiological and pathological studies in general [19- 23]. On the same way, these methods can be used for asses the quality of food material (wine, honey, juices, etc.) prevenient of different areas [24], treated or proceed in different conditions [25, 26] and for floral authentication [27].

According to Kasote et al. [12], depend on the mechanism of inactivation involved, the methods used for *in vitro* antioxidant evaluation can be classified in: hydrogen atom transfer (HAT)

or single electron transfer (SET). The HAT methods are based on the ability of an antioxidant compound to interact with a free radical by hydrogen donation, resulting in stable compounds. On the other hand, when an antioxidant transfers one electron to reduce any compound (metals, carbonyls, and free radicals) we have a SET-based assay (those where the change color is taken as the reduction of oxidant). A comparative analysis of commonly used in vitro assays is showed in the table 1.

The lack of validated assay that reliable measure ROS production is a great problem for the investigation of antioxidant capacity of plant material [28]. The reliability of the currently methods regarding therapeutic perspectives is questionable for diverse reasons such as: (i) almost all plants have excellent in vitro antioxidant potential; (ii) the in vitro assays consist in direct chemical reaction which did not take in account cytotoxic and other pharmacologic parameters; (iii) the contradictory results found between in vitro and in vivo studies (for more details see Kasote et al. [12]).

3. Hydrogen peroxide and cell death

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a nonradical derivative of oxygen which has emerged as an important signaling molecule based on its unique biochemical properties: presence in all biological systems, half-life relative long, and most importantly, solubility in aqueous and lipid media, which allows it easily diffuses to their cellular targets [2]. H_2O_2 plays a significant role during pathological processes such as tissue injury and infections (generated by activated phagocytes in order to combat the microbial invasion). Currently, H_2O_2 is also recognized as important for normal physiological signaling in processes such as proliferation, migration, survival and autophagy [1, 29]. The ability of H_2O_2 to diffuse away from the site of its generation makes it a useful diffusible messenger as well as an intracellular signaling agent [30]. The H_2O_2 is mainly generated as by-product of aerobic metabolism and mitochondrial respiration. During mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation creates a flux of electrons throughout the respiratory chain, establishing a proton gradient across inner mitochondrial membrane. This gradient is used as energy source for the ATP synthesis [31]. The electrons generated by reducing of substrates are transferred to molecular oxygen through enzymatic complexes (I-V) until reach the cytochrome c oxidase (complex IV) where the O_2 is completely reduced to H_2O . However, some electrons eventually escape from the mitochondrial electron transport chain and react with O_2 to form $\bullet O_2^-$, which are subsequently

converted to H_2O_2 by superoxide dismutase present in this organelle [30]. Besides the mitochondria several enzymatic systems generate H_2O_2 in different intracellular compartments as cytoplasm, nucleus, endoplasmic reticulum and plasma membrane [31].

H_2O_2 is a relatively weak oxidizing agent in comparison to other ROS (such as hydroxyl radical). However, when in excess it may induce cell toxicity as it is thought to be the major precursor of highly reactive free radicals, such as hydroxyl radicals via Fenton's reaction [1]. Apoptosis signal can be transduced extracellularly by soluble factors, suggesting that H_2O_2 can act as a paracrine mediator of this process [32]. In this sense H_2O_2 has been widely used as an exogenous oxidative stress agent in the studies on oxidative stress and cell death [33-35]. The process of apoptosis induced by H_2O_2 includes increase of p53, loss of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c and caspase-3, and DNA fragmentation [36-40] (Fig. 2). Although most studies indicate a pro-apoptotic role for the hydrogen peroxide, the induction of cell death by this compound, via necrotic has also been reported [41-43].

4. Cell-based assays, plant-derived compounds and cell death induced by Hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide has been used in different studies on oxidative stress due to its ability to react and form other oxidizing agents with good reproducibility [44]. These studies are performed with bacteria [45], nematodes [46], cell culture [47], fish [48], etc. The resulting knowledge about the effects of H_2O_2 on cell pathology and physiology generated from this studies, have encouraged the use of cell-based system for the evaluation of protective activity of plant-derived compounds (extracts, proteins, secondary metabolites) against cell death induced by H_2O_2 [13, 49, 50]. For example, the lectin isolated from *Cratylia mollis* (pCramoll) and its recombinant counterpart were able to inhibit the cell death induced by H_2O_2 in Vero Cells (monkey kidney fibroblasts), both proteins were prevented the deleterious effects of H_2O_2 on mitochondrial potential, lysosomal damage and DNA fragmentation, which resulted in cell survival and proliferation [13]. Other study showed that (E)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeine (isolated from *Incarvillea mairei*) protected rat pheochromocytoma (PC12) cells to H_2O_2 -induced dysfunction by inhibition of pro-apoptotic factors (caspase-3, caspase-7 and cytochrome c release; Bax and Bad expression) and up-regulated the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL [50]. Some more examples of others plant-derived products inhibiting H_2O_2 -induced damage are listed in the table 2.

In general, the use of cell-based assays has a great advantage when compared to other cell-free based in vitro models: the evaluation of the functional status of the cell. By using cell and molecular biology approaches, it has been possible to determine the antioxidant effect at subcellular level; thereby the metabolic pathways involved can be revealed. Additionally, cell-based assays can be used to identify some compounds without a free radical scavenging action but able to target the antioxidant defense (Fig. 3). Furthermore, a number of cell type such as fibroblasts [15], neural cells [50], osteoblasts [51], can be tested.

The protective effect of compounds against H₂O₂-induced cell injury could be tested using different cell viability methods like the trypan blue exclusion, activity of cellular enzymes (lactate dehydrogenase, adenylate kinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), MTT reduction bromide {[3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]}, MTS assay {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium} and others [49, 52]. The protective effect can also be more efficiently confirmed using fluorescent methods, as the "Live/Dead assay" (based on the use of "Calcein AM" and "ethidium homodimer-1" probes, which label live and dead cells, respectively). Similarly, the exacerbated production of other reactive species after treatment with H₂O₂ can be assessed using spectroscopy assays (electron spin resonance, spectrophotometry, fluorescence and luminescence) [53, 54].

Once the protective effect is confirmed, the next step is to determine the mechanism (s) of action involved, both at subcellular and molecular level. It is known that a protective compound can (i) act directly by inhibiting the action of the oxidizing agent (H₂O₂), either intracellularly or extracellularly; or (ii) act indirectly by promoting the expression of genes involved in the antioxidant defense. Several genes (NADPH: quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases and aldo-keto reductases) are involved in the antioxidant defense and its expression can be analyzed by various techniques such as real-time PCR, northern or western blot, RNA seq, proteomics, etc. [55]. Additionally, the levels of antioxidant enzymes (Malondialdehyde, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) can be detected spectrophotometrically using several commercial kits [52, 56].

As stated above, cell death induced by H₂O₂ is frequently associated to apoptotic process. In this regard, the detection of apoptotic cells can be performed by flow cytometry (or other fluorimetric assays), using a combined assay with the probes "annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate)" and propidium iodide (PI). In this assay, labeled annexin V (green fluorescence) bind to externalized phosphatidylserine (PS) during early stage of apoptosis whereas PI intercalates

DNA in cells where the membrane integrity was lost (necrotic cells). Thus, this approach allows the discrimination of intact cells, viable (FITC-/ PI-) early apoptotic (FITC+/ PI-) and late apoptotic or necrotic cells (FITC+/ PI+) and has been widely used in antioxidant and cell viability studies [57].

Fluorescence microscopy allied to the use of fluorescent probes acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) or Hoechst staining can be employed for morphological assessment. Fen-Fang and co-workers [56] studying the protective effect of plant-derived formula on human ECV300 cells demonstrated that viable cells are stained only by AO and presenting bright green nuclei and intact structure. In the other hand, cells treated with different concentration of H₂O₂ are stained by both AO and EB presented reduced size with condensation of chromatin (dense fluorescent orange areas in late apoptotic cells). Hoechst 33342 is membrane permeant probe that binds to adenine-thymine-rich regions (AT) of DNA leading to an intense labeling of nucleus. For this reason, this probe is useful to detect nuclear changes as shrinkage, chromatin condensation and fragmentation. By coupling flow cytometry with microscopy analysis a powerful detection of apoptotic cells can be reached [58] with this compound.

Another important marker of cytotoxicity induced by H₂O₂ is fragmentation of DNA. When H₂O₂ directly interacts with a cell an excessive ROS is formed (such as hydroxyl radicals) leading to DNA breaks. Furthermore, the activation of endonucleases causes the genomic DNA fragmentation, one of the most representative events during apoptosis [59]. The TUNEL method (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) can be employed to evaluate the DNA integrity and apoptosis. This assay is based on the incorporation of labeled nucleotides (d-UTP = 2'-deoxyuridine 5' triphosphate) catalyzed by the terminal deoxynucleotidyl transferase, into regions of DNA fragmentation. Labeled dUTPs are added to the 3'-OH groups on single or double strand DNA breaks. With newer commercial kits that utilize fluorescently tagged dUTP, TUNEL is relatively quick and easy, and can be combined with antibody staining or FISH to further characterize dying cells [60]. It is important to take into account, however, that DNA breakdown can also occur in necrosis. Thus it might be important to use other independent method, along with the TUNEL, to confirm and characterize apoptosis [61, 62]. The condensation of the nucleus and DNA fragmentation induced by H₂O₂ can also be measured using the DAPI dye (4', 6-diamidino-2-phenylindole; which binds strongly to regions of DNA at AT rich sites) or by Comet assay [63].

Mitochondria have been classically recognized for their critical role in maintaining the cell physiology by ATP production. However, dysfunction of this organelle is an important pathway in

the cell death, for example by lose the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) [64]. The cell death induced by H_2O_2 is related with loss of mitochondrial function leading to $\Delta\Psi_m$ [65]. Several types of fluorescent probes as TMRM, TMRE, Rhod123, JC-1, DiOC6 have been used to estimate the electric potential over the inner mitochondrial membrane. Changes in the fluorescent properties of these indicators can be determined through fluorescence monitoring [66]. Mitochondrial membrane permeabilization is related to the release of pro-apoptotic mediators (cytochrome c, AIF, Smac/DIABLO, and endoG) located in the space between the inner and outer mitochondrial membranes. Once in the cytosol, these factors activate diverse enzymatic reactions leading to the degradation of specific proteins and DNA during apoptosis [67, 68]. When cytochrome c is released, it forms an apoptosome with Apaf-1 leading to the activation of caspase 9, which activates executioner caspases including caspase 3 responsible for apoptosis progression. Caspases are aspartate-specific cysteine-dependent proteases involve in the nuclear fragmentation and externalization of phospholipid membrane. Among the various substrates of caspases can be cited mdm-2 (murine double minute), a protein that binds to p53, avoiding its translocation from cytoplasm to nucleus. p53 protein has ability to activate apoptosis via multiple different pathways, for example it activates the transcription of pro-apoptotic genes such as Bax2 [69, 70]. The release of each apoptotic mediator (caspases, cytochrome c) can be detected in mitochondrial and cytoplasmic fractions by specific antibodies using colorimetric or fluorescent methods [71]. Furthermore, the detection of in situ cytochrome c using fluorescence microscopy can be also applied to differentiate apoptotic cells (cytochrome c into the cytosol) from non-apoptotic cells (those which still retain cytochrome c in their mitochondria) [72].

