

CAMILA MARIA OLIVEIRA DE AZEREDO

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI***

CURITIBA

2013

CAMILA MARIA OLIVEIRA DE AZEREDO

EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Maurílio José Soares

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Azeredo, Camila Maria Oliveira de
Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Trypanosoma cruzi*. / Camila
Maria Oliveira de Azeredo. – Curitiba, 2013.
74 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Maurílio José Soares

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Tripanossomo 2. Essencias e oleos essenciais I. Título II. Soares,
Maurílio José III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 616.9363

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dr. Maurílio José Soares
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC



Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR

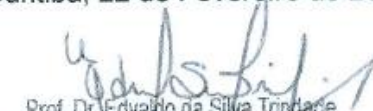


Profa. Dra. Josiane Cardoso
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a mestranda **Camila Maria Oliveira de Azeredo**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *Trypanosoma cruzi*" são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2012



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Aos melhores pais do mundo! Pela paciência, dedicação, amor e incentivo! Obrigada por me ensinarem o significado da palavra *persistência*!

À minha irmã pela companhia, pelo amor, broncas e por todas as risadas compartilhadas!!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurílio José Soares pela orientação, confiança e principalmente pela paciência. Pelo exemplo de pesquisador, de docente e de pessoa simples, íntegra e (de novo!) paciente. Muito obrigada pela amizade e respeito, jamais esquecerei!

Aos amigos de laboratório Claudia Maria do Nascimento Moreira, Cassiano Batista, Luan Klotz, Sandryeli Pereira de Souza, Lígia Kalb, Iriane Eger, Josiane Cardoso, Yohana Friedrich e Guilherme Batista pela amizade, por me ajudar nos momentos de incerteza e me acalmar quando tudo parecia dar errado! Mas principalmente, por todas as risadas e momentos descontraídos que tivemos.

As amigas Vanessa Martins dos Santos e Patrícia Morking pela amizade, incentivo, ajuda com experimentos, discussão de resultados ou da falta deles!

Ao Rafael Kessler pela realização dos experimentos de citometria, pela paciência e pela amizade.

Aos colegas Nilson Fidêncio, Tânia, Vanessa, Silvío e a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas, pelo suporte técnico e orientação.

À Dr. Beatriz Helena Noronha, pela análise em CG-EM.

À minha família por todo o apoio, incentivo e por acreditar em mim em todos os segundos da minha jornada.

Aos amigos que não estavam presentes no laboratório ou nas aulas, mas ainda sim presentes em todos os momentos... Obrigada por me escutarem reclamar, me alegrar, “pensar alto”, etc., mesmo sem entender direito o meu trabalho!

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

A doença de Chagas, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas no mundo. O tratamento para a doença é baseado em apenas dois fármacos, o benzonidazol e o nifurtimox, os quais apresentam uma variedade de efeitos colaterais. Devido às dificuldades de tratamento, há urgência na busca por novos fármacos. Uma das alternativas é a procura por produtos naturais que sejam efetivos contra o *T. cruzi*. Óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários que podem ser obtidas de qualquer parte de uma planta. Em vista desta problemática, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* sobre o *T. cruzi* dos óleos essenciais (OEs) de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Citrus limon* (limão), *Cymbopogon nardus* (capim citronela), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* (pitanga), *Myrcarpus frondosus* (cabreúva), *Pinus* sp. (pinho) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Triagem da atividade inibitória destes OEs sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, utilizando o método colorimétrico do MTT, mostrou que o OE mais efetivo foi o de canela ($CI_{50} = 24,5 \mu\text{g/ml}$), seguido dos OEs de cabreúva ($CI_{50} = 60,87 \mu\text{g/ml}$) e pitanga ($CI_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$). A CI_{50} calculada para o benzonidazol foi de $15,8 \mu\text{g/ml}$. Os OEs de *E. citriodora*, *E. globulus* e alecrim não foram ativos em concentrações de até $300 \mu\text{g/ml}$. Avaliação da citotoxicidade dos OEs sobre células Vero, medida pelo teste colorimétrico do MTT, mostrou que o OE menos citotóxico foi o de limão, com $CC_{50} = 281,69 \mu\text{g/ml}$ e o mais citotóxico foi o de canela, com $CC_{50} = 49,4 \mu\text{g/ml}$. O índice de seletividade (IS) do benzonidazol foi 9,33, evidenciando sua menor citotoxicidade *in vitro* quando comparado com os IS dos OE avaliados, como o de canela (2,05), limão (2,63) e pitanga (2,46). A partir dos resultados da triagem continuou-se a avaliação sobre outras formas de *T. cruzi* (amastigotas intracelulares e tripomastigotas metacíclicas) com o OE de canela. Em formas tripomastigotas metacíclicas a CI_{50} foi de $5,05 \mu\text{g/ml}$ e na metaciclogênese *in vitro* foi de $18,2 \mu\text{g/ml}$. Em amastigotas intracelulares a CI_{50} foi de $20 \mu\text{g/ml}$. Avaliação por citometria de fluxo do potencial de membrana mitocondrial (rodamina 123) e da viabilidade celular (iodeto de propídio) de epimastigotas tratados por 24 horas com $24 \mu\text{g/ml}$ ($\approx CI_{50}$) do OE de canela não mostrou nenhuma alteração nas células tratadas, quando comparadas a epimastigotas não-tratadas. Análise do OE de canela por GC-MS encontrou majoritariamente (E)-cinamaldeído (81,52%) e eugenol (16,68%) e em menor quantidade (E)-cariofileno (1,19%), (E)-acetato de cinamila (0,01%) e α -humuleno (0,12%). Em resumo, nossos dados demonstraram que o óleo essencial de canela é ativo sobre as três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* (epimastigota, tripomastigota e amastigota) e interfere na diferenciação celular *in vitro* deste parasita, sendo esta atividade tão eficaz quanto, ou melhor, que a descrita para outros OEs (ou seus principais constituintes) avaliados na literatura. Assim, o óleo essencial de canela representa um forte candidato a maiores estudos visando melhorar a seletividade deste OE sobre tripanosomatídeos patogênicos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Óleo essencial. Canela. Epimastigota. Tripomastigota. Amastigota.

ABSTRACT

Chagas disease, the etiological agent being the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 10 million people worldwide. Disease treatment is based on only two drugs, nifurtimox and benznidazole, which exhibit a variety of side effects. Due to treatment difficulties, there is urgency in the search for new drugs. One alternative is to look for effective natural products against *T. cruzi*. Essential oils are complex mixtures of secondary metabolites that can be obtained from any part of a plant. In view of this problem, the present study aimed to evaluate the *in vitro* inhibitory potential of essential oils (EOs) from *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Citrus limon* (lemon), *Cymbopogon nardus* (citronella grass), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* (Surinam cherry), *Myrcarpus frondosus* (cabreúva), *Pinus* sp. (pine) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) against *T. cruzi*. Screening of the inhibitory activity of these EOs on *T. cruzi* epimastigotes, using MTT colorimetric method, enabled us to demonstrate that the most effective EO was that of cinnamon ($IC_{50} = 24.5 \mu\text{g/ml}$), followed by cabreúva ($IC_{50} = 60.87 \mu\text{g/ml}$) and pitanga ($IC_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$). The IC_{50} of benznidazole was $15.8 \mu\text{g/ml}$. The EOs of *E. citriodora*, *E. globulus* and rosemary showed no activity at concentrations up to $300 \mu\text{g/ml}$. Cytotoxicity test on Vero cells, as evaluated by the MTT colorimetric assay, showed that the least cytotoxic EO was lemon with $CC_{50} = 281.69 \mu\text{g/ml}$ and the most cytotoxic EO was cinnamon, with $CC_{50} = 49.4 \mu\text{g/ml}$. The selectivity index (SI) of benznidazole was 9.33, showing its lower cytotoxicity *in vitro* when compared with the SI of the evaluated EOs, as cinnamon (2.05), lemon (2.63) and pitanga (2.46). From the screening results, evaluation was continued with the cinnamon EO over other developmental forms of *Trypanosoma cruzi* (intracellular amastigotes and metacyclic trypomastigotes). On metacyclic trypomastigotes the IC_{50} was $5.05 \mu\text{g/ml}$, while on *in vitro* metacyclogenesis the value was $18.2 \mu\text{g/ml}$. On intracellular amastigotes, the IC_{50} was $20 \mu\text{g/ml}$. Flow cytometric evaluation of mitochondrial membrane potential (Rhodamine 123) and cell viability (propidium iodide) of epimastigotes treated for 24 h with $\approx IC_{50}$ cinnamon EO showed no alteration in treated cells as compared to non-treated epimastigotes. Analysis of cinnamon EO by GC-MS showed mainly (E)-cinnamaldehyde (81.52%) and eugenol (16.68%) and in less quantity, (E)-caryophyllene (1.19%), (E)-cinnamyl acetate (0.01%) and α -humulene (0.12%). In summary, our data showed that cinnamon essential oil is active against the three developmental forms of *T. cruzi* (epimastigote, trypomastigote and amastigote) and interferes with the process of cell differentiation *in vitro* of this parasite. This activity is as effective, or better, as that described for other EOs (or their main constituents) evaluated in the literature. Thus, cinnamon essential oil represents a strong candidate for further studies to improve its selectivity on pathogenic trypanosomatids.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Essential oil. Cinnamon. Epimastigote. Trypomastigote. Amastigote

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	17
FIGURA 2 - PITANGA, FRUTO DA PITANGUEIRA (<i>EUGENIA UNIFLORA</i>).....	26
FIGURA 3 - LIMÃO SICILIANO (<i>CITRUS LEMON</i>).....	27
FIGURA 4 - <i>EUCALYPTUS SP</i>	28
FIGURA 5 - PLANTIO DE PINHO (<i>PINUS SP</i>).....	29
FIGURA 6 - ALECRIM (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i>).....	30
FIGURA 7 - CAPIM CITRONELA (<i>CYMBOPOGON NARDUS</i>).....	31
FIGURA 8 - CANELA EM PAU (<i>CINNAMOMUN ZEYLANICUM</i>).....	33
FIGURA 9 - CABREÚVA (<i>MYROCARPUS FASTIGIATUS</i>).....	34
FIGURA 10 - CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (DM28C) EM MEIO LIT E A DENSIDADE ÓTICA (D.O.).....	45
FIGURA 11 - EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA (A), CABREÚVA (C), CAPIM CITRONELA (D), LIMÃO (E), PINHO (F), PITANGA (G) SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> CEPA DM28C, AVALIADA POR MTT. (B) CONTROLE COM BENZONIDAZOL.....	48
FIGURA 12 - CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CABREÚVA, CAPIM CITRONELA, LIMÃO, PINHO E PITANGA SOBRE CÉLULAS VERO, AVALIADA POR MTT. CONTROLE COM BENZONIDAZOL.....	49