One of the mechanisms in vertebrates that control the mitochondrial permeability and consequently cytochrome c release and caspase activation is mediated by a family of proteins called Bcl-2, composed by anti-apoptotic (Bcl-2 and Bcl-xL) and pro-apoptotic (Bak, Bid and Bax) proteins. These proteins form heterodimers depending on their relative amounts and the ratio of pro- to anti-apoptotic members (rather than the absolute expression level of any single Bcl-2 member protein) being decisive for the activation or inhibition of apoptotic pathway [73, 74]. During the stress induced by H_2O_2 , the expression of Bcl-2 is decreased and the expression of Bax is increased. A bona-fide protective compound should be able to revert this scenario, thus the expression of such proteins are really important aspects to be evaluated.

The mitochondrial physiology has been the focus of most studies on the oxidative stress-induced cell death, since this organelle plays a central role on the cell death decision and is the main

source of accidental ROS production. However, ROS, as H_2O_2 have the potential to diffuse through the membranes of any organelle where they can exert their deleterious or physiological effects. It has been suggested that apoptosis might be initiated by iron-catalyzed lysosomal rupture induced by oxidative stress. Due to the fact that many of molecules under degradation within lysosomes contain iron in their composition, this organelle is particularly sensible to oxidative stress, especially those caused by H_2O_2 . The lysosomal compartments, under oxidative stress, can in turn release hydrolytic enzymes with high degradation potential (proteases, lipases, nucleases, glycosidases, phospholipases, phosphatases and sulfatases), which can also act promoting mitochondrial ROS generation, constituting a cycle of oxidative damage amplification [75-77]. In addition, lysosomal proteases such as those belong to the cathepsins family are involved in apoptosis via different pathways, including the activation of caspases or the release of pro-apoptotic factors from the mitochondria [78]. Some cathepsins (B, D) have been implicated lysosome-mediated cell death through the cleavage of the Bax activator Bid, and translocation of Bax to mitochondria [79,81]. In this regard the evaluation of lysosomal status is important in studies involving both prospection of protective antioxidant compounds and oxidative stress-induced cell death. As mentioned above, AO has been used as a marker of apoptosis in different cell types. Besides interacts with DNA emitting a strong green fluorescent signal, this fluorochrome is also taken up in acidic organelles as lysosomes and auto-phagosomes emitting a red fluorescent signal. In this sense, this probe has been used as powerful tool to monitor cellular physiological changes as those induced by oxidative stress [82, 83]. On the other hand, the catalytic activity of cathepsins can be exploited for their detection by using their synthetic substrates labeled with fluorescence probes [84].

4.1. Disadvantages of cell-based antioxidant assays

In vitro cell-based assays have been a key step during drug discovery process aiming to reveal the effectiveness and safety of molecules with therapeutic potential. Considering all the cost involved in animal studies and to obtain clinical approval, it is understandable the necessity of collecting all information regarding the biomedical activity, cytotoxicity, action mechanism and target interaction in the earliest stages of drug discovery. These assays in general have several advantages such as ease of culture, expansion potential, predictability, possibility of automation, multiplexing, and miniaturization, which make suitable them for the high demands of the early stages of drug discovery [85-87].

However, some limitations are found in these assays, for instance it is recognized that cellular behavior (proliferation, differentiation, metabolism) is strongly perturbed in culture, as it is influenced by the microenvironment. For example, metabolic adapted cultured cells can secrete antioxidant compounds (pyruvate and oxaloacetate) in the cell media, which acts as a scavenger of hydrogen peroxide. Thus the results found in vitro cannot be always reproducible in vivo situations. In order to solve this problem, some efforts have been performed to develop new cultivation methods such as the use of primary cells (which are supposed to be more physiologically relevant to human biology) co-cultures or three-dimensional (3D) technologies [1, 88, 89]. Specifically, in the antioxidant research, the results obtained in vitro cell-based assays should be evaluated carefully regarding their therapeutic applications. The presence of keto acids (such as oxaloacetate, pyruvate, or α -ketoglutarate) in the media should be evaluated, as well the ability of the antioxidant candidate to interact with any media component and/or undergo rapid decomposition into other bioactive agents in cell culture [1, 90].

5. Conclusion

Numerous plant-derived materials has been screened using in vitro methodologies leading to discovery of huge amount of promise compounds with high antioxidant potential. However, without an evaluation of their pharmacological properties, such results are meaningless for therapeutic applications. Thus, the development of better antioxidants stills a great challenge. In vitro cell-based assays have been used in the screening of new drugs and have the potential of reveal some important aspects regarding cytotoxicity and action mechanism of these potential antioxidant compounds. The advance in the cell and molecular biology technologies has been a great ally in this process. Another important advantage of these cell-based assays is the selection of compounds that can target the antioxidant defense rather than act inhibiting an oxidant agent. Some issues are found in the use of cell culture for redox studies, although useful information can be reach if their limitations are understood. In this sense, lessons learned from these studies can be valuable tools to improve our knowledge about the regulation of signaling pathways involved in oxidative stress. All this information can be exploited to develop new therapeutic approaches for diseases related with free radical disorders.

Reference

- [1] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 2012;70:257–265.
- [2] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*; 2007,39:44-84.
- [3] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Journal of Biochemistry*; 2009;417:1–13.
- [4] B. Halliwell. “The wanderings of a free radical”. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;46:531-542.
- [5] Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;50:567-575.
- [6] Majima HJ; Toyokuni S. Mitochondria and free radical studies on health, disease and pollution. *Free radical research* 2012;46:925-926.
- [7] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 2010;49:1603-1616.
- [8] Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research* 2012;46:382-419.
- [9] Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British journal of clinical pharmacology* 2013;75:637-644.
- [10] Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, Duburs G, Horáková LU, Łuczaj W, et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free radical research* 2010;44: 1216-1262.
- [11] López-Alarcón C., Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta* 2013;763:1-10.
- [12] Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International journal of biological sciences* 2015;11:982.
- [13] Silva LCN, Alves NMP, Castro MCAB, Higinio TMM, Cunha CRA, Pereira VRA et al. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

- [14] Silva LCN, Silva CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correia MTSantos. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49:2222-2228.
- [15] Gupta P, Gupta A, Agarwal K, Tomar P, Satija S. Antioxidant and cytotoxic potential of a new thienyl derivative from *Tagetes erecta* roots. *Pharmaceutical biology* 2012;50:1013-1018.
- [16] Malinowska P, Gliszczynska-Świgło A, Szymusiak H. Protective effect of commercial acerola, willow, and rose extracts against oxidation of cosmetic emulsions containing wheat germ oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014;116:1553-1562.
- [17] Soong YY, Tan SP, Leong LP, Henry JK. Total antioxidant capacity and starch digestibility of muffins baked with rice, wheat, oat, corn and barley flour. *Food chemistry* 2014;164:462-469.
- [18] Çakmakçı S, Topdaş EF, Kalın P, Han H, Şekerci P, Köse L, Gülçin I. Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science and Technology* 2015;50:472-481.
- [19] Almeida IF, Maleckova J, Saffi R, Monteiro H, Góios F, Amaral MH, Bahia MF. Characterization of an antioxidant surfactant-free topical formulation containing *Castanea sativa* leaf extract. *Drug development and industrial pharmacy* 2013;41:148-155.
- [20] Balboa EM, Soto ML, Nogueira DR, González-López N, Conde E, Moure A, et al. Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics. *Industrial Crops and Products* 2014;58:104-110.
- [21] Durazzo A, Azzini E, Lazzé MC, Raguzzini A, Pizzala R, Maiani G, et al. Antioxidants in Italian Head Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) Grown in Organic and Conventional Systems under Greenhouse Conditions. *Journal of Food Biochemistry* 2014;38:56-61.
- [22] Ouhibi C, Attia H, Rebah F, Msilini N, Chebbi M, Aarrouf J, et al. Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds. *Plant Physiology and Biochemistry* 2014;83:126-133.
- [23] Pérez-Clemente RM, Montoliu A, Vives V, López-Climent MF, Gómez-Cadenas A. Photosynthetic and antioxidant responses of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) plants to *Citrus tristeza virus* infection. *Plant Pathology* 2015;64:16-24.

- [24] Costa E, Cosme F, Rivero-Pérez MD, Jordão AM, González-San José ML. Influence of wine region provenance on phenolic composition, antioxidant capacity and radical scavenger activity of traditional Portuguese red grape varieties. *European Food Research and Technology* 2015;2015:1-13,.
- [25] Mgaya-Kilima B, Remberg SF, Chove BE, Wicklund T. Physiochemical and antioxidant properties of roselle-mango juice blends; effects of packaging material, storage temperature and time. *Food science and nutrition* 2015;3:100-109.
- [26] Mulero J, Martínez G, Oliva J, Cermeño S, Cayuela JM, Zafrilla P, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food chemistry* 2015;180:25-31.
- [27] Escriche I, Kadar M, Juan-Borrás M, Domenech E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. *Impact of industrial thermal treatment. Food chemistry* 2014;142:135-143.
- [28] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53: 1841-1856.
- [29] Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell death and disease* 2011;2:pe213,.
- [30] Rice ME. H₂O₂: a dynamic neuromodulator. *The Neuroscientist* 2011;7:389-406.
- [31] Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by product or a common mediator of ageing signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8:722-728.
- [32] Pletjushkina OY, Fetisova EK, Lyamzaev KG, Ivanova OY, Domnina LV, Vyssokikh MY. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal. *Biochemistry* 2006;71:60-67.
- [33] Zhou X, Yuan D, Wang M, He P. H₂O₂-induced endothelial NO production contributes to vascular cell apoptosis and increased permeability in rat venules. *American Journal of Physiology* 2012;304:82-93.
- [34] Liu L, Gu L, Ma Q, Zhu D, Huang X. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013;17:88-94, 2013.
- [35] Koppenhöfer D, Kettenbaum F, Susloparova A, Law JKY, Vu XT, Schwab T, et al. Neurodegeneration through oxidative stress: Monitoring hydrogen peroxide induced

apoptosis in primary cells from the subventricular zone of BALB/c mice using field-effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics* 2015;67:490-496.