FIGURA 13 - ANÁLISE POR GC-MS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA.....	51
FIGURA 14 - EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> CLONE DM28C.....	52
FIGURA 15 - EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> CLONE DM28C, PURIFICADOS APÓS METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	53
FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DO CLONE DM28C TRATADAS COM O CI_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA POR 24 HORAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EFEITO DE OES SOBRE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> CLONE DM28C (CI_{50}), CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS VERO (CC_{50}) E RESPECTIVOS INDICES DE SELETIVIDADE (IS).....	49
TABELA 2 – CONSTITUINTES ENCONTRADOS NO OE DE CANELA POR GC-MS.....	51
TABELA 3 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (PI) DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA (OE) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>T. CRUZI</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CC₅₀: concentração citotóxica média, que é citotóxico a 50% de uma cultura de células teste

CG-EM: cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

CI₅₀: concentração inibitória média, necessária para inibir o crescimento de 50% de uma cultura de células teste

EC₅₀: concentração efetiva média; concentração de um fármaco que confere 50% de resposta em relação a dose letal

LD₅₀: dose letal média, necessária para matar (letal) 50% de uma população teste

OE (OEs): óleo (s) essencial (ais)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS	15
1.2 CICLO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	17
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	18
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	21
1.5 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM TRIPANOSOMATÍDEOS	22
1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS AVALIADOS	25
1.6.1 Pitanga	25
1.6.2 Limão siciliano	26
1.6.3 <i>Eucalyptus spp.</i>	27
1.6.4 Pinho	28
1.6.5 Alecrim	30
1.6.6 Capim Citronela	31
1.6.7 Canela	32
1.6.8 Cabreúva	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 REAGENTES.....	36
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	36
3.3 TAMPÕES E SOLUÇÕES	37
3.4 PARASITA – <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
3.4.1 Formas epimastigotas	37
3.4.2 Formas tripomastigotas metacíclicas e formas em diferenciação	37
3.4.3 Amastigotas intracelulares	38
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS	39
3.6 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA POR CG-EM.....	39
3.7 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	40
3.7.1 Na viabilidade de epimastigotas	40
3.7.1.1 Padronização do MTT para epimastigotas	40

3.7.2 Na viabilidade de tripomastigotas metacíclicos e sobre a metaciclogênese <i>in vitro</i>	41
3.7.3 Na proliferação de amastigotas intracelulares	42
3.8 CITOTOXICIDADE	43
3.8.1 Índice de Seletividade (IS)	44
3.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
4 RESULTADOS	45
4.1 CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS E DENSIDADE ÓTICA (D.O.)	45
4.2 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	45
4.3 CITOTOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS VERO	46
4.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	49
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA.....	50
4.6 EFEITO DO OE DE CANELA NA METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	52
4.7 EFEITO DO OE DE CANELA SOBRE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS PURIFICADOS	52
4.8 EFEITO DO OE DE CANELA NA PROLIFERAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES.....	53
4.9 CITOMETRIA.....	54
5 DISCUSSÃO	55
5.1 ÓLEOS ESSENCIAIS TRIADOS.....	56
5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA	59
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma parasitose crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) que ocorre principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica.

Estima-se que existam de sete a oito milhões de pessoas infectadas no mundo, com mais de 25 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHO, 2012). A maioria dos infectados encontra-se na área endêmica, compreendendo 21 países da América Latina: Argentina, Belize, Bolívia, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (WHO, 2013). A doença é considerada tecnicamente uma zoonose, já que os reservatórios naturais são marsupiais e mamíferos placentários que ocorrem no continente americano. A doença em humanos resulta da invasão de ecótopos naturais, bem como do estabelecimento de vetores em moradias humanas devido às pobres condições sócio-econômicas da maioria das populações rurais, onde a doença é endêmica (URBINA, 2010).

O *T. cruzi* é naturalmente transmitido por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). As formas habituais da transmissão ao homem são: a vetorial (fezes contaminadas do inseto triatomíneo depositadas nos locais de picada ou em mucosas), transmissão por via oral, por transfusão sanguínea, ou por transmissão congênita (transplacentária) (COURA, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006; URBINA, 2010). Mecanismos de transmissão menos comum envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e leite materno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A transmissão através de transfusão sanguínea e pela via congênita, juntamente com a intensa migração internacional levou ao espalhamento desta doença a regiões não endêmicas, como os Estados Unidos e Europa ocidental (URBINA, 2010).

A apresentação clínica da doença de Chagas pode ser aguda ou crônica. A fase aguda (inicial), a qual pode ser assintomática (66 a 99% dos infectados) ou sintomática, é diagnosticada pela presença do parasita circulante na corrente sanguínea em quantidades expressivas, podendo ser detectado por exame direto com sangue fresco e pela presença de anticorpos IgM. Gradativamente há redução de parasitemia e aumento de anticorpos IgG. Na fase aguda sintomática, a manifestação mais característica é a febre, podendo ocorrer também edema de face ou de membros inferiores, hepato-esplenomegalia leve a moderada e aumento de linfonodos. Em alguns casos de transmissão oral se observou sangramento digestivo e outros tipos de sinais hemorrágicos concomitantes (PITTELA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; DIAS *et al.*, 2009). Uma pequena porcentagem de pacientes desenvolve encefalite (forma nervosa) e miocardite (forma cardíaca) durante a fase aguda. A taxa de mortalidade nesta fase, entre os pacientes tratados, é de 5 a 10%, sendo a morte na fase aguda usualmente relacionada à falha cardíaca e/ou encefalite (PITTELLA, 2009).

Na fase crônica é difícil a detecção dos parasitas no sangue periférico e o diagnóstico é essencialmente sorológico (anticorpos IgG). Sem tratamento a maioria dos indivíduos permanecerá assintomática por toda a vida. Nessa fase assintomática (indeterminada), o indivíduo não apresenta sintomas nem sinais de comprometimento do aparelho circulatório (avaliação clínica, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais) e do aparelho digestivo (avaliação clínica e radiológica normais de esôfago e cólon), mas apresenta sorologia (IgG) e/ou demonstração parasitológica positiva. Esse quadro pode perdurar por toda a vida do infectado ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva, ou associada (cardiodigestiva) (PITTELA, 2009; COURA, 2007; DIAS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2006; URBINA, 2010).

A forma crônica cardíaca é a manifestação mais importante da Doença de Chagas devido a sua frequência (em torno de 30% dos chagásicos crônicos) e severidade. Os indivíduos desenvolvem arritmias, falha cardíaca e tromboembolismo em consequência da miocardite, fibrose miocárdica, destruição do sistema de condução e redução do número de neurônios cardíacos. Na forma digestiva há disfagia e constipação severa resultante de desperistaltismo do esôfago e cólon (PITTELA, 2009). Cerca de 10% dos chagásicos crônicos desenvolvem a forma digestiva, neuronal ou alterações mistas (WHO, 2012).

1.2 CICLO DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas não-proliferativas) são liberadas nas fezes de insetos triatomíneos durante o repasto sanguíneo, entram na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero e escapam do sistema imune invadindo vários tipos celulares como fagócitos, células musculares e do sistema retículo endotelial, além de células nervosas do coração e do trato gastrointestinal (FIGURA 1). Após a invasão celular, os parasitas escapam dos vacúolos fagolisosomais e no citoplasma se diferenciam em amastigotas, as quais proliferam por fissão binária e em seguida se diferenciam novamente em tripomastigotas, os quais destroem a célula hospedeira e alcançam a corrente sanguínea. Os tripomastigotas sanguíneos invadem outros tecidos ou células e podem ser absorvidos junto com o sangue durante um repasto do inseto vetor (NUSSBAUM *et al.*, 2010; URBINA, 2010).

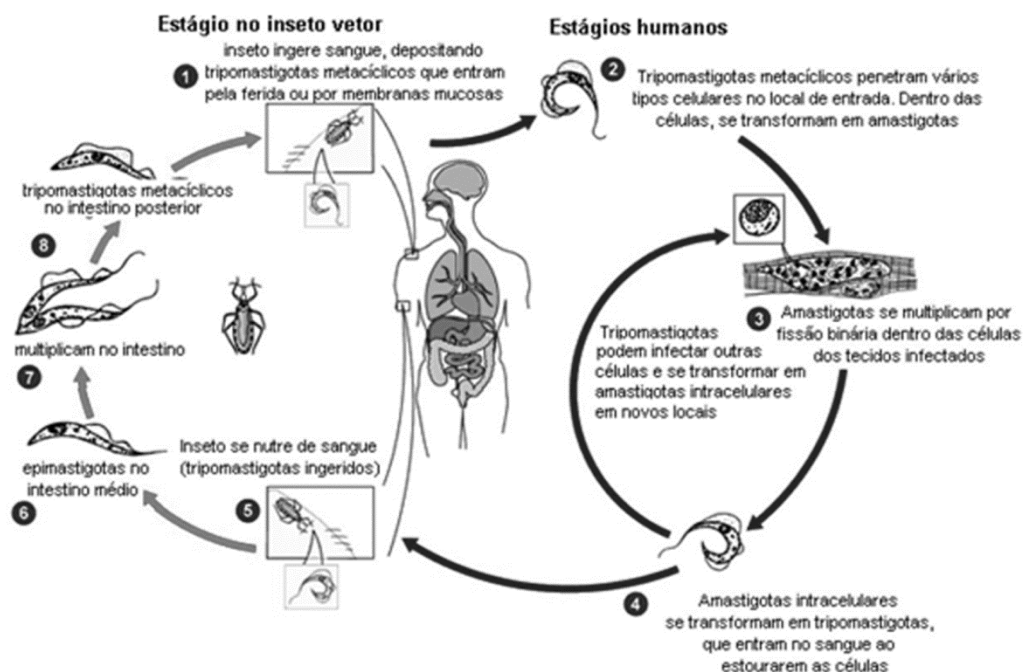


FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* (MODIFICADO DE www.dpd.cdc.gov/dpdx)

No trato gastrointestinal do inseto as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que proliferam rapidamente e se diferenciam em tripomastigotas

metacíclicas na porção terminal no intestino, completando o ciclo (NUSSBAUM *et al.*, 2010; URBINA, 2010). O processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas pode ser mimetizado *in vitro* utilizando-se meio de cultivo específico (meio TAU, Triatomine Artificial Urine) que mimetiza a urina do inseto vetor (CONTRERAS *et al.*, 1985).

1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Desde a descoberta da Doença de Chagas por Carlos Chagas em 1910 foram feitas várias tentativas para encontrar um tratamento eficaz para a doença, com diversos possíveis quimioterápicos sendo estudados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Deste esforço surgiram no fim da década de 60 dois fármacos que são até hoje os únicos utilizados no tratamento da Doença de Chagas: Benzonidazol (Rochagan® no Brasil e Radanil® na Argentina, da Roche) e o Nifurtimox (Lampit®, da Bayer). Ambos foram registrados originalmente para o tratamento da fase aguda da doença de Chagas e continuam sendo atualmente utilizados na fase aguda e na fase crônica inicial da doença (COURA, 2009; URBINA, 2010).

Entretanto, nenhum destes quimioterápicos atende aos preceitos para um fármaco eficiente de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, que são: (i) cura parasitológica em casos agudos e crônicos da infecção; (ii) efetividade em dose única ou em poucas doses; (iii) acessibilidade a pacientes (baixo custo e fácil de obter); (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) sem necessidade de hospitalização de pacientes para o tratamento e (vi) sem mostrar resistência ou indução de resistência no agente etiológico (COURA, 2009; URBINA, 2010).

No Brasil o Nifurtimox é recomendado como alternativa em casos de intolerância ao benzonidazol ou no caso de falha terapêutica (COURA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O Rochagan é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (WHO, 2012). O custo anual de cuidados médicos para todos os pacientes com a doença no mundo é estimado em cerca de U\$ 267 milhões (WHO, 2013). No Brasil, uma estimativa feita em 1987 mostrou que a perda de horas de trabalho por absenteísmo de 75.000 trabalhadores chagásicos representou um custo de U\$ 625

milhões. Consultas médicas, a assistência e o tratamento dos pacientes chagásicos crônicos não estavam inclusos nesta estimativa, e atingiam U\$ 1.000 anuais/paciente (OPAS, 2000, *apud* EGER, 2010).

O tratamento com benzonidazol dura 60 dias ou mais, dependendo do peso e idade do paciente, com duas a três doses diárias. A administração é restrita a unidades ambulatoriais especializadas (unidade básica de saúde, unidade de saúde da família, centros de saúde) e requer monitoramento médico (COURA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O tratamento é eficaz na maioria dos casos agudos (>60%), e congênitos (>95%), apresentando boa eficácia também em casos crônicos recentes (50 a 60%). A eficácia na fase aguda varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido a diferenças na susceptibilidade entre as diversas cepas de *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; URBINA, 2010),

A maior limitação dos fármacos disponíveis é a menor atividade antiparasitária na fase crônica estabelecida (tardia), que é a forma com maior prevalência, já que cerca de 80% dos pacientes crônicos tardios não são curados, de acordo com o critério clássico (negativação de todos os testes parasitológicos e dos testes de sorologia convencionais). A razão para essa perda de eficácia antiparasitária pode estar relacionada a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, como meia-vida relativamente pequena e penetração tecidual limitada, o que limitaria o efeito dos compostos no estágio crônico, já que nesta fase os parasitas (formas amastigotas) estão em sua maioria confinados em tecidos profundos e replicam lentamente (URBINA, 2010).

Nifurtimox e Benzonidazol são tóxicos, com fortes efeitos colaterais ocorrendo em cerca de 40% dos pacientes tratados (WHO, 2012), que podem levar a descontinuidade do tratamento (URBINA, 2010). No tratamento com benzonidazol os principais efeitos colaterais observados são a dermatopatia e a neuropatia. Distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia ocorrem em aproximadamente 10% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Além disso, há o agravante de que algumas cepas de *T. cruzi* são naturalmente resistentes ao fármaco (COURA, 2009). Os efeitos colaterais do tratamento com Nifurtimox incluem anorexia, náusea e vômito, causando severa perda de peso, insônia, irritabilidade e, menos comum, polineuropatia periférica (URBINA, 2010).

A atuação de ambos os fármacos é por formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (DIAS *et al.*, 2009). A ação antiparasitária do nifurtimox está

associada à produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, resultado da reação de oxigênio com metabólitos nitrofurânicos reduzidos. No caso do benzonidazol a citotoxicidade não está relacionada com aumento significativo das espécies reativas de oxigênio e, provavelmente, resulta de um estresse oxidativo que envolve mudança covalente de macromoléculas por derivados de nitro-redução (URBINA, 2010).

Um fármaco que seja eficaz em dose única, não seja tóxico e de baixo custo com utilização tanto no tratamento de pacientes quanto para a prevenção da doença de Chagas é ainda um sonho. Existe assim uma demanda por novas terapias para doenças tropicais, incluindo a malária e doença de Chagas, e portanto pela pesquisa e avaliação de novos compostos que possam ser ativos sobre os agentes etiológicos destas doenças (ROMANHA *et al.*, 2010).

A necessidade de se estabelecer um painel de triagem que permita a identificação de um composto como um terapêutico em potencial para doença de Chagas, chegando aos ensaios clínicos, foi o tópico de discussão do workshop “Modelos experimentais em Triagem de Drogas e Desenvolvimento para Doença de Chagas”, realizado em 2008 no Rio de Janeiro, com a participação do “*Fiocruz Program for Research and Technological Development on Chagas Disease*” (PIDC/ Fiocruz) e do “*Drugs for Neglected Diseases Initiative*” (DNDi). Foi proposta uma padronização para ensaios de triagem *in vitro* e *in vivo* de compostos ativos contra o *T. cruzi*. De acordo com essa padronização, os compostos devem ser ativos em formas tripomastigotas em concentrações iguais ou inferiores à do benzonidazol e com índice de seletividade (IS) maior ou igual a 50 para seguirem para ensaios *in vivo*, sendo assim estes os parâmetros utilizados para avaliação da eficácia de um composto (ROMANHA *et al.*, 2010). O benzonidazol, fármaco utilizado como controle positivo, tem valores de CI_{50} (Concentração Inibitória a 50%) que variam de acordo com a cepa (ou clone) de *T. cruzi* utilizada, com concentrações variando entre 2 a 13 $\mu\text{g/ml}$ (CAMPOS *et al.*, 2010).

O interesse por encontrar compostos ativos em tripanosomatídeos, combinado com o maior conhecimento sobre compostos naturais - mais especificamente, sobre óleos essenciais - vem crescendo, resultando em diversos trabalhos mostrando a atividade biológica de óleos essenciais e/ou seus principais constituintes sobre estes parasitas.

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de metabólitos secundários isolados de diversas plantas. Caracterizam-se por possuir odor forte e serem líquidos voláteis, límpidos e raramente coloridos, podendo ser sintetizados por todos os órgãos das plantas. Nestas misturas encontram-se de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, geralmente havendo dois a três constituintes em maior concentração (principais), que em geral determinam as propriedades biológicas dos OEs, e outros em concentrações traço. Os constituintes são distribuídos em dois grandes grupos de origem biológica distintas: (a) terpenos e terpenóides, e (b) constituintes aromáticos e alifáticos, ambos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI *et al.*, 2008). As vias biossintéticas relativas a terpenos e compostos aromáticos geralmente são separadas nas plantas, mas podem coexistir em algumas, com uma delas sendo a principal (BAKKALI *et al.*, 2008).

Terpenos e terpenóides fornecem grande parte da diversidade estrutural em misturas voláteis de plantas. Terpenos são derivados da condensação do pirofosfato isopentenil precursor C₅ (IPP; C₅) e o seu isômero alílico, pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP; C₅) (BALDWIN, 2010). Os principais terpenos são os monoterpenos (C₁₀) e os sesquiterpenos (C₁₅). Um terpeno contendo oxigênio é chamado de terpenóide. Monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo cerca de 90% dos óleos essenciais. Quando a molécula é opticamente ativa, os dois enantiômeros frequentemente estão presentes (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os compostos aromáticos, que em geral são derivados de L-fenilalanina e frequentemente são elaborados em tecidos florais, incluem compostos feitos por encurtamento de cadeia do ácido trans-cinâmico e de estruturas cooptadas da biossíntese de lignina para formar benzóides. Podem também ser formados independentemente usando poliketídeo sintases tipo III de vários conjugados de Coenzima-A (BALDWIN, 2010).

A extração de óleos essenciais (OEs) pode ser feita por diferentes metodologias, incluindo o uso de micro-ondas, destilação com baixa ou alta pressão empregando água fervente, vapor ou solvente alcoólico, ou ainda extração por esmagamento (ANTHONY, FYFE e SMITH, 2005; BAKKALI *et al.*, 2008). O perfil

químico de um óleo essencial difere, portanto, no número de moléculas e nos tipos de moléculas extraídas dependendo do tipo de extração utilizada. Além disso, fatores como clima, composição do solo, órgão de onde o OE foi extraído, idade e fase do ciclo vegetativo também interferem no perfil qualitativo e quantitativo do OE (BAKKALI *et al.*, 2008), bem como a sazonalidade e a origem do espécimen do qual o OE foi extraído, ocorrendo uma considerável variação na concentração dos componentes encontrados quando se compara OEs de diferentes origens (ESCOBAR *et al.*, 2010; VICTORIA *et al.*, 2012).

Os OEs são conhecidos por seu poder antiséptico, bactericida, virucida e fungicida, e são muito usados na preservação de alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008). Óleos essenciais, ou seus constituintes, possuem largo espectro farmacológico, sendo utilizados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anti-espasmódicos e remédios para anestesia local, funcionando também como anti-helmínticos e anti-protozoários (ALVIANO *et al.*, 2012; BAKKALI *et al.*, 2008; BASSOLÉ e JULIANI., 2012; HAMMER *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2006; YORK *et al.*, 2012).

A atividade dos OEs está associada à característica lipofílica das moléculas que os constituem. Estas moléculas atravessam a membrana celular e rompem a estrutura da camada de fosfolipídios que constituem as membranas, podendo levar a um extravasamento de moléculas e à lise celular (BAKKALI *et al.*, 2008). A habilidade de difusão através de membranas dá a estas moléculas vantagens em agir sobre componentes celulares, estabelecendo uma opção valiosa na procura por componentes bioativos (ALVIANO *et al.*, 2012).

1.5 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Medeiros e colaboradores (2011) estudaram a atividade do OE de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e seu principal constituinte, timol, sobre *Leishmania amazonensis*. Houve atividade sobre formas promastigotas ($CI_{50} = 44,38 \mu\text{g/ml}$, $IS = 4,91$) e amastigotas intracelulares ($CI_{50} = 34,4 \mu\text{g/ml}$; $IS = 6,32$). Timol também foi ativo, mas apresentou toxicidade sobre macrófagos peritoneais. Exame por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) mostrou alterações

na morfologia de parasitas tratados com o OE de maneira dose-dependente, com acúmulo de inclusões lipídicas próximo à membrana plasmática (que podia estar enrugada ou rompida), perda de conteúdo citoplasmático e inchaço (*swelling*) dos parasitas. Segundo os autores, as alterações morfológicas observadas são compatíveis com perda de viabilidade celular e morte por necrose, e as alterações tardias como inchaço do parasita e ruptura de membrana com perda de conteúdo citoplasmático são compatíveis com o efeito deletério do OE na membrana plasmática.