- [36] Kitsati N, Fokas D, Ouzouni MD, Mantzaris MD, Barbouti A, Galaris D. Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60:7873-7879.
- [37] Rincheval V, Bergeaud M, Mathieu L, Leroy J, Guillaume A, Mignotte B. Differential effects of Bcl-2 and caspases on mitochondrial permeabilization during endogenous or exogenous reactive oxygen species-induced cell death. *Cell Biology and Toxicology* 2012;28:239-253.
- [38] Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell Death and Disease* 2013;4:e508-.
- [39] Capdevila DA, Marmisollé WA, Tomasina F, Demicheli V, Portela M, Radi R, Murgida DH. Specific methionine oxidation of cytochrome c in complexes with zwitterionic lipids by hydrogen peroxide: potential implications for apoptosis. *Chemical Science* 2015;6:705-713.
- [40] Reis AC, Alessandri AL, Athayde RM, Perez DA, Vago JP, Ávila TV, et al. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell death and disease* 2015;6:e1632.
- [41] Xu Y, Bradham C, Brenner DA, Czaja MJ. Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. *American Journal of Physiology* 1997;273:795-803.
- [42] Teramoto S, Tomita T, Matsui H, Ohga E, Matsuse T, Ouchi Y. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *The Japanese Journal of Pharmacology* 1999;79:33-40.
- [43] Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Current neurovascular research* 2009;6:213-222.
- [44] Yang X, Kang MC, Lee KW, Kang SM, Lee WW, Jeon YJ. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum*. *Algae* 2011;26:201-208.
- [45] Mancini S and Imlay JA. The induction of two biosynthetic enzymes helps *Escherichia coli* sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. *Molecular microbiology* 2015;96:744-763.

- [46] Nikhil B, Horvitz HR. Light and hydrogen peroxide inhibit *C. elegans* feeding through gustatory receptor orthologs and pharyngeal neurons. *Neuron* 2015;85:804-818.
- [47] Soares DG, Basso FG, Hebling J, Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *Journal of dentistry* 2015;43:750-756.
- [48] Rieger S, Sagasti A. Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS-Biology* 2011;9:1029.
- [49] Silva Gomes ECB, Jimenez GC, Silva LCN, Sá FB, Souza KPC, Paiva GS, Souza IA. Evaluation of antioxidant and antiangiogenic properties of *Caesalpinia echinata* extracts. *Journal of Cancer* 2014;5:143-150.
- [50] Chen B, Yue R, Yang Y, Zeng H, Chang W, Gao N, Shan L. Protective Effects of (E)-2-(1-Hydroxyl-4-Oxocyclohexyl) Ethyl Caffeine Against Hydrogen Peroxide-Induced Injury in PC12 Cells. *Neurochemical research* 2015;40:531-541.
- [51] Yang Y, Su Y, Wang D, Chen Y, Wu T, Li G and Cui L. Tanshinol attenuates the deleterious effects of oxidative stress on osteoblastic differentiation via Wnt/FoxO3a signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013;2013:351895.
- [52] Tian X, Guo LP, Hu XL, Huang J, Fan YH, Ren TS, Zhao QC. Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury and potential mechanisms in SH-SY5Y cells. *Cellular and molecular neurobiology* 2014;35:335-344
- [53] Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants and redox signaling* 2014;20:372-382.
- [54] Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta* 2006;368:53-76.
- [55] Bhaskaran N, Srivastava JK, Shukla S, Gupta S. Chamomile Confers Protection against Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity through Activation of Nrf2-Mediated Defense Response. *Phytotherapy Research* 2013;27:118-125.
- [56] Fen-fang H, Fa-xian G, Ying Z, Qin-hua M, Da-lei Z, Bei Y, et al. Shenfu injection protects human ECV304 cells from hydrogen peroxide via its anti-apoptosis way. *Journal of ethnopharmacology* 2015;163:203-209.
- [57] Sandes JM, Fontes A, Regis-da-Silva CG, Castro MC, Lima-Junior CG, Silva FP, et al. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). *PLoS One* 2014;9:e93936.

- [58] Chazotte B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. Cold Spring Harbor Protocols, v.1, pdb-prot5557, 2011.
- [59] Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, Tanuma S. The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation. Archives of Biochemistry and Biophysics 2011;506:188–93.
- [60] Sarkissian T, Timmons A, Arya R, Abdelwahid E, White K. Detecting apoptosis in Drosophila tissues and cells. Methods 2014;68:89-96.
- [61] Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. In DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo. Humana Press 2011;2011:3-13.
- [62] Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. Methods in Molecular Biology 2012;87:41–47.
- [63] Jung H, Kwak HK, Hwang KT. Antioxidant properties of Rubus fruit anthocyanins in hydrogen peroxide-treated RAW264. 7 cells (830.28). The FASEB Journal 2014;28:830-28.
- [64] Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends in Cell Biology, 2010;35:505–513.
- [65] Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Yang X, Li D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. European Journal of Pharmacology 2010;628:27-35.
- [66] Galluzzi L, Zamzami N, Rouge TDL, Lemaire C, Brenner C, Kroemer G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. Apoptosis 2007;12:803-813.
- [67] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004;116:205–219.
- [68] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiological reviews 2007;87: 99-163.
- [69] Jiang X, Jiang H, Shen Z, Wang X. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 2014;111:14782-14787.
- [70] Mahapatra G. Role of Cytochrome c Phosphorylation in Regulation of Respiration and Apoptosis. The FASEB Journal 2015;29:725.3.
- [71] Campos CB, Paim BA, Cosso RG, Castilho RF, Rottenberg H, Vercesi AE. Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: immunodetection of

cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. *Cytometry Part A* 2006;69:515-523.

- [72] Ismail AM, In LL, Tasyriq M, Syamsir DR, Awang K, Mustafa AHO, et al. Extra virgin olive oil potentiates the effects of aromatase inhibitors via glutathione depletion in estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013;62:817-824.
- [73] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell* 2011;21:92-101.
- [74] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 2011;351:41-58.
- [75] Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European Journal Biochemistry* 2003;270:3778–3786.
- [76] Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochemistry and Biophysics Acta* 2008;1780:1291–1303.
- [77] Repnik U, Turk B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 2010;10:662-669.
- [78] Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:143-149.
- [79] Kirkegaard T, Jäättelä M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochemistry and Biophysics Acta* 2009;1793:746-754.
- [80] Česen MH, Pegan K, Špes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Experimental cell research* 2012;318:1245-1251.
- [81] Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochemistry and Biophysics Acta* 2012;1824:22-33.
- [82] Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z. Condensation of nucleic acids by intercalating aromatic cations. *Proceedings of National Academy of Science* 1994;81:7368–7372.
- [83] Monte Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology* 2011;127:215–221.
- [84] Jang BG. Impairment of Autophagic Flux Promotes Glucose Reperfusion-Induced Neuro2A Cell Death after Glucose Deprivation. *PLoS One* 2013;8:764-766.

- [85] Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010;398:227-238.
- [86] Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology and therapeutics* 2012;134:82-106.
- [87] Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology* 2014;3:345-367.
- [88] Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* 2013;18:240-249.
- [89] Berg EL, Hsu YC, Lee JA. Consideration of the cellular microenvironment: physiologically relevant co-culture systems in drug discovery. *Advanced drug delivery reviews* 2014;169:190-204.
- [90] Halliwell B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences* 2011;32:125–130.
- [91] MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006;86:2046-2056.
- [91] Ayse K, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2009;2:41-60.
- [92] Tan X W, Bhave M, Fong AYY, Matsuura E, Kobayashi K, Shen LH, Hwang SS. Cytoprotective and Cytotoxic Effects of Rice Bran Extracts in Rat H9c2 (2-1) Cardiomyocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016: ID 6943053.
- [93] Zhu M Li J, Wang K, Hao X, Ge R, Li Q. Isoquercitrin Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis of EA.hy926 Cells via the PI3K/Akt/GSK3 β Signaling Pathway. *Molecules* 2016;21:356-369.
- [94] Varma SR, Sivaprakasam TO, Mishra A, Kumar LM, Prakash NS, Prabhu S, Ramakrishnan S. Protective Effects of Triphala on Dermal Fibroblasts and Human Keratinocytes. *PloS one* 2016;11:e0145921.
- [95] Baccarin T, Mitjans M, Lemos-Senna E, Vinardell MP. Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of Punica granatum seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction. *Toxicology in Vitro* 2015;30:421-428.

- [96] Oh GW, Ko SC, Heo SY, Nguyen VT, Kim G, Jang CH, et al. A novel peptide purified from the fermented microalga *Pavlova lutheri* attenuates oxidative stress and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Process Biochemistry* 2015;50:1318-1326.
- [97] Ismail N, Ismail M, Azmi NH, Bakar MFA, Basri H, Abdullah MA. Modulation of Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human Neuronal Cells by Thymoquinone-Rich Fraction and Thymoquinone via Transcriptomic Regulation of Antioxidant and Apoptotic Signaling Genes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016:2528935.
- [98] Hu Y, Zhang N, Fan Q, Lin M, Zhang C, Fan G, et al. Protective efficacy of carnosic acid against hydrogen peroxide induced oxidative injury in HepG2 cells through the SIRT1 pathway. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2015;93:625-631.
- [99] Sagrillo MR, Garcia LFM, de Souza Filho OC, Duarte MMMF, Ribeiro EE, Cadoná FC, da Cruz IBM. Tucuma fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food chemistry* 2015;173:741-748.
- [100] Liu YH, Lin YS, Huang YW, Fang SU, Lin SY, Hou WC. Protective Effects of Minor Components of Curcuminoids on Hydrogen Peroxide-Treated Human HaCaT Keratinocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016;4:3598-3608.
- [101] Bayliak MM, Burdylyuk NI, Lushchak VI. Quercetin increases stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* not only as an antioxidant. *Annals of Microbiology* 2015;55:2446-51.
- [102] Fatokun AA, Tome M, Smith RA, Darlington LG, Stone TW. Protection by the flavonoids quercetin and luteolin against peroxide-or menadione-induced oxidative stress in MC3T3-E1 osteoblast cells. *Natural product research* 2015;29:1127-1132.
- [103] Wang F, Yin P, Lu Y, Zhou Z, Jiang C, Liu Y, Yu X. Cordycepin prevents oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *Oncotarget* 2015;6:35496-35508.