Oliveira e colaboradores (2008) analisaram a atividade sobre promastigotas de *L. chagasi* dos OEs de *Cymbopogon citratus* (conhecido como capim-limão; $CI_{50} = 45 \mu\text{g/ml}$), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta; $CI_{50} = 89 \mu\text{g/ml}$) e *Ocimum gratissimum* (orégano; $CI_{50} = 75 \mu\text{g/ml}$). Tratamento com o OE de *C. citratus* induziu o aparecimento de células aberrantes, com processos mitóticos anormais, aumento de elétrons-densidade nas inclusões lipídicas, vacuolização do citoplasma, inchaço do corpo celular, da bolsa flagelar, da mitocôndria e dos acidocalcissomos. Análise por citometria de fluxo em ensaio com iodeto de propídio mostrou aumento de permeabilidade celular em parasitas tratados com o OE de *C. citratus*, sugerindo que este OE pode ter entrada passiva pela membrana plasmática e se acumule na membrana, levando ao aumento da permeabilidade de membrana observado.

Os OEs de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) mostraram atividade sobre formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* (SANTORO *et al.*, 2007a, 2007b). Em formas epimastigotas, os OEs de orégano e tomilho foram efetivos com $CI_{50} = 175 \mu\text{g/ml}$ e $77 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Em tripomastigotas sanguíneas os CI_{50} calculados foram $115 \mu\text{g/ml}$ e $38 \mu\text{g/ml}$. Timol, o principal constituinte do OE de *T. vulgaris*, foi mais efetivo que o OE total ($CI_{50} = 62 \mu\text{g/ml}$ em epimastigotas, $53 \mu\text{g/ml}$ em tripomastigotas). Análise por MET e MEV de epimastigotas tratados com OE de orégano e timol mostraram leves alterações na membrana plasmática, permanecendo cinetoplasto, núcleo e reservosomos aparentemente inalterados pelo tratamento (SANTORO *et al.*, 2007b). Eugenol (principal constituinte do OE de *S. aromaticum*) e linalol (principal constituinte do OE de *O. basilicum*) foram efetivos em epimastigotas ($CI_{50} = 246$ e $162,5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) e tripomastigotas sanguíneas ($CI_{50} = 76$ e $264 \mu\text{g/ml}$, respectivamente). Três dos OEs avaliados (*S.*

aromaticum, *O. basilicum* e *A. millefolium*) induziram em tripomastigotas, como observado por MET, extrações citoplasmáticas e alterações nucleares, com perda de material nuclear e condensação de cromatina (SANTORO *et al.*, 2007a).

Escobar e colaboradores (2010) investigaram a atividade tripanocida e leishmanicida de OEs extraídos de diferentes espécies de *Lippia*. O OE de *Lippia alba* exibiu maior atividade sobre *T. cruzi* (CI₅₀ = 5,5 µg/ml em epimastigotas; CI₅₀ = 12,2 µg/ml em amastigotas intracelulares; IS = 2,5). O OE de *L. origanoides* teve CI₅₀ = 4,4 µg/ml em promastigotas de *Leishmania chagasi*, mas exibiu toxicidade sobre células de mamíferos. Timol e S-carvona, dois dos componentes majoritários destes OEs, foram ativos em amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, com IS maior que 10, mas não foram ativos em amastigotas de *L. chagasi*.

O OE de *Ocimum gratissimum* foi avaliado sobre o tripanosomatídeo não-patogênico *Herpetomonas samuelpessoai* (HOLETZ *et al.*, 2003), usando-se dois diferentes meios de cultura, um quimicamente definido e outro complexo, com CI₅₀ de 100 e 91 µg/ml, respectivamente. Eugenol (principal constituinte) inibiu o crescimento do parasita nas mesmas concentrações, mas benzonidazol não induziu inibição representativa em meio definido. Ensaios de viabilidade por microscopia óptica mostraram que concentrações altas do OE causavam mais de 50% de morte celular com apenas 2 horas de tratamento. Em nível ultraestrutural foi possível observar inchaço da mitocôndria e modificações na membrana interna, como desorganização e aumento no número de cristas mitocondriais. Ensaios bioquímicos mostraram que a atividade da enzima citocromo c redutase estava reduzida. (HOLETZ *et al.*, 2003). Eugenol, também é o principal constituinte do OE de *Piper betle*, e foi associado à indução de apoptose em *Leishmania donovani* pela geração de espécies reativas de oxigênio tendo a mitocôndria como alvo (MISRA *et al.*, 2009).

Rojas, Palacios e Ronceros (2012) avaliaram a atividade do OE de *Aloysia triphylla* (cedrina) em camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa selvagem não estandardizada) e mostraram que o tratamento produziu uma redução significativa (85,4%) da parasitemia no pico de parasitemia (22º dia pós-infecção) a uma dose de 250 mg/kg. No tratamento com benzonidazol, a dose de 100 mg/kg/dia reduziu a parasitemia em 100%. Observaram também uma redução no número de amastigotas e infiltrados inflamatórios no coração.

Poucos são os dados do efeito de óleos, ou seus principais constituintes, sobre a diferenciação celular em *Trypanosoma cruzi*. No processo de metaciclogênese há apenas um trabalho publicado relatando o efeito de citral, principal constituinte de *Cymbopogon citratus*. Os autores (CARDOSO E SOARES, 2010) mostraram que citral é capaz de inibir a diferenciação *in vitro* de *T. cruzi* de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas em 50% (CI₅₀), a uma concentração de 30,8 µg/ml.

1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS AVALIADOS

1.6.1 Pitanga

Eugenia uniflora, conhecida no Brasil como pitangueira, é apreciada pelos seus frutos avermelhados (FIGURA 2) e utilizada na medicina folclórica através de chá feito de suas folhas para tratar febre, doenças estomacais, hipotensão, gota e hipoglicemia (LAGO *et al.*, 2011). O chá das folhas de pitanga é utilizado também como diurético e anti-inflamatório (VICTORIA *et al.*, 2012). O OE extraído de folhas possui coloração amarelada e odor pungente, sendo constituído principalmente por sesquiterpenos e possuindo atividade antimicrobiana e antifúngica (LAGO *et al.*, 2011).

Já foi mostrado que o OE das folhas de *E. uniflora* tem atividade anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, e que ele não é tóxico *in vivo*, possuindo dose letal mediana, necessária para matar 50% dos camundongos (LD₅₀), igual a 200 mg/kg (VICTORIA *et al.*, 2012). Adewunmi e colaboradores (2001) mostraram a atividade de extratos de folhas de *E. uniflora* sobre *Trypanosoma congolense* e *T. brucei*, com doses letais (LD₅₀) em *T. brucei* variado de 66 a 293 µg/ml, dependendo da fração testada. A atividade do extrato etanólico obtido das folhas de pitanga sobre *T. cruzi* mostrou EC₅₀ (quantidade de extrato necessária para obter 50% de inibição) de 62,76 µg/ml (SANTOS *et al.*, 2012).



FIGURA 2 - PITANGA, FRUTO DA PITANGUEIRA (*EUGENIA UNIFLORA*). FONTE: <http://globomidia.com.br/educacao/pitanga#>.

1.6.2 Limão siciliano

Citrus lemon, ou limão siciliano (FIGURA 3), é utilizado na etnofarmacologia no tratamento de bronquites, dores de cabeça e garganta, rinite e tosse (LIMA *et al.*, 2006). Já se demonstrou que várias espécies pertencentes ao gênero *Citrus* possuem atividade antimicrobiana e antifúngica (HAMMER *et al.*, 1999; LIMA 2006; YORK *et al.*, 2012). Sobre tripanosomatídeos, Habila e colaboradores (2010) mostraram que *Citrus sinensis* tem efeito dose e tempo dependente sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* e *T. brucei brucei*, sendo 15 min o tempo necessário para levá-los a morte, com 100 µg/ml do OE para ambos os parasitas.

Laranja, bergamota e limão são espécies do gênero *Citrus* cujos OEs contém majoritariamente limoneno (ARRUDA *et al.*, 2009), e no caso do OE de limão siciliano há também β-pineno (ROZZA *et al.*, 2011). Arruda e colaboradores (2009) observaram que limoneno tem ação leishmanicida sobre promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀ = 252 µM), *L. major* (CI₅₀ = 354 µM), *L. braziliensis* (CI₅₀ = 185 µM) e *L. chagasi* (CI₅₀ = 201 µM). Em amastigotas de *L. amazonensis* isolados de lesão e incubados *in vitro* ocorreu uma redução da CI₅₀ para 147 µM. Ao tratar macrófagos infectados com *L. amazonensis* com 200 e 300 µM de limoneno se observou redução de 52 e 78% do parasitismo intracelular, respectivamente.



FIGURA 3 - LIMÃO SICILIANO (*CITRUS LEMON*). FONTE:
<http://www.ceasacampinas.com.br/novo/dicasver.asp?id=712>

A atividade *in vivo* de limoneno também já foi avaliada, e se observou que em camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com limoneno por via intra-retal por duas semanas, 80% dos animais tiveram redução significativa no tamanho médio da lesão, além de redução na carga parasitária de 99,9%, após 15 semanas. Com tratamento tópico de lesões, 67-87% dos animais estavam completamente curados. Interessante notar que, tanto no tratamento intra-retal quanto no tratamento tópico, não se observou nenhum efeito colateral nos camundongos tratados (ARRUDA *et al.*, 2009).

Alguns autores já analisaram derivados sintéticos de limoneno, visando obter maior atividade e seletividade desta molécula. Avaliou-se o efeito de derivados β -amino álcoois e derivados amino em grupos isopreno sobre *Leishmania* sp. (FERRARINI *et al.*, 2008; GRAEBIN *et al.*, 2010) e *T. cruzi* (GRAEBIN *et al.*, 2010). Os compostos mais ativos em *T. cruzi* apresentaram valores de CI_{50} próximos ao da droga controle utilizada, o nifurtimox ($CI_{50} = 7,7 \mu M$).

1.6.3 *Eucalyptus* spp.

Os OEs de plantas do gênero *Eucalyptus* (FIGURA 4) têm amplo uso na indústria de cosméticos, alimentícia e farmacêutica. O gênero é utilizado na etnofarmacologia brasileira para uma diversidade de condições médicas (SILVA *et al.*, 2003), possuindo atividade antifúngica, antimicrobiana (HAMMER *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2006; YORK *et al.*, 2012) e repelente (GILLIJ, GLEISER e ZYGADLO,

2008). Bawm e colaboradores (2010) avaliaram a atividade de diversos extratos de plantas sobre tripomastigotas de *Trypanoma evansi* e suas citotoxicidades sobre células MRC-5 (linhagem de fibroblastos pulmonares humanos), sendo que extrato de *E. globulus* obteve um CI_{50} de 51,1 $\mu\text{g/ml}$ para *T. evansi* e 622,95 $\mu\text{g/ml}$ para células MRC-5.



FIGURA 4 - *EUCALYPTUS* SP. FONTE: http://www.123rf.com/photo_14321567_the-eucalyptus-forests.html.

Habila e colaboradores (2010) estudaram o efeito dos OEs de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus calmadulensis*, estabelecendo um efeito dose e tempo-dependente sobre tripomastigotas de *T. evansi* e *T. brucei brucei*. Com a menor concentração avaliada (100 $\mu\text{g/ml}$) em *T. evansi*, *E. calmadulensis* levou 15 minutos para levar à morte os parasitas, enquanto *E. citriodora* precisou de 19 minutos. Na avaliação em *T. brucei brucei*, *E. calmadulensis* levou 17 minutos e *E. citriodora* 22 minutos.

1.6.4 Pinho

O óleo essencial de pinho (FIGURA 5), do gênero *Pinus*, é utilizado como condimento para bebidas e comidas, fragrância em cosméticos e aromatizante em

produtos de limpeza. Na medicina folclórica, várias partes das espécies de *Pinus* (casca, cone, resina) são utilizadas para reumatismo ou como antiinflamatório, antioxidante e antisséptico (SÜNTAR *et al.*, 2012). Além disso, constituintes de seu OE possuem atividade antioxidante (APETREI *et al.*, 2011; SÜNTAR *et al.*, 2012), analgésica e anti-HIV (SÜNTAR *et al.*, 2012), antibacteriana e antifúngica (APETREI *et al.*, 2011).



FIGURA 5 - PLANTIO DE PINHO (*PINUS* SP). FONTE:
<http://br.viarural.com/servicos/turismo/florestas-estaduais/floresta-estadual-santa-barbara/default.htm>.

A atividade da oleoresina e de terpenóides isolados de *Pinus oocarpa* sobre epimastigotas de *T. cruzi* já foi avaliada. Observou-se CI_{50} de 51, 44 e 42,7 $\mu\text{g/ml}$ para ácido pimárico, longifoleno e oleoresina, respectivamente. Os autores consideraram as atividades encontradas melhores que a do nifurtimox, controle positivo utilizado, pois o completo efeito inibitório e a lise total das células foram observados com 200 $\mu\text{g/ml}$, dentro de duas horas de cultivo, enquanto o nifurtimox só mostrou o mesmo efeito após 24 (200 $\mu\text{g/ml}$) ou 48 horas (100 $\mu\text{g/ml}$) (RUBIO *et al.*, 2005).

1.6.5 Alecrim

Rosmarinus officinalis, conhecido como alecrim (FIGURA 6), ou do inglês *rosemary*, é muito utilizado como tempero de alimentos e como fonte de compostos antioxidantes para a conservação de alimentos (MACHADO *et al.*, 2013). É de grande importância devido à sua ação antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antimutagênica, antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva (HUSSAIN *et al.*, 2010; KALEMBA e KUNICKA, 2003). O OE de *R. officinalis* apresenta também potencial repelente para mosquitos (GILLIJ, GLEISER e ZYGADLO, 2008).



FIGURA 6 - ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*). FONTE:
<http://gardenmania.com.br/products/sementes-de-alecrim-%23-rosmarinus-officinalis-%23.html>.

Foi observado que extrato metanólico de *R. officinalis* levou à paralisação de todos os epimastigotas de *T. cruzi* a uma concentração de 2 mg/ml após 2h de incubação, e que após 48 horas se obteve esta paralisação com 1 mg/ml. Ao avaliar triterpenos, as concentrações mínimas para paralisar 100% dos parasitas foram de 1000, 250 e 40 µg/ml com ácido betulínico, oleanólico e ursólico, respectivamente (ABE *et al.*, 2002).

1.6.6 Capim Citronela

O gênero *Cymbopogon* é amplamente utilizado na medicina folclórica. Por exemplo, *Cymbopogon nardus*, conhecida como capim citronela ou citronela (FIGURA 7), é uma planta vastamente utilizada na culinária e perfumaria. Suas folhas são utilizadas mais especificamente no tratamento de reumatismos, febre, parasitas intestinais e cólicas menstruais (ABENA *et al.*, 2007). O OE de *C. nardus*, ou seus principais constituintes, apresenta propriedades antifúngicas (ABENA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2012), antibacterianas (KALEMBA e KUNICKA, 2003) e repelentes para mosquitos (ABENA *et al.*, 2007).

O chá de *Cymbopogon citratus*, o capim-limão, é utilizado no Brasil como antiespasmódico, analgésico, antipirético, anti-inflamatório, diurético e sedativo, possuindo ainda atividades larvicida, antimicobacteriana, antifilárica, ascaricida, antinoceptiva, hipoglicêmica, hipolipidêmica, entre outras (SHAH *et al.*, 2011). O OE de *C. citratus* tem sido amplamente estudado por seu potencial antiparasitário, possuindo atividade antimalária (TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2005) e contra *Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp. (ALVIANO *et al.*, 2012; HABILA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SANTIN *et al.*, 2009; SANTORO *et al.*, 2007a).



FIGURA 7 - CAPIM CITRONELA (*CYMBOPOGON NARDUS*). FONTE:
<http://ensaiosdeciencias.blogspot.com.br/2012/03/citronela-o-repelente-ecologico.html>

Santoro e colaboradores (2007a) avaliaram o efeito de *C. citratus* sobre formas epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Em epimastigotas a CI_{50} do OE total foi de 126,5 $\mu\text{g/ml}$ e em tripomastigotas

sanguíneos de 15,5 µg/ml. Nas formas amastigotas, o valor predito foi $CI_{50}/48h = 5,1$ µg/ml. Tratando os parasitas com citral, principal constituinte deste OE, a CI_{50} diminuiu para 42 e 14,5 µg/ml, em epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente. Os autores observaram alterações morfológicas de epimastigotas tratados, que apresentaram arredondamento celular, mas sem alteração da membrana plasmática. Apenas ocasionais vesículas pequenas (blebs) da membrana plasmática pareciam se soltar da superfície do parasita. A ocorrência de extravasamento nuclear e citoplasmática foi observada tanto em epimastigotas quanto em tripomastigotas tratados.

1.6.7 Canela

O OE de canela (*Cinnamomum* sp.) é muito utilizado na indústria alimentar, principalmente por seu aroma especial (CHENG *et al.*, 2006). A casca da canela quando seca assume uma forma tubular (FIGURA 8), que pode ser consumida assim (no Brasil conhecida por “canela em pau”) ou na forma de pó. Na medicina ayurvédica nativa, a canela é considerada um remédio para doenças respiratórias, digestivas e ginecológicas. Estudos em países ocidentais têm mostrado muitos efeitos potencialmente benéficos da canela à saúde, como propriedades anti-inflamatórias e atividade de controle de glicose no sangue, aumentando a função cognitiva e reduzindo a doença cardiovascular e riscos de câncer de cólon (RANASINGHE *et al.*, 2012; JAYAPRAKASHA, MOHAN RAO E SAKARIAH, 2003, MOHAN RAO e SAKARIAH, 2003). Além disso, suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas também chamam a atenção. Estudos mostram que o OE de *Cinnamomum* sp. tem atividade antitérmica, antibacteriana, antifúngica, repelente e antiparasitária (ANTHONY, FYFE e SMITH, 2005; BASSOLÉ e JULIANI, 2012; CHENG *et al.*, 2006; KALEMBA e KUNICKA, 2003; LIRUSSI *et al.*, 2004).

O principal constituinte do OE de *Cinnamomum* sp. é o cinamaldeído (CHENG *et al.*, 2006; JAYPRAKASHA *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2007). Nibret e Wink (2010) estudaram a sua atividade sobre *T. brucei brucei*, encontrando uma alta atividade tripanocida deste constituinte, com $CI_{50} = 2,93$ µg/ml. A citotoxicidade foi

avaliada em células HL-60, com $CI_{50} = 32,62 \mu\text{g/ml}$, resultando em um Índice de Seletividade (IS) de 11,13.



FIGURA 8 - CANELA EM PAU (*CINNAMOMUM ZEYLANICUM*). FONTE: <http://chasespeciarias.blogspot.com.br/2010/01/canela.html>

O extrato metanólico de *Cinnamomum cassia* foi avaliado por Lirussi e colaboradores (2004) sobre *T. cruzi*, sendo encontrando $CI_{50} = 3,9 \mu\text{g/ml}$, atividade que foi até 100 vezes maior que a do benzonidazol (aproximadamente $50 \mu\text{g/ml}$). Além disso, nenhuma atividade citotóxica deste extrato sobre leucócitos peritoniais de camundongos foi observada.

1.6.8 Cabreúva

Myrocarpus é um gênero exclusivamente Sul-americano, ocorrendo no norte da América do Sul, leste da Bolívia e nas regiões norte, sul e sudeste do Brasil. Os representantes do gênero geralmente são árvores de grande porte (FIGURA 9). Na medicina popular é usado no tratamento de feridas, abscessos, frieiras e sarnas, além da indicação para o tratamento de bronquite, laringite, catarro, tuberculose, disenteria e como anti-inflamatório (DI STASI *et al.*, 2002; RAUBER, 2006).

O óleo essencial de cabreúva (*M. fastigiatus*) é utilizado na perfumaria devido ao seu aroma agradável e possui atividades antibacteriana (WANNER *et al.*, 2010), nematocida (ANDRÉS *et al.*, 2012) e antioxidante (DUDONNÉ *et al.*, 2009). Os principais componentes deste OE são (E) e (Z)-nerolidol, α -bisabolol e (E,E)-

farnesol (WANNER *et al.*, 2010). A atividade de (E)-nerolidol já foi avaliada sobre tripomastigotas de *T. brucei brucei* obtendo-se $CI_{50} = 1,7 \mu\text{g/mL}$ e $IS = 35,7$ (HOET *et al.*, 2006), enquanto o *cis*-nerolidol não foi tão eficaz ($CI_{50} = 15,78 \mu\text{g/ml}$, $IS = 1,87$) (NIBRET e WINK, 2010).