Table Caption

Table 1. Comparative analysis of some commonly used in vitro antioxidant assays.

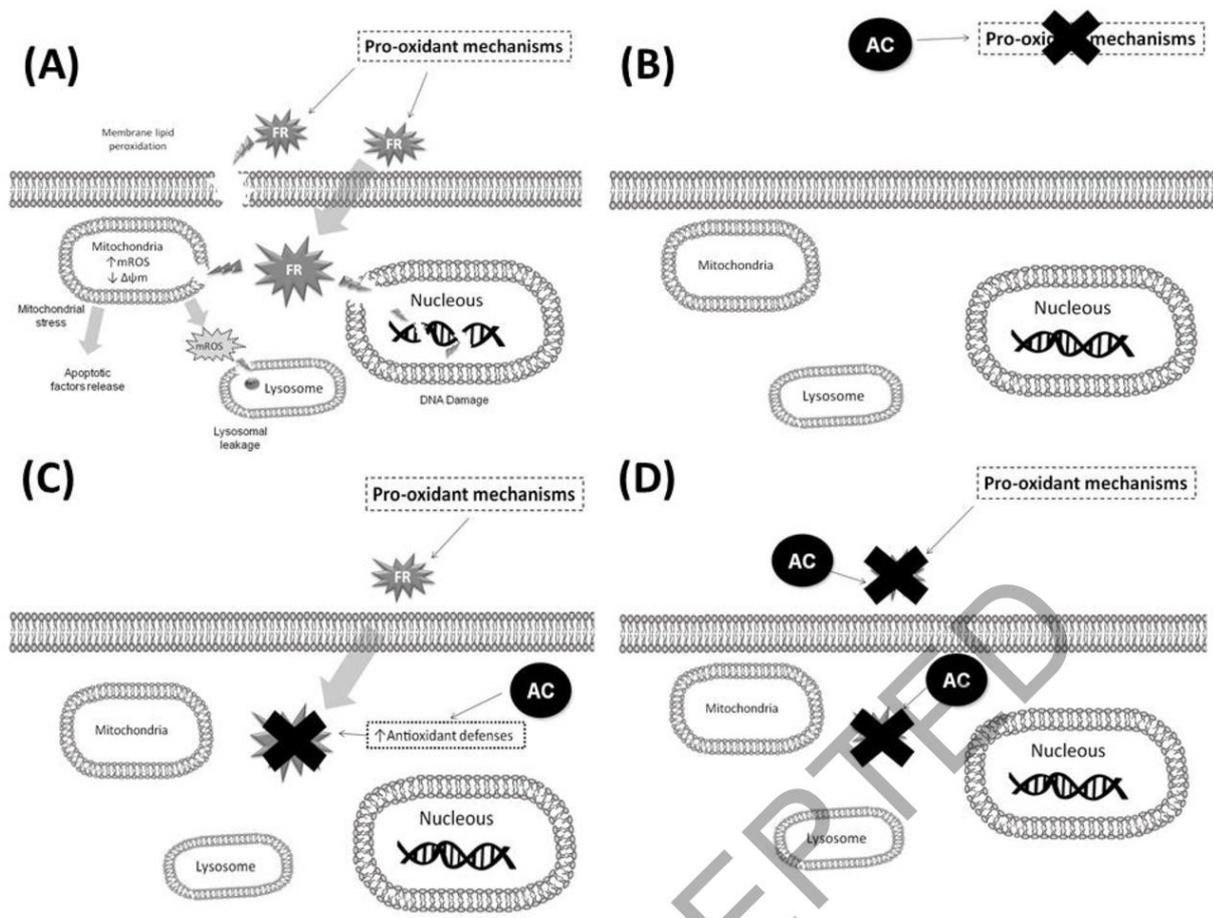
Table 2. Selected examples of natural products with ability to inhibit hydrogen peroxide induced toxicity (H_2O_2)

Figure Captions

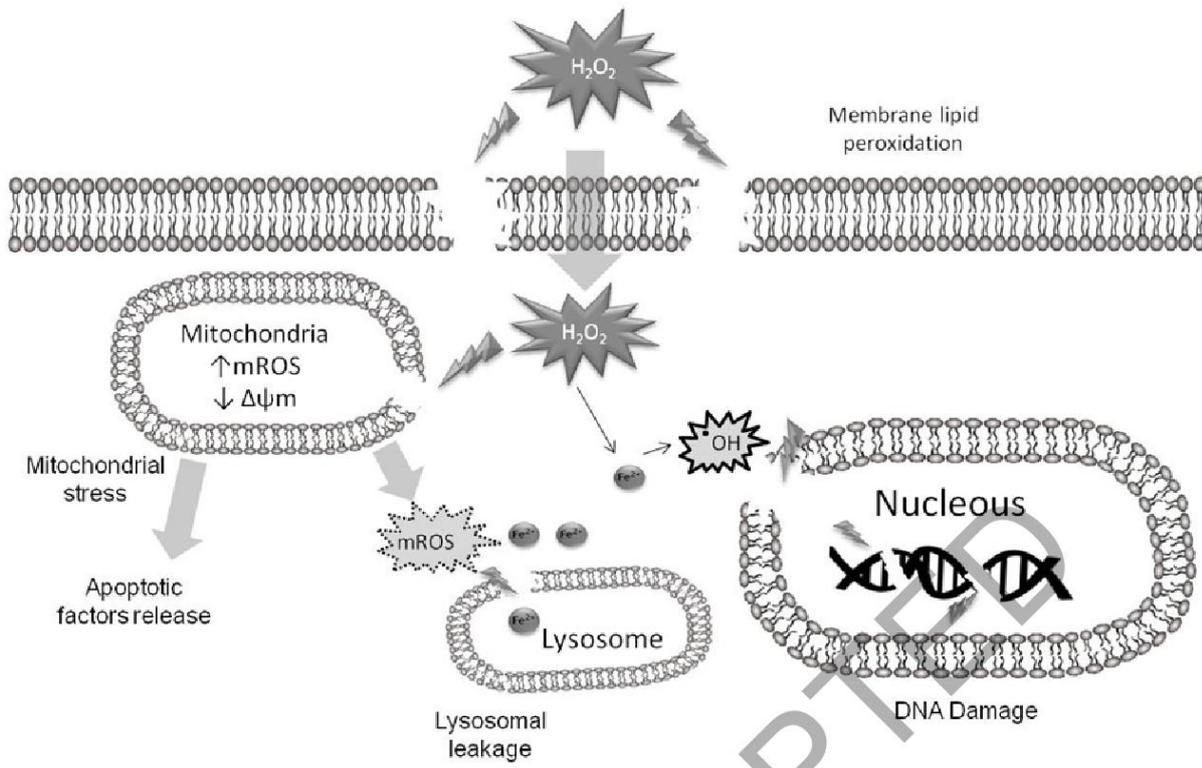
Figure 1. Representation of the general mechanisms of antioxidant compounds (AC). (A) Excessive production of free radicals (FR) by some pro-oxidant mechanism can lead to cell death since FR can cause membrane lipid peroxidation, DNA damage, mitochondrial stress and lysosomal dysfunction. An antioxidant compound can act by (B) inhibiting the oxidant mechanisms; (C) interacting with redox signaling pathways increasing the cellular antioxidant response; (D) directing the inactivation of FR.

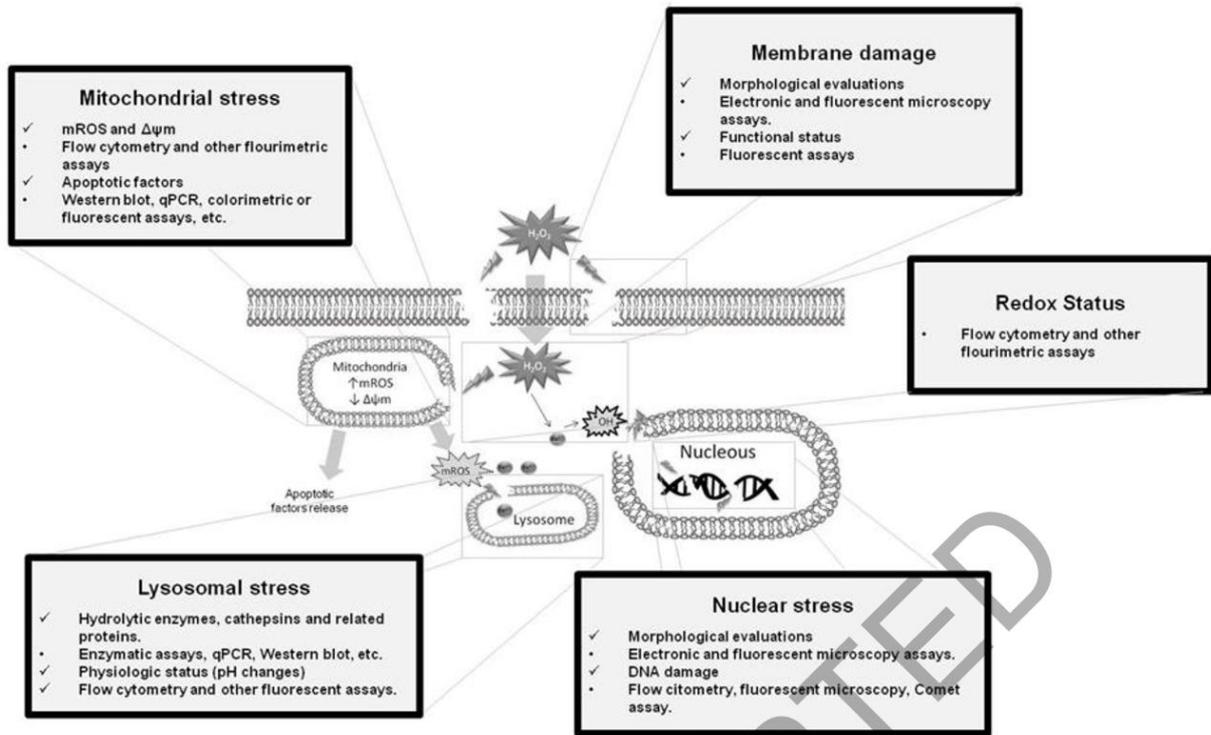
Figure 2. Schematic overview of H_2O_2 -induced cell death (Based on Silva et al. [13]). H_2O_2 is a relatively weak oxidizing agent, but it can induce cell toxicity by itself (as it can diffuse through plasmatic membrane) and mainly due its capacity to react with Fe^{2+} via Fenton's reaction producing the really reactive hydroxyl radicals. Once in the cytoplasm, H_2O_2 (or hydroxyl radicals) can induce the formation of mitochondrial ROS and amplify the oxidative damage.

Figure 3. Representative scheme of some techniques applied to the evaluation of the antioxidant potential of plant-derived products using cell-based assays



JUST ACCEPTED





JUST ACCEPTED

Table 1. Comparative analysis of some commonly used in vitro antioxidant assays.

Assay	Mechanism	Principle	Advantages	Disadvantages
DPPH assay	Both hydrogen atom and single electron transfer	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical has a deep purple color which should be changed to yellow when it interacts with an antioxidant compound. The results can be detected using electron spin resonance or by monitoring the absorbance decrease at 515–528 nm.	<ul style="list-style-type: none"> • Easy implementation; • Fast assay; • Compatible with High-throughput screenings. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of biological significance; • The result can be influenced by, light, oxygen, type of solvent and some compounds (such as carotenoids and eugenol); • DPPH is not soluble in aqueous media, only in organic media; • The interaction between DPPH and antioxidants is not linear to DPPH concentration.
ABTS assay	Both hydrogen atom and single electron transfer	ABTS Radical (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) when oxidized has intense color, which should be decreased by an antioxidant compound. The result is measured spectrophotometrically (in the range of 600–750 nm) and expressed in relation to Trolox (Trolox equivalent antioxidant Capacity – TEAC).	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicity; • Instrumentation readily available; • Suitable for hydrophilic and lipophilic antioxidants (depending on the kind of solvent used); • Reaction can be performed in a wide range of pH; • Compatible with High-throughput screenings. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of biological significance; • Radical generation by enzymatic or chemical reactions; • Reactions with some phytochemicals can have longer end point leading to false low TEAC values; • The TEAC value is not correlated to the number of electrons donated by an antioxidant.
β -	Hydrogen	This assay is based on	• Biologically	• The

caroten/Crocin bleaching assay	atom transfer	inhibition of naturally occurring carotenoids autoxidation (by light or heat or peroxy radicals) by an antioxidant agent. The color loss is measured using spectrophotometer (443 nm).	relevant; <ul style="list-style-type: none"> • Suitable for lipophilic and/or thermosensitive compounds; • Compatible with High-throughput screenings. 	reproducibility can be affected by pH, temperature and metals; <ul style="list-style-type: none"> • Many food pigments, such as carotenoids, can interfere in this reaction; • There is a limitation in the use of β-carotene due its discoloration can occur by multiple pathways. This fact is not observed for Crocin.
Total Phenol Assay using the Folin-Ciocalteu Reagent (FCR)	Single electron transfer	This assay measures the reducing capacity of the sample and is based on the electron transfer from phenolic compounds (or other reducing species) to molybdenum (present in FCR) in alkaline medium. The complexes formed has a blue color that is monitored spectrophotometrically at 750–765 nm. The results are usually expressed as Gallic acid equivalents.	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicity; • Instrumentation readily available; • Compatible with High-throughput screenings; • Linear correlation between the Phenolic content and antioxidant activity. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of biological significance; • Lack of standardization of methods can lead to several orders of magnitude difference; • As FCR can also be reduced by many non-phenolic compounds, this assay do not provide the right phenolic concentration, which can be determine by HPLC (High Performance Liquide Chromatography) analysis.
FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay	Single electron transfer	In the presence of an antioxidant compound a ferric tripyridyltriazine	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicity; • Instrumentation readily available; • Compatible 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of biological significance; • The results

complex (Fe(III)-TPTZ) is reduced resulting in a colour change from yellow to blue (measured at 593 nm).

with High-throughput screenings;

can be influenced by: (i) a complex formed by other Fe(III) species and any chelator present in the sample can also react with the antioxidant and alter the result; (ii) the solvent used; (iii) any electron-donating substance present in the sample (even without antioxidant properties) with redox potential lower than that of the redox pair Fe(III)/Fe(II); (iv) pH condition;

- Some antioxidants (such as glutathione) are not able to reduce the Fe(III);

References: 11, 12, 90, 91, 92

JUST ACCEPTED

Table 2. Selected examples of natural products with ability to inhibity hydrogen peroxide induced toxicity (H₂O₂)

Cell type	Target product	Source	Reference
Kidney fibroblast /Vero cells (Cercopithecus aethiops)	pCramoll and rCramoll (Proteins)	Cratylia mollis	13
	Ethanol extract wood	Caesalpinia echinata	49
Pheochromocytoma cells PC12 (Rattus norvegicus)	Caffeic ester	Incarvillea mairei	50
H9c2(2-1) Cardiomyocytes (Rattus norvegicus)	Rice Bran Extracts	Oryza sativa	92
EA.hy926 Umbilical vein endothelial cells (Homo sapiens)	Isoquercitrin	Several dietary source	93
Erythrocytes (Rattus norvegicus)	Triphala (formulation of three fruit)	Emblica officinalis Gaertn, Terminalia chebula Retz, and Terminalia belerica Roxb	94
Erythrocytes (Homo sapiens)	Seed oil	Punica granatum	95
Skin melanoma (B16-F10) (Mus musculus)	Peptide	Pavlova lutheri (fermented)	96
Neuronal Cells (SH-SY5Y) (Homo sapiens)	Thymoquinone	Nigella sativa	97
Liver hepatocellular cells (HepG2) (Homo sapiens)	Carnosic acid	Rosmarinus officinalis	98
Lymphocytes (Homo sapiens)	Fruit extracts	Astrocaryum aculeatum	99
HaCaT keratinocytes (Homo sapiens)	Curcumin and others curcuminoids	Curcuma longa	100
Saccharomyces cerevisiae	Quercetin	Several dietary source	101
MC3T3-E1 osteoblast cells (Mus musculus)	Quercetin and luteolin	Several dietary source	102
Bone marrow mesenchymal stem cells (Homo sapiens)	Cordycepin	Cordyceps militaris	103

APÊNDICE C

PHARMACEUTICAL BIOLOGY, 2017
VOL. 55, NO. 1, 1521–1527
<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1304427>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions

José Robson Neves Cavalcanti Filho^a, Tiago Fonseca Silva^{a,b}, Woah Queiroz Nobre^b, Larissa Isabela Oliveira de Souza^c, Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo^d, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^c, Norma Buarque de Gusmão^e, Márcia Vanusa Silva^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{b,d} and Maria Tereza dos Santos Correia^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ^bCurso de Farmácia, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brasil; ^cCentro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, Brasil; ^dPrograma de Pósgraduação, Universidade CEUMA, Sao Luis, Brasil; ^eDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

ABSTRACT

Context: *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretaceae) is an ethnomedicinal plant with reported antifungal action.

Objective: This study evaluates the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* leaf extracts against clinical isolates of *Candida albicans*. The morphological alterations, combinatory effects with fluconazole and the cytotoxicity of the active extract were analyzed.

Materials and methods: Extracts were obtained using different solvents (hexane: BTHE; chloroform: BTCE; ethyl acetate: BTEE; and methanol: BTME). Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method using nine strains of *C. albicans* isolated from vaginal secretions and one standard strain (UFPEDA 1007).

Results: All extracts showed anti-*C. albicans* activity, including against the azole-resistant strains. The MIC values ranged from 156 to 2500 µg/mL for the BTHE; 156 to 1250 µg/mL for the BTCE; 625 to 1250 µg/mL for the BTME and 625 µg/mL to 2500 µg/mL for the BTEE. BTME showed the best anti-*C. albicans* activity. This extract demonstrated additive/synergistic interactions with fluconazole. Scanning electron microscopy analysis suggested that the BTME interferes with the cell division and development of *C. albicans*. BTME showed IC₅₀ values of 981 and 3935 µg/mL, against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. This extract also enhanced the production of nitric oxide by J774 macrophages.

Discussion and conclusion: *Buchenavia tetraphylla* methanolic extract (BTME) is a great source of antimicrobial compounds that are able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains; this action seems related to inhibition of cell division.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2016
Revised 25 January 2017
Accepted 3 March 2017

KEYWORDS

Antifungal agents; natural products; Caatinga biome

Introduction

Candida albicans is a polymorphic fungus recognized as one of the most common fungal pathogens, responsible for a range of diseases (Mayer et al. 2013). This yeast is usually found in the normal microbiota of several distinct anatomical sites such as skin, mouth and genitourinary and digestive systems (Pfaller & Diekema 2010; Gulati & Nobile 2016). However, some adverse environmental conditions such as pH shift, nutritional deficiency, use of antibiotics or variations in the immune status of the host, can enable this microorganism to cause infections, which range from superficial dermal and mucosal cases to more severe systemic infections (candidemia and invasive candidiasis, frequently associated with patients with compromised immunity). Several factors, related to both host and pathogen, are recognized as crucial for infection development; for example, *C. albicans* possesses a range of virulence factors, associated to adherence, filamentation, biofilm formation and secretion of proteases. Additionally, antibiotic and immunosuppressive therapies, diseases (human immunodeficiency virus, diabetes), and aging are also factors that

favour *C. albicans* infections (Gow & Hube 2012; Mayer et al. 2013; Fadda et al. 2015).

The treatment of *C. albicans* infection is based on the use of systemic antifungals (fluconazole or itraconazole) and topical nystatin (Pappas et al. 2015). An increase in the resistance of *C. albicans* to antifungals has been observed in recent decades, which makes this yeast a serious concern for the global health system. Indeed, the development of new and effective approaches to treat fungal infections remains one of the major challenges for modern medicine (Sardi et al. 2013).

Traditional medicinal plants from underexploited environments, such as the Caatinga (semi-arid region), an exclusively Brazilian biome, have been the subject of various studies in the search for new antimicrobial compounds, due to their exceptional activity against microorganisms (Oliveira et al. 2012; Silva et al. 2014). *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretaceae) is a Neotropical plant, distributed from Cuba (Caribbean) to Brazil (South America) (Weaver 1991). In Brazil, this plant is popularly known as ‘Tanimbuca’

CONTACT Luis Cláudio Nascimento da Silva luisclaudionsilva@yahoo.com.br Universidade CEUMA, Sao Luis, Brasil

*These authors have contributed equally to this work.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and is listed as an ethnomedicinal plant used by the traditional communities of northeastern Brazil (Agra et al. 2007, 2008). Our group has shown that extracts and fractions of *B. tetraphylla* leaves have a broad-spectrum of antimicrobial activities, inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi (including *C. albicans*) (Oliveira et al. 2012). Additionally, a recent study has shown that *B. tomentosa* had a potential antifungal effect against different *Candida* species (Teodoro et al. 2015). In this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* extracts alone or in combination with fluconazole against clinical isolates of *C. albicans* isolated from vaginal secretions, and to analyze the ultrastructural changes and the combinatory effect with fluconazole induced by the active extract.