FIGURA 9 - CABREÚVA (*MYROCARPUS FASTIGIATUS*). FONTE:
<http://www.arvores.brasil.nom.br/new/balsamo/index.htm>

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Citrus limon* (limão), *Cymbopogon nardus* (capim citronela), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* (pitanga), *Myrocarpus frondosus* (cabreúva), *Pinus spp.* (pinho) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Calcular a concentração CI_{50} para cada óleo essencial e selecionar o óleo essencial mais eficiente através da triagem contra formas epimastigotas;
- B. Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais em células Vero;
- C. Verificar o efeito do óleo essencial selecionado sobre a metaciclogênese em *T. cruzi*;
- D. Avaliar o efeito do óleo essencial selecionado contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células Vero;
- E. Avaliar o efeito do óleo essencial selecionado contra formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*;
- F. Avaliar alterações no potencial de membrana mitocondrial (rodamina 123) e na viabilidade (iodeto de propídio) de formas epimastigotas tratadas por 24 horas com o óleo essencial selecionado.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES

Amresco: MTT (brometo de tiazol azul de tetrazólio)

Cult-lab: soro fetal bovino (SFB)

Difco: bacto triptona, extrato de levedura, infuso de fígado, triptose

Gibco: penicilina-estreptomicina

Invitrogen: rodamina 123 (Rhd 123), iodeto de propídio (IP)

Merck: ácido clorídrico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, glicina, glicose, metanol, sds, sulfato de magnésio, hidróxido de sódio, fosfato diabásico de sódio, dihidrogenofosfato de potássio

Microbiológica: hemina

Promega: tripsina

Quinari: óleos essenciais de alecrim, cabreúva, canela, capim citronela, limão, *Eucalytus globulus*, *Eucalyptus citriodora*, pinho e pitanga

Sigma-Aldrich: acetato de amônio, ácido bórico, aspartato sódico, corante Giemsa modificado, DEAE-celulose, glutamato sódico, L-prolina, RPMI-1640

USB Corporation: persulfato de amônio

Vetec: DMSO (dimetilsulfóxido)

3.2 MEIOS DE CULTURA

Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute): SFB 2,5%, Penicilina 100 UI/ml, Estreptomicina 100 µg/ml L-Glutamina 2 mM

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose): infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, SFB 10% e extrato de levedura 15 g/l

Meio TAU (Triatomine Artificial Urine): NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM

3.3 TAMPÕES E SOLUÇÕES

PBS (Tampão salina fosfato): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM

PSG: Na₂HPO₄ (anidro) 47,47 mM, NaH₂PO₄·H₂O 2,5 mM, NaCl 36,76 mM e glicose 55,5 mM

Solução de lise de epimastigotas para ensaio de MTT: HCl 0,01 M, SDS 10%

Tripsina: tripsina 0,25%, EDTA 0,1%

3.4 PARASITA – *Trypanosoma cruzi*

3.4.1 Formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c foram mantidas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion - Triptose) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), através de passagens semanais.

3.4.2 Formas tripomastigotas metacíclicas e formas em diferenciação

Formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1988; CONTRERAS *et al.*, 1985; CONTRERAS *et al.*, 1988). Para isto, formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento

(densidade celular $5-7 \times 10^7$ células/ml) foram coletadas por centrifugação a $7000g$ por 5 min a 10°C , suspensas em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm^2 contendo 5 ml de meio TAU3AAG (concentração final de 5×10^6 células/ml). Para obtenção de formas metacíclicas purificadas foram inoculadas garrafas de 150 cm^2 e após 72 horas de cultivo as formas tripomastigotas metacíclicas presentes no sobrenadante foram coletadas e purificadas por passagem através de uma coluna de afinidade contendo a resina DEAE celulose equilibrada em PSG.

3.4.3 Amastigotas intracelulares

Para os ensaios de atividade tripanocida contra formas amastigotas intracelulares, foram utilizadas células Vero (CCL-81) como células hospedeiras [linhagem isolada de células epiteliais de rim de macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*)]. Mantidas a 37°C em estufa umidificada de CO_2 em garrafas de cultura de 25 cm^2 em meio RPMI pH 7,4 + 2,5% SFB acrescido de 2 mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 100 UI /ml de penicilina.

Para os bioensaios, as monocamadas de células Vero foram lavadas com PBS pH 7,2 e tratadas com tripsina 0,25% + EDTA 0,1% por 5 minutos a 37°C . Em seguida, as células foram lavadas em RPMI pH 7,4 + 2,5% de SFB, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C e suspensas no mesmo meio. A viabilidade celular foi verificada pelo corante vital Azul de Tripán, a concentração foi ajustada para 10^6 células/ml e estas foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) para os ensaios de citotoxicidade, e em placas de 24 poços (6×10^4 células/poço) para os ensaios de atividade antiparasitária, em meio RPMI + 2,5% SFB e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células foram utilizadas para os bioensaios de citotoxicidade e de atividade antiparasitária dos óleos essenciais.

Células Vero previamente semeadas em placas de 24 poços foram infectadas com tripomastigotas do clone Dm28c provenientes de cultivo celular, na proporção de dez parasitas por célula Vero. Após quatro horas, as monocamadas

foram lavadas com PBS para remoção dos parasitas não interiorizados e mantidas por 12 horas em 1 ml de RPMI + SFB 2,5% a 37°C e 5% de CO₂.

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Citrus limon* (limão), *Cymbopogon nardus* (capim citronela), *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* (pitanga), *Myrocarpus frondosus* (cabreúva), *Pinus spp.* (pinho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), foram adquiridos da QUINARI Fragrâncias e Cosméticos Ltda (Maringá, PR) e diluídos em DMSO a uma concentração inicial de 100 mg/ml (1º estoque). Para o uso, o 1º estoque foi diluído a 1:100 em meio LIT, obtendo-se uma concentração de 1000 µg/ml (2º estoque) em meio de cultura. Assim o DMSO ficou diluído a 1%, garantindo-se que nos experimentos sua concentração final nunca excedesse 0,5%, uma concentração que não é prejudicial aos parasitas. Estes estoques foram armazenados em geladeira (4°C), no escuro, para evitar sua degradação (GUIMARÃES *et al.*, 2008). Em todos os experimentos foi utilizado o 2º estoque, preparado imediatamente antes de cada experimento.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA POR CG-EM

A análise do óleo essencial (OE) de canela foi realizada no Depto. de Química da UFPR, em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 acoplado ao detector seletivo de massas GCMS-QP2010 Plus equipado com um auto injetor modelo AOC-20i, software GCMSsolution e coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). As condições de análise foram: injetor a 250°C, interface fonte de íons a 300°C, análise de massas entre 40 e 350 m/z, pressão de 59 kPa, fluxo de 24,4 mL/min, velocidade linear: 36,8 cm/s, gás de arraste: Hélio, volume injetado: 1 µL, solvente: Hexano, diluição 1%. Empregou-se na análise rampa de aquecimento com temperatura inicial de 60°C até 250 °C, com aquecimento de 3°C/minuto.

3.7 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

3.7.1 Na viabilidade de epimastigotas

O efeito dos óleos essenciais foi avaliado medindo-se a viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT. O MTT (brometo de tiazolil azul de tetrazólio) é um composto de cor amarelada que ao ser reduzido pelas desidrogenases presentes na membrana mitocondrial de células sadias forma cristais de formazan, com coloração violácea. A quantidade de MTT reduzido pode ser medida através de espectrofotometria (550 nm).

3.7.1.1 Padronização do MTT para epimastigotas

Para se obter uma correlação entre concentração de epimastigotas e densidade ótica (D.O.), formas epimastigotas foram semeadas em diferentes concentrações (7×10^4 a 2×10^7 células/ml) em 200 μ l de meio LIT em uma placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 28°C, os parasitas foram processados para avaliação pelo método colorimétrico do MTT, como descrito abaixo.

3.7.1.2 Avaliação pelo MTT

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (clone Dm28c) mantidas por três dias em meio LIT foram lavadas a 1.000g/10min, suspensas em LIT na concentração de 1×10^7 parasitas/ml e distribuídas em placas de 96 poços (180 μ l/poço). A esses poços se acrescentou 20 μ l dos OEs, em diferentes concentrações (5 a 300 μ g/ml). Como controles foram adicionados 20 μ l de meio de cultura sem compostos ou meio de cultura contendo DMSO a 0,5%.

Após 24 horas de incubação a 28°C foi feita uma análise visual da placa em microscópio invertido (mobilidade, morfologia), a fim de se ter avaliação dos parasitas tratados e assim se precaver contra resultados falso-positivos ou negativos após a leitura das absorbâncias do MTT. Em seguida, foram acrescentados 50 µl de MTT (solubilizado a 10 mg/ml em PBS) em todos os poços (concentração final: 2 mg/ml por poço) e a placa, envolvida em papel alumínio, foi incubada a 37°C.

Após 3h, a placa foi centrifugada a 1.700 rpm por 10 min e o meio foi removido por inversão brusca da placa. Os parasitos foram suspensos em 20 µl de SDS 10% em HCL 0,01 M e incubados a 37° por 1h, ou até a lise de todos os parasitos. Em seguida foram adicionados 80 µl de DMSO em todos os poços e a placa foi novamente incubada a 37°C sob agitação, até a solubilização completa dos cristais de formazan. A leitura foi efetuada a 550 nm em leitor de ELISA.

O cálculo da CI_{50} (concentração que inibe em 50% o crescimento/proliferação dos parasitas) foram estimados a partir dos valores de porcentagem de inibição (em relação ao controle não tratado) obtidos em triplicata técnica, com auxílio do software Excel. Análise estatística (ANOVA) dos resultados foi feita através do software GraphPad Prism.

3.7.2 Na viabilidade de tripomastigotas metacíclicos e sobre a metaciclogênese *in vitro*

A diferenciação para formas tripomastigotas metacíclicos foi realizada *in vitro*, sob condições quimicamente definidas como descrito no item 3.4.2. O óleo essencial de canela, selecionado como o de maior efeito após a triagem em formas epimastigotas, foi adicionado a diferentes concentrações (4 a 145 µg/ml) ao meio TAU3AAG e o processo de diferenciação epi-tripomastigota foi acompanhado por microscopia ótica durante 96 horas. A avaliação foi feita por contagem de tripomastigotas em câmara de Neubauer. Como controle foram avaliadas culturas sem a adição de OE durante o processo de estresse nutricional. A porcentagem de inibição da diferenciação, obtida através do número de epimastigotas e tripomastigotas presentes após 24 horas de metaciclogênese, contendo o OE ou

não (controle), foi utilizada para o cálculo da CI_{50} (concentração que inibe em 50% a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas).

Para a avaliação da lise em tripomastigotas metacíclicos, após a purificação ajustou-se a concentração para 5×10^6 células/ml e os tripomastigotas foram distribuídos em placas de 24 poços em meio TAU3AAG contendo diferentes concentrações (2 a 20 $\mu\text{g/ml}$) do OE de canela, ou sem OE (controle). A avaliação da lise celular foi feita contando-se a densidade de parasitas em Câmara de Neubauer. A densidade de parasitas contados foi utilizada para o cálculo do CI_{50} (concentração que levou a 50% de lise celular). O experimento foi realizado em triplicata técnica.

3.7.3 Na proliferação de amastigotas intracelulares

Células Vero cultivadas e infectadas como descrito no item 3.4.3, após 24 horas de infecção, foram lavadas com PBS e incubadas por 24 horas com diferentes concentrações do OE de canela (5 a 30 $\mu\text{g/ml}$) a um volume final de 1 ml/poço, nas mesmas condições. Em seguida as placas foram lavadas em PBS, fixadas com metanol 100% por 2 minutos e coradas pelo Giemsa (3 gotas por ml de tampão de coloração; centrifugação a 3000 g por 5 min) por 20 min.

A avaliação da atividade tripanocida foi realizada por contagem de 1800 células por poço. Cada poço foi dividido em nove campos, que foram fotografados em microscópio invertido, e a contagem de no mínimo 200 células por campo foi feita utilizando-se o contador de células do software ImageJ. Observou-se o número de células infectadas, o número de amastigotas/célula e o número total de amastigotas/poço.