Materials and methods

Plant material: collection, identification and extraction

Leaves of *B. tetraphylla* were collected in the *Parque Nacional do Catimbau* (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brazil) in November of 2013. The taxonomic identification was performed by Dr Alexandre Gomes da Silva, at the Herbarium of the Instituto Agrônomico de Pernambuco (IPA), where the voucher specimen (Number 84.104) was deposited. Leaves were dried using an incubator at 45 °C for 2 to 3 days. The dried material was ground into powder form using a grinder followed by a Waring blender.

For extraction, dried leaves (25 g) were mixed with hexane (100 mL) in a shaker at 125 rpm for 72 h at 25 °C. Then, the extract was filtered and the supernatant was concentrated in a rotary vacuum. The residue was suspended in 100 mL of chloroform. The extraction procedure was repeated and the residue was resuspended in 100 mL of ethyl acetate. Finally, the residue was subjected to methanol extraction. All extract samples were diluted in 100% dimethyl sulfoxide and stored at 4 °C prior to use.

Phytochemical analysis

The extracts from *B. tetraphylla* were submitted to thin-layer chromatography (TLC) assays in order to perform a qualitative detection of their functional compounds. The extracts were loaded in silica gel F254 + 366 plates (20 × 20 cm; <AQ5>), and developed in a solvent system: A (toluene/dioxan/acetic acid, 180:45:5, v/v) and B (hexane/diethyl ether/formic acid, 130:80:20, v/v). Bands were revealed under UV light (254/365 nm), using ceric sulphate and ferric chloride. The bands were identified by their R_f values and compared with the standards used.

Antimicrobial assays

Candida albicans strains

A total of 10 *C. albicans* strains were used in this study. The standard strain (UFPEDA1007) was obtained from the Microbial Collection of the *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco* (UFPEDA). The clinical strains were isolated from vaginal secretions at different clinical laboratories in Recife (Pernambuco, Brazil) and kindly provided by them between September and December 2012.

The antibiotic-susceptibility profile of each isolate was performed according to the CLSI recommendations (CLSI 2011) using the disc-diffusion assay on Sabouraud dextrose agar (SDA). In brief, colonies from overnight cultures of *C. albicans* were suspended in sterile saline water equivalent to a 0.5 McFarland standard.

Table 1. Antibiotic-resistance profile of *C. albicans* clinical strains isolated from vaginal secretion samples.

Strain	Amphotericin B	Ketoconazole	Fluconazole	Itraconazole
F01	R	S	S	S
F02	S	S	R	R
F03	S	S	S	S
F08	S	S	R	R
F11	S	S	R	R
F14	S	S	I	I
F22	S	S	I	I
F23	S	S	S	S
F27	S	S	I	I

Interpretation of IDZ values (mm) (CLSI, 2011)			
Drugs	Sensitive (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Amphotericin B	≥15	14–10	<10
Ketoconazole	≥28	27–21	≤20
Fluconazole	≥19	18–15	≤15
Itraconazole	≥23	22–14	<13

The suspension (100 µL) was spread over an SDA plate and the antibiotic disc was applied aseptically onto the surface. Afterwards, the plates were incubated at 30 °C for a period of 48 h and then each inhibition diameter zone (IDZ) was measured and interpreted as shown in Table 1. The antibiotics used were amphotericin B, fluconazole, itraconazole and ketoconazole.

The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated as previously described by Krumperman (1983) using the formula $MAR = x/y$, where 'x' is the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance; and 'y' is the total number of antibiotics tested.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method (CLSI 2011). Twofold serial dilution of each extract was prepared in Sabouraud broth and 10 µL of yeast suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The microplates were incubated at 30 °C. After 48 h, 50 µL of resazurin solution (0.01%) were added to each well. The plates were re-incubated for 2 h at 30 °C, and any colour changes from purple to pink was recorded as microbial growth. The lowest concentration at which no colour change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in SDA plates and incubated for 48 h at 30 °C to determine the minimum fungicidal concentration (MFC).

Combinatory effects of *B. tetraphylla* methanolic extract and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole were evaluated against five *C. albicans* strains (F03, F08, F11, F22, 1007). Both samples were added to microplates containing SAB and a twofold serial dilution was prepared (5000 to 98 µg/mL for BTME and 100 to 0.2 µg/mL for fluconazole). The antimicrobial action was evaluated as described for MIC, and after 48 h, the drug/extract interaction was assessed algebraically by determining the Fractional Inhibitory Concentration indices (ΣFIC), according to the following equation:

$$\Sigma FIC = (MIC_E + F/MIC_E) + (MIC_F + E/MIC_F)$$

MIC_E or MIC_F: the MIC extract or MIC fluconazole; MIC_{F+D}: the MIC_E when in combination with fluconazole; MIC_{D+E}: the MIC of fluconazole when in combination with extract; Data interpretation: ΣFIC ≤0.5: synergism (syn);

$0.5 < \Sigma\text{FIC} \leq 1$: addition (add); $1 < \Sigma\text{FIC} < 4$: non-interaction (non); $\Sigma\text{FIC} \geq 4$: antagonism (ant) (Vuuren & Viljoen 2011).

Scanning electron microscopy (SEM)

To evaluate the morphological changes induced by the BTME extract, a sample of 100 μL of a diluted overnight culture of *C. albicans* (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) was added to 1 mL of SAB and mixed with the BTME (MIC). After incubation (12 h at 30 °C) the cells were treated as described by da Silva et al. (2013) and imaged with a Quanta 200 F scanning electron microscope (FEI company).

Determination of nitric oxide production and cell viability in macrophages

J774 macrophages (1×10^5 cells/mL) were seeded in a 96-wells plate for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 and then treated with the BTME (156–2500 $\mu\text{g/mL}$) for another 24 h. After the treatment, the supernatant was used to determine nitric oxide (NO) production, and the adherent cells were used for viability assays. For NO determination, the supernatant (100 μL) from each well was mixed with 100 μL of Griess reagent in a 96-wells plate. After incubation for 15 min at room temperature, the optical density was determined at 540 nm with a microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, Hercules, CA). The nitrite content ($\mu\text{M}/10^6$ cells) was quantified by extrapolation from sodium nitrite standard curve in each experiment. Cell viability was evaluated using the MTT assay, which measures the metabolic conversion of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) salt by mitochondria of viable cells, by the use of coloured formazan dye. At the end of the incubation, the medium was removed and an MTT solution (5000 $\mu\text{g/mL}$ in RPMI) was added to the cells that were further incubated for 3 h. Afterwards, the medium was removed and the intracellular formazan product was dissolved in DMSO. Optical density (OD) was measured at 595 nm. Cell viability was calculated in comparison to the OD obtained by untreated cells.

Haemolytic assay

Blood (5–10 mL) samples were obtained from healthy volunteers by venipuncture and placed in heparinized tubes, after written informed consent was obtained. Human erythrocytes were isolated by centrifugation (1500 rpm for 10 min) and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Each test tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension (1%) and 0.4 mL of the various extracts at different concentrations (156–2500 $\mu\text{g/mL}$). Cells incubated in PBS or in a solution of saponin from *Quillaja* sp. (0.0025%) were used as negative and positive controls for haemolytic activity, respectively. After 60 min of incubation, cells were centrifuged and the absorbance of supernatant was read at 540 nm. The haemolytic activity was expressed by the following formula:

$$\text{Haemolytic activity (\%)} = (A_s - A_b) \times 100 / (A_c - A_b)$$

A_b = solvent absorbance, A_s = sample absorbance; A_c = saponin absorbance.

Statistical analysis

All experiments were performed in quadruplicate with at least two independent experiments. Results are expressed as

Table 2. Phytochemical analysis of *B. tetraphylla* leaves extracts.

Phytochemical compounds	Extract			
	BTHE	BTEE	BTCE	BTME
Hydrocarbons	+	+	-	-
Sugars	+	-	+	-
Glycosides	+	-	-	-
Terpenes	+	+	+	-
Flavonoids	-	+	-	+
Tannins	-	+	-	+

BTHE: *Buchenavia tetraphylla* extracts hexane; BTEE: *B. tetraphylla* extracts Ethyl acetate; BTCE: *B. tetraphylla* extracts Chloroform; BTME: *B. tetraphylla* extracts Methanol.

mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed by Student's *t* test. All analyses were carried out using the Statistica 8.0 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ).

Results

Phytochemical analysis

The phytochemical profile of extracts from leaves of *B. tetraphylla* is shown in Table 2. The results showed that all extracts have at least one class of compound reported as an antimicrobial agent. The hexane extract (BTHE) presented hydrocarbons, glycosides, sugar and terpenes. Flavonoids, terpenes and tannins were detected in the ethyl acetate extract (BTEE), while only terpenes and sugar were found in the chloroform extract (BTCE). Finally, flavonoids and tannins were detected in the methanol extract (BTME).

Antibiotic susceptibility of *C. albicans* strains

All clinical isolates of *C. albicans* tested in this study had their antibiotic-susceptibility profile analyzed (Table 1). According to the disc-diffusion assay, two strains (F03 and F23) were susceptible to all tested antifungal agents; another three isolates (F14, F23 and F27) were susceptible to amphotericin B and ketoconazole and showed intermediate susceptibility to fluconazole and itraconazole; the strain F01 was only resistant to amphotericin B; finally, the strains F02, F08 and F11 showed resistance to fluconazole with cross-resistance to itraconazole (MAR index of 0.5). Fluconazole resistance of each strain was confirmed by MIC determination as recommend by CLSI (CLSI 2011). Strains F03, F08 and 1007 were inhibited by fluconazole at 3.125 $\mu\text{g/mL}$, while strains F11 and F22 were inhibited by the same drug at 6.25 $\mu\text{g/mL}$.