Os valores foram expressos como percentual de inibição (PI), o qual foi calculado segundo Guru e colaboradores (1989) e modificado por Lakshmi e colaboradores (2007), utilizando a seguinte fórmula:

$$PI = 100 - (T/C \times 100), \text{ onde:}$$

T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas;

C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle.

Os valores da CI_{50} (concentração que inibiu a proliferação de amastigotas intracelulares em 50%) foram estimados a partir dos valores de PI obtidos em triplicata técnica, com auxílio do software Excel. Análise estatística (ANOVA) dos resultados foi feita através do software GraphPad Prism.

3.8 CITOTOXICIDADE

Para avaliar a citotoxicidade dos OEs sobre células Vero, monocamadas de células Vero foram lavadas com PBS pH 7,2 e tratadas com tripsina 0,25% + EDTA 0,1% por 5 minutos a 37°C. Em seguida, lavou-se as células em RPMI-1640 pH 7,4 + 5% de SFB, centrifugou-se a 250g/5 minutos a 4°C e se suspendeu no mesmo meio. A concentração foi ajustada para 10^5 células/ml, e estas foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) em meio RPMI + 5% SFB e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 horas foram incubadas com diferentes concentrações (1000 a 25 µg/ml) dos óleos essenciais por 24 horas.

A integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido, seguindo-se o ensaio colorimétrico do MTT, conforme descrito por Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificado por Sieuwerts e colaboradores (1995). Brevemente: após incubar com OE por 24 horas fez-se a pré-avaliação da placa em microscópio invertido observando-se a morfologia celular, como forma de um controle prévio dos resultados do MTT. Em seguida, foi acrescentado 50 µl de MTT (solubilizado a 2 mg/ml em PBS), e a placa envolta em papel alumínio, foi incubada a 37°C. Após 3 horas, o meio foi removido por inversão brusca da placa e foi acrescentado 100 µl de DMSO. A placa foi agitada manualmente para solubilização dos cristais de formazam, e a leitura foi efetuada a 550 nm em leitor de ELISA.

O cálculo do valor CC_{50} (concentração citotóxica em 50%) foi feito a partir da porcentagem de inibição média (em relação ao controle não tratado) obtida através de triplicata técnica utilizando-se o software Excel.

3.8.1 Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) foi calculado utilizando a fórmula: CC_{50} células Vero / CI_{50} epimastigotas. O valor resultante deste cálculo reflete quantas vezes o OE utilizado é mais seletivo ao parasita em relação às células Vero.

3.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Experimentos de citometria de fluxo foram feitos utilizando o equipamento FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA). Foi coletado um total de 20.000 eventos nas regiões previamente estabelecidas como correspondentes aos epimastigotas de *T. cruzi*. Para análise dos dados utilizou-se o software FlowJo (Treestar software). Para analisar o potencial de membrana mitocondrial, foram coletados 1×10^6 epimastigotas previamente tratados com 24 $\mu\text{g/ml}$ do óleo essencial de canela (próximo ao CI_{50}) por 24 horas, centrifugados a 2000g por 5 min., lavados (2000g/5') com 1 ml de PBS e incubados por 15 min a 28°C com 10 $\mu\text{g/ml}$ de rodamina 123 (Rhd 123). Após 3 lavagens com 1 ml de PBS, as células foram imediatamente quantificadas por citometria de fluxo usando o filtro de 530/30 nm. A análise dos dados foi feita considerando somente células dentro do *gate* utilizando tamanho e granulosidade das células (FSC x SSC scatter). O potencial de membrana mitocondrial relativo foi determinado considerando a razão entre a mediana da intensidade de sinal da Rhd 123 nos parasitas tratados / não tratados.

Para a viabilidade celular, parasitas lavados foram suspensos em PBS contendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídio (IP). Após 15 min incubando a 28°C, as células foram imediatamente quantificadas sem lavar. Parasitas foram considerados mortos quando estavam marcados positivamente utilizando um filtro de 585/42 nm.

4 RESULTADOS

4.1 CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS E DENSIDADE ÓTICA (D.O.)

Foi realizada avaliação com formas epimastigotas de *T. cruzi* para se estabelecer qual a concentração ideal de parasitas para as avaliações com a técnica colorimétrica do MTT. Os dados obtidos demonstraram um aumento no valor de densidade ótica (Absorbância) correlacionável ao aumento na concentração de parasitas no poço, sendo este valor concentração-dependente (FIGURA 10). A partir dos valores de absorbância decidiu-se que a concentração inicial em todos os experimentos seria 10^7 parasitas/ml.

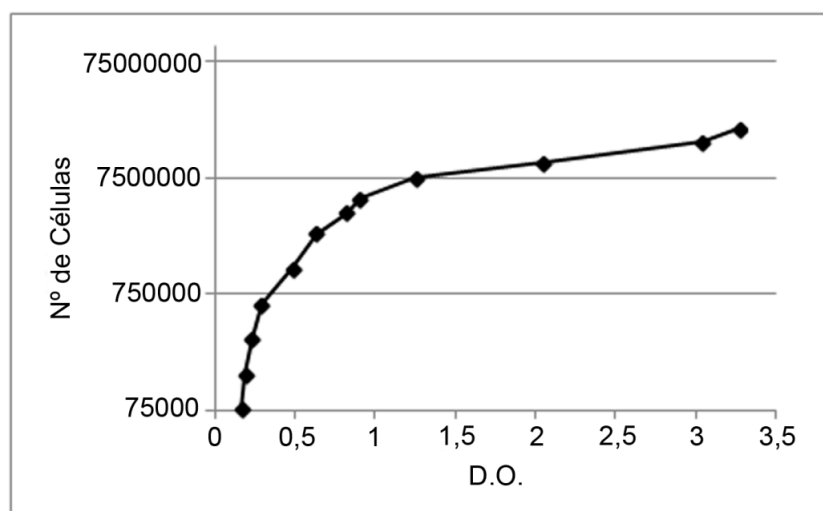


FIGURA 10 - CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (DM28C) EM MEIO LIT E A DENSIDADE ÓTICA (D.O.) APÓS COLORAÇÃO PELO MTT.

4.2 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Foi feita uma triagem inicial de todos os OEs, avaliando-se a atividade nas concentrações de 300 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ sobre formas epimastigotas. Nesta primeira

etapa os óleos de alecrim, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* foram eliminados das avaliações seguintes por não apresentar atividade em nenhuma das concentrações utilizadas.

Para os demais OEs foram avaliadas outras concentrações para estimar a CI_{50} (TABELA 1; FIGURA 11). O OE mais eficaz foi o de canela, com $CI_{50} = 24,5 \mu\text{g/ml}$ (FIGURA 11a), seguido dos OEs de cabreúva com $CI_{50} = 60,87 \mu\text{g/ml}$ (FIGURA 4.2c) e Pitanga com $CI_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$ (FIGURA 11g). A CI_{50} calculada para o benzonidazol foi de $15,8 \mu\text{g/ml}$.

4.3 CITOTOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS VERO

Avaliação de citotoxicidade em células Vero, pelo método colorimétrico do MTT mostrou que o OE com menor citotoxicidade foi o de limão, com $CC_{50} = 281,69 \mu\text{g/ml}$ (FIGURA 12e) e o mais citotóxico foi o OE de canela (FIGURA 12a), com $CC_{50} = 49,4 \mu\text{g/ml}$. Os OEs de canela e cabreúva ($CC_{50} = 141,3 \mu\text{g/ml}$) foram mais citotóxicos (TABELA 1) que o benzonidazol ($CC_{50} = 147,37 \mu\text{g/ml}$).

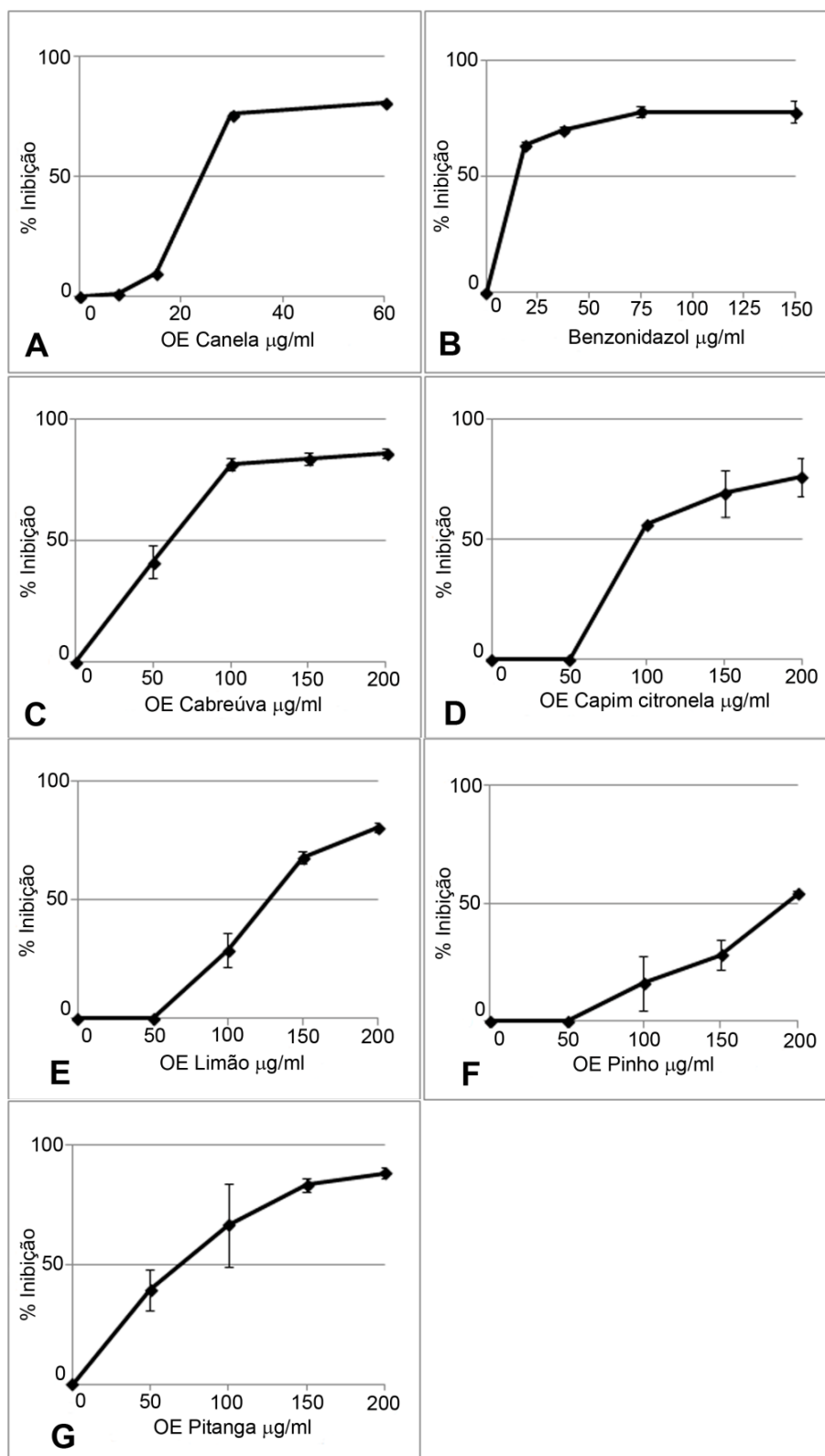


FIGURA 11 - EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA (A), CABREÚVA (C), CAPIM CITRONELA (D), LIMÃO (E), PINHO (F), PITANGA (G) SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CEPA DM28C, AVALIADA POR MTT. (B) CONTROLE COM BENZONIDAZOL. AS BARRAS COREESPONDEM AO DESVIO PADRÃO CALCULADO.