Anti-*C. albicans* action of *B. tetraphylla* extracts

The inhibitory action of *B. tetraphylla* extracts was evaluated against 10 *C. albicans* strains (Table 3). The extracts showed anti-*C. albicans* activity against all tested strains, including the azole-resistant strains (F02, F08 and F11). The MIC values ranged from 156 to 2500 $\mu\text{g/mL}$ for the BTHE; 156 to 1250 $\mu\text{g/mL}$ for the BTCE; 625 to 1250 $\mu\text{g/mL}$ for the BTME and 625 $\mu\text{g/mL}$ to 2500 $\mu\text{g/mL}$ for the BTEE. The BTME and BTCE showed the best antimicrobial potential with no significant difference between their average MFC values ($p > 0.05$). A moderate negative correlation was observed between the MAR indexes of all strains and MIC ($\rho = -0.39$) or MFC ($\rho = -0.33$) values of the

Table 3. The anti-*Candida albicans* activity of extracts from *B. tetraphylla* leaves.

<i>C. albicans</i> strains	MAR index	<i>B. tetraphylla</i> extracts											
		Ethyl acetate			Chloroform			Hexane			Methanol		
		MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC
F01	0.25	1250	>5000	>4	625	5000	8	625	1250	2	625	1250	2
F02	0.5	1250	5000	4	1250	2500	2	2500	5000	2	625	2500	4
F03	0	2500	>5000	>2	625	2500	4	625	2500	4	1250	2500	2
F08	0.5	625	>5000	>8	625	1250	2	1250	5000	4	625	1250	2
F11	0.5	1250	2500	2	625	1250	2	156	1250	8	625	1250	2
F14	0	625	5000	8	625	1250	2	625	>5000	>8	625	1250	2
F22	0	1250	5000	4	625	2500	4	1250	2500	2	625	2500	4
F23	0	2500	5000	2	625	1250	2	1250	2500	2	1250	2500	2
F27	0	625	1250	2	625	1250	2	1250	2500	2	625	2500	4
UFPEDA 1007	0	625	2500	4	156	312	2	1250	5000	4	625	1250	2
Average MIC		1250 ± 721 µg/mL			641 ± 260 µg/mL			1078 ± 636 µg/mL			750 ± 264 µg/mL		
Average MFC		4125 ± 1450 µg/mL			1096 ± 1305 µg/mL			3250 ± 1581 µg/mL			1875 ± 659 µg/mL		

^aMIC e MMC is expressed at µg/mL; MAR index: multiple antibiotic resistance index; UFPEDA: Microbial Collection of the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

BTME, indicating this extract was slightly more active against the resistant strains. Moderate and weak positive correlations were found between the MAR indexes and MIC ($\rho = 0.51$) or MFC ($\rho = 0.14$) values of the BTCE. Additionally, the MFC/MIC ratios ranged from 2 to 4 for the BTME, thus it was a fungicidal agent against all tested strains. Both fungicidal and fungistatic effects were observed for the BTCE (MFC/MIC ratios ranged from 2 to 8), but fungicidal action was more prominent (for nine strains). Since the BTME showed the strongest activity it was chosen for further biological activity assays.

Combinatory effects of the BTME and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole are shown in Figure 1. The extract had the ability to increase the action of fluconazole in most strains through additive (20% of strains; Σ FIC = 0.75) or synergetic (60% of strains; Σ FIC values of 0.375 and 0.5) effects. Non-interaction was observed against one strain (Σ FIC = 2).

Morphological changes induced by the BTME

The morphological alterations induced by the BTME in the fluconazole-resistant F08 strain were evaluated using scanning electron microscopy. This strain was chosen because it presents a high degree of cell surface hydrophobicity *in vitro* (data not shown), a property related to the increase of *C. albicans* adherence and virulence (Blanco et al., 2009; Silva-Dias et al. 2015). After 12 h of cultivation, untreated samples (Figures 2(a–c)) showed a predominance of budding blastoconidial cells with a normal elliptical shape, smooth surface and formation of hyphal structures exhibiting a homogeneous, elongated shape without constrictions (Figure 2(a)). BTME-treated cells (Figures 2(d–f)) showed intense deposition of flocculated material on the cell surface, more elongated blastoconidial morphology with several scars (Figure 2(e)). However, no filamentation could be observed and hyphal structures were not seen in treated samples. Cells presenting depressions on the cell surface could also be observed (Figure 2(f)). No ruptured cells or alterations on the yeast cell surface were detected.

Effects of the BTME on cell viability and NO production

The treatment of J774 macrophages with different concentrations of the BTME resulted in significant production of NO at

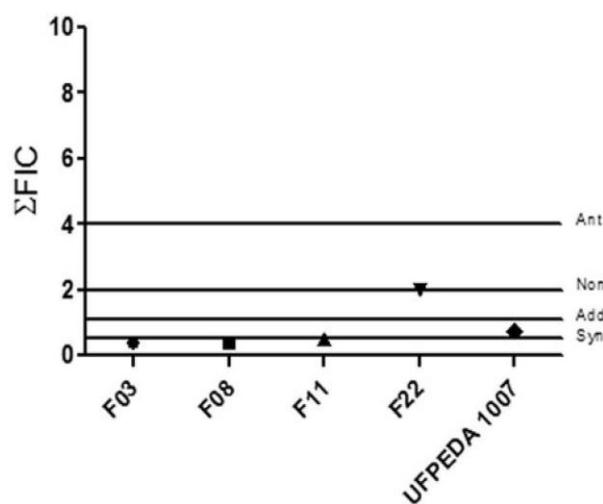


Figure 1. Combinatory effects of BTME and fluconazole against *Candida albicans*. non: non-interactive effect; add: additive effect; syn: synergistic effect; ant: antagonistic effect.

concentrations from 312.5 to 2500 µg/mL ($p > 0.05$), in a dose-dependent manner (Figure 3). Regarding cytotoxicity, the BTME extract showed IC₅₀ values of 981 µg/mL against J774 macrophages and 3935 µg/mL against erythrocytes.

Discussion

C. albicans is the most prevalent pathogen associated with vulvovaginal candidiasis, and it is estimated that it affects approximately 75% of women at least once during their lifetime. This pathology represents significant health issues for women of child-bearing age, as well as diabetic and immuno-deficient patients. Vulvovaginal candidiasis is associated with considerable morbidity, increased healthcare costs, distress, pain and sexual dysfunction (Cassone 2014). *C. albicans* strains isolated from vaginal secretions have shown increased resistance towards antifungal agents, especially fluconazole. It is important to highlight that the breakpoint of *in vitro* susceptibility for strains isolated from vaginal secretions has been suggested to be 1 µg/mL instead of 8 µg/mL, this is due to the specific pharmacokinetic characteristics of the vagina (Sobel et al. 2003; Marchaim et al. 2012). In this context, this work evaluated the antifungal action of extracts from leaves of *B. tetraphylla* against fluconazole-resistant and fluconazole-sensitive strains of *C. albicans* isolated from human vaginal secretions.

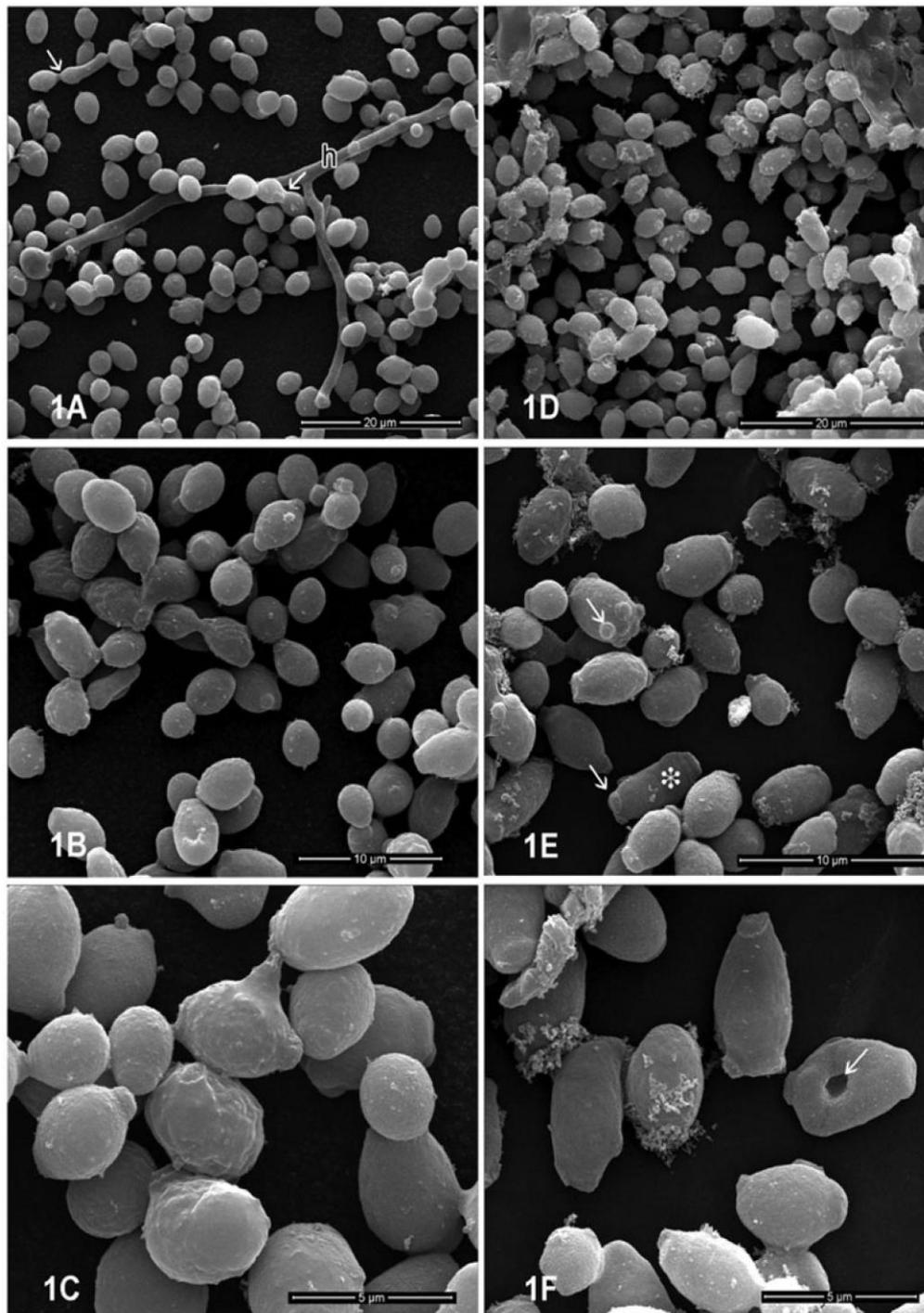


Figure 2. Effects of BTME on *C. albicans*. (a–c) Control cells; (d–f) cells treated with BTME at MIC for 12 h. (a–c) Ultrastructural aspects of untreated *C. albicans* culture at low (a) and high magnification (b–c) showing the presence of single and budding yeast cells with evident fragile blastoconidial septum (white arrow). (h) True hyphal structures could be also observed. Treated *C. albicans* culture at (d) low and (e–f) high magnifications. Note in (e) the presence of elongated cells (white asterisk) with multiple scars (white arrow). (f) Cells presenting surface depressions are indicated in white arrow.

It has been reported that *B. tetraphylla* leaves are a source of compounds with anti-*C. albicans* activity (Oliveira et al. 2012). Furthermore, Teodoro et al. (2015) found remarkable anti-*Candida* activity of another member of the *Buchenavia* genus, *B. tomentosa*. All the extracts were also effective against the clinical isolates tested. Furthermore, the extraction method used in this present paper increased the antifungal potential of this plant, as the average MIC values of the standard strain were up to 40 times lower than those reported by Oliveira et al. (2012). Among the extracts, the BTME and BTCE showed the best activity and no significant differences were observed between their MIC or MFC values. The BTME is more effective against

the fluconazole-resistant strains than the BTCE, as confirmed by correlation analysis (the Pearson coefficient for their MIC values was -0.032 ; and 0.076 for their MFC values). Two mammalian cell types were used to determine the cytotoxic potential of each extract: human erythrocytes and mice macrophages. Both models are widely used to assess the toxicity of plant-derived products (Oliveira et al. 2012; Santos Aliança et al. 2014; Sant'Anna da Silva et al. 2016). In the cytotoxicity assays, the BTME showed IC_{50} values of 981 and 3935 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. These values are higher than the average MIC of the BTME (625 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Therefore, it was decided to evaluate the morphological changes

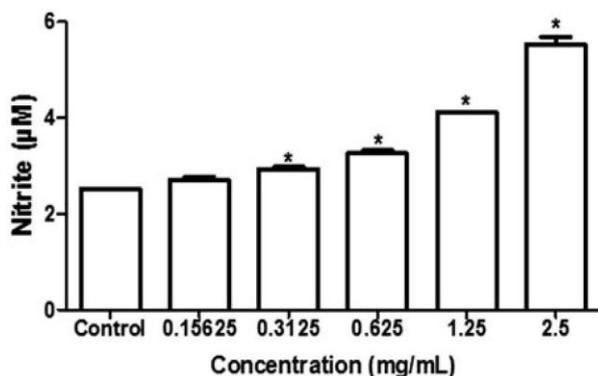


Figure 3. Effect of BTME on nitric oxide production by J774 macrophages. *Significant differences in relation to control ($p < 0.05$).

induced by the BTME and its effects when in combination with fluconazole.

Fluconazole is recommended as the first choice for treating pathologies caused by *C. albicans*, mainly due to its high efficiency and good pharmacokinetic properties (Pappas et al. 2015). However, the appearance of fluconazole resistance represents an enormous limitation for its use in the treatment of candidiasis (Morschhäuser 2016). Consequently, combination therapy has been indicated as a useful alternative to manage *Candida* infections (Cui et al. 2015). Measurement of the combinatory effects of natural products and antimicrobial agents has been taken as a new strategy in the battle against drug resistance (Hemaiswarya et al. 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich 2009; Cui et al. 2015) and a range of plant-derived products have been used to increase or restore the action of some antifungal agents such as fluconazole (Khan & Ahmad 2012; Avijgan et al. 2014; da Silva et al. 2014). The BTME was able to increase fluconazole activity against the five resistant strains by additive and synergetic effects. Compounds from both flavonoid and tannin classes (same classes detected in the BTME) are reported as enhancers of fluconazole activity (Endo et al. 2010, da Silva et al. 2014).

Depending on environmental conditions, *C. albicans* can assume three different morphotypes during its development: blastoconidial, pseudohyphal and hyphal forms. Furthermore, *C. albicans* easily develops into a biofilm on surfaces, which when compared to planktonic cells, displays stronger resistance to a wide variety of antifungal agents (Staniszewska et al. 2012; Ma et al. 2015). Different from the control cells, morphological observation showed a predominance of single, isolated blastoconidia over the budding cells and no true hyphal development. These results suggest that the BTME substantially affected the morphogenetic transition of *C. albicans*, which is crucial to its virulence (Staniszewska et al. 2012). The ability to produce hyphae (and them switch between yeast and filamentous forms) is of extreme importance to the pathogenesis of candidiasis and is considered the central virulence attribute (Berman & Sudbery 2002; Dalle et al. 2010; Mayer et al. 2013). The yeast-to-hyphae transition is related to tissue damage and invasion and the host inflammatory response, as well as mediating *Staphylococcus aureus* co-infection (Peters et al. 2014; Schlecht et al. 2015). The ability of the BTME to inhibit hyphal formation can be considered an attractive characteristic for anti-*C. albicans* therapy, especially during biofilm formation (Jacobsen et al. 2012).

Finally, the BTME induced the significant production of NO from macrophages. NO is a reactive oxygen nitrogen species which is recognized as a marker of macrophage activation, playing an essential role in antimicrobial defence. Specifically, NO suppression is a mechanism used by *C. albicans* to evade the

immune system response, thus macrophage function modulation is a potential aim for antifungal therapy (Collette et al. 2014).

In conclusion, this study demonstrated that *B. tetraphylla* is a great source of antimicrobial compounds able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains. The methanol extract induced significant morphological changes in treated cells and enhanced NO production *in vitro*. Therefore, it is presented as a promising source of antifungal agent(s) for the treatment of *C. albicans*. The identification, molecular and *in vivo* studies of the active substance(s) will be areas of important future research aimed at finding alternative, new strategies for controlling *C. albicans* infections using natural products from the Caatinga.

Acknowledgements

The authors are grateful to the following Brazilian agencies: the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (CAPES).

Disclosure statement

The authors confirm that there is no conflict of interest in this article content.

Funding

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [10.13039/501100003593], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [10.13039/501100002322], Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [10.13039/501100006162].

ORCID

Luís Cláudio Nascimento da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-4206-0904>

References

- Agra MF, Baracho GS, Silva KN, Basílio IJLD, Coelho VPM. 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 111:383–395.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. *Braz J Pharmacog.* 18:472–508.
- Avijgan M, Mahboubi M, Nasab MM, Nia EA, Yousefi H. 2014. Synergistic activity between *Echinophora platyloba* DC ethanolic extract andazole drugs against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering chronic recurrent vaginitis. *J Mycol Med.* 24:112–116.
- Berman J, Sudbery PE. 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 3:918–932.
- Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. 2009. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 27:195–199.
- Cassone A. 2014. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG.* 122:785–794.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21. *Clin Lab Std Inst.* 30.
- Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. 2014. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. *PLoS One.* 9:e96203.

- Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. 2015. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*. 6:362–371.
- da Silva CR, de Andrade Neto JB, de Sousa Campos R, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HI, Cavalcanti BC, Gaspar DM, de Andrade GM, Lima IS, et al. 2014. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 58:1468–1478.
- Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 12:248–271.
- Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 161:534–540.
- Fadda ME, Podda GS, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. 2015. Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three-year survey. *J Prev Med Hyg*. 49:69–74.
- Gow NA, Hube B. 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 15:406–412.
- Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 16:1–30.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15:639–652.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächter B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1:85–93.
- Khan MAS, Ahmad I. 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 67:618–621.
- Krumperman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*. 46:165–170.
- Ma C, Du F, Yan L, He G, He J, Wang C, Rao G, Jiang Y, Xu G. 2015. Potent activities of roemerine against *Candida albicans* and the underlying mechanisms. *Molecules*. 20:17913–17928.
- Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. 2012. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 120:1407–1414.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4:119–128.
- Morschhäuser J. 2016. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 54:192–201.
- Oliveira YLC, Silva LCN, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. 2012. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). *Sci World J*. 2012:1–6.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Zaoutis TE. 2015. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 62:e1–50.
- Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Noverr MC. 2014. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun*. 82:532–543.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 36:1–53.
- Sant'Anna da Silva AP, Nascimento da Silva LCN, Martins da Fonseca CS, de Araújo JM, Correia MT, Cavalcanti MS, Lima VL. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* Jacq. *Front Microbiol*. 7:963.
- Santos Aliança AS, Anjos KF, Vasconcelos Reis TN, Higino TM, Brelaz-de-Castro MC, Bianco EM, Figueiredo RC. 2014. The *in vitro* biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. 19:14052–14065.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 62:10–24.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, Shirtliff ME. 2015. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 161:168–181.
- Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQD, da Silva MV, Correia MTDS. 2013. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*. 27:1492–1496.
- Silva LN, Trentin DDS, Zimmer KR, Treter J, Brandelli CLC, Frasson AP, Macedo AJ. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol*. 53:464–468.
- Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 6:1–8.
- Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Panzer H. 2003. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida vaginitis*: clinical implications. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:34–38.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurzatkowski W. 2012. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol J Microbiol*. 61:129–135.
- Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Khouri S, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. 2015. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*. 10:917–927.
- Vuuren SV, Viljoen A. 2011. Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med*. 77:1168–1182.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16:97–110.
- Weaver PL. 1991. *Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) Eichler: Granadillo. New Orleans (LA): Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station.

ANEXO A – Autorização para atividades com finalidade científica de plantas do Vale do Catimbau



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26743-1	Data da Emissão: 28/01/2011 12:34
Dados do titular	
Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material botânico	01/2011	12/2014
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BUIQUE	PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Angiospermae (*Qtde: 5), Pteridophyta (*Qtde: 5), Magnoliophyta (*Qtde: 5), Bryophyta (*Qtde: 5)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44726333



Página 1/2

ANEXO B – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

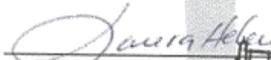
Certificamos que o projeto intitulado: **Avaliação in vitro do potencial tripanocida, citóxico e imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga**, protocolado sob nº 60/2014 pelo (a) pesquisador (a) Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 03/11/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 03 de novembro de 2017.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo heterogênio Albino Swiss macho	386
Camundongo heterogêneo Albino Swiss fêmea	170
Camundongo isogênico BALB/c macho	416

We certify that project entitled **Análise in vitro do potencial tripanocida, citóxico e imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga**. Protocol nº 60/2014, coordinated by Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on November 03, 2014. In present version this project is licensed and valid until November, 03, 2017.

Recife (PE, Brazil) November, 03, 2014.


 Dra. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqAM/FIOCRUZ
 Dr^a Laura Helena Vega Galvão
 Coordenadora CEUA/CPqAM