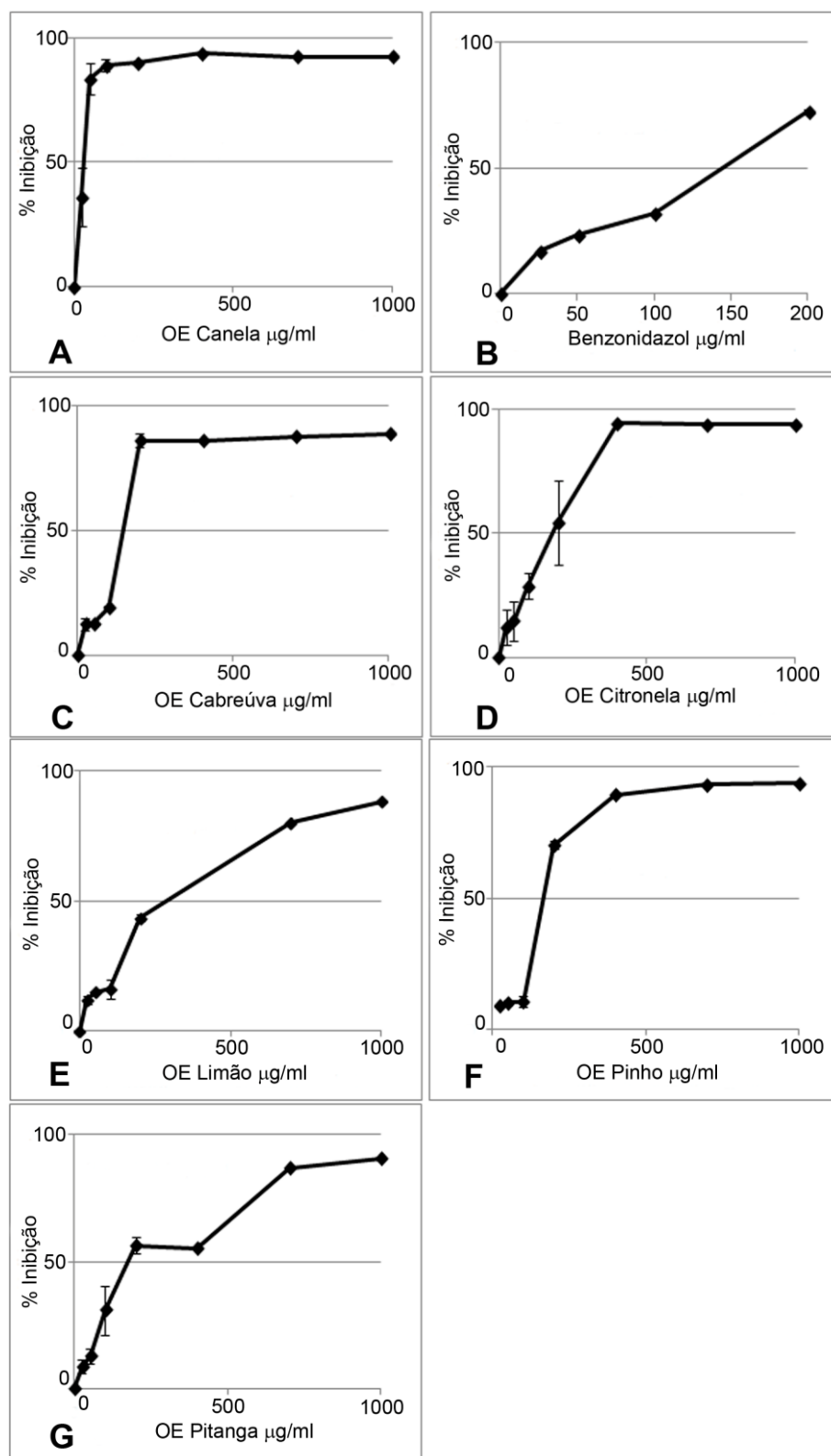


FIGURA 12 - CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA (A), CABREÚVA (C), CAPIM CITRONELA (D), LIMÃO (E), PINHO (F), PITANGA (G) SOBRE CÉLULAS VERO, AVALIADA POR MTT. (B) CONTROLE COM BENZONIDAZOL. AS BARRAS CORRESPONDEM AO DESVIO PADRÃO CALCULADO.

4.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da seguinte fórmula: CC_{50} células Vero / CI_{50} epimastigotas. Este índice indica quantas vezes o OE é mais seletivo aos parasitas do que à célula hospedeira (neste caso às células Vero). Portanto, quanto maior o índice de seletividade mais eficiente e menos tóxico o composto ou OE utilizado. Dentre os OEs avaliados neste trabalho, os que apresentaram os melhores índices de seletividade foram os de canela, cabreúva, limão e pitanga, sendo que nenhum deles obteve IS maior que o do benzonidazol (TABELA 1). A partir do IS (e da atividade tripanocida significativa) escolhemos o OE de canela para ser avaliado nas outras formas do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (tripomastigotas e amastigotas).

TABELA 1 – EFEITO DE OES SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* CLONE DM28C (CI_{50}), CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS VERO (CC_{50}) E RESPECTIVOS INDICES DE SELETIVIDADE (IS).

Óleos Essenciais	CI_{50} epimastigotas (µg/ml)	CC_{50} Cél. Vero (µg/ml)	Índice de Seletividade (IS)
Canela	24,13**	49,4	2,05
Cabreúva	60,87	141,3	2,32
Citronela	94	178,95	1,90
Limão	107,14	281,69	2,63
Pinho	189,61	162,5	0,86
Pitanga	70	172,42	2,46
Benzonidazol	15,8**	147,37	9,33

**Diferença significativa em relação ao benzonidazol e aos outros OEs avaliados ($P < 0,05$).

O OE de canela não foi o que obteve melhor índice de seletividade, mas ainda assim foi o que obteve maior efeito tripanocida (quando comparado com cabreúva, pitanga e limão). Visto que a triagem é realizada em formas epimastigotas e que havia possibilidade de ocorrer diminuição do índice de seletividade quando o OE fosse estudado nas outras formas evolutivas, fenômeno já observado por

Santoro *et al.*(2007a) e Medeiros *et al.*(2011), resolvemos continuar os estudos de atividade com este OE sobre formas tripomastigotas metacíclicas e amastigotas intracelulares. Além disso, a possibilidade de obter os seus constituintes isolados, bem como derivados deles, abre ainda mais a possibilidade de obter maiores índices de seletividade. Embora o OE de limão tenha fornecido o maior IS, ele foi excluído da análise devido à existência de dados já publicados sobre a ação deste OE e seu principal constituinte (limoneno) em *Trypanosoma* spp. (GRAEBIN *et al.*, 2010; HABILA *et al.*, 2010; HAMDAN *et al.*, 2010).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA

O óleo essencial de canela foi gentilmente analisado por CG-EM pela Dr. Beatriz Helena Noronha do Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A análise identificou a existência de cinco constituintes neste OE (FIGURA 13), sendo (E)- cinamaldeído (81,52%) e eugenol (16,68%) os componentes majoritários (TABELA 2).

Os componentes voláteis individuais dos óleos essenciais são identificados por comparação de seus espectros de massas e índices de retenção no sistema GC-EM com substâncias-padrão previamente analisadas e armazenadas no computador do sistema. Outras identificações são feitas por comparação de seus espectros de massas com aqueles de bibliotecas de referências existentes na memória do computador, ou disponível na literatura. Os índices de retenção (IR) são calculados para todos os constituintes voláteis usando-se uma série homóloga de *n*-alcanos, que são analisados por CG-EM nas mesmas condições de operação, e a identificação se dá pela aproximação do IR calculado (IR calc) com IR descritos previamente na literatura (IR lit) (MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001).

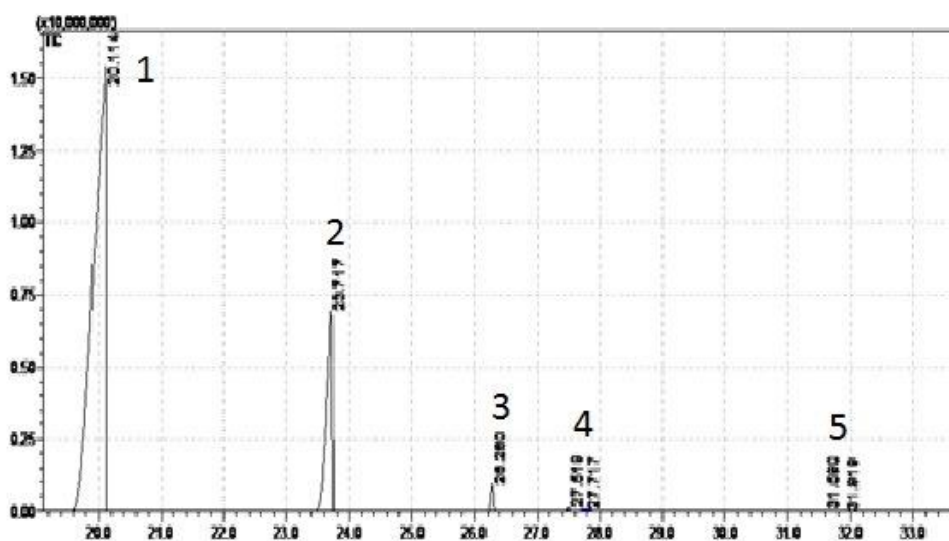


FIGURA 13 - ANÁLISE POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA. 1= (E)-CINAMALDEÍDO, 2 = EUGENOL, 3 = (E)-CARIOFILENO, 4 = (E)-ACETATO DE CINAMILA, 5 = α -HUMULENO

TABELA 2- CONSTITUINTES ENCONTRADOS NO OE DE CANELA POR CG-EM.

Constituinte	Tempo de Retenção	Concentração	IR calc.	IR lit.
(E)-cinamaldeído	20.115	81,52	1282	1267
eugenol	23.713	16,68	1366	1356
(E)-cariofileno	26.274	1,19	1426	1417
(E)-acetato de cinamila	27.280	0,01	1450	1443
α -humuleno	27.709	0,12	1460	1452

IR calc = Índice de Retenção calculado; IR lit = Índice de Retenção da literatura

4.6 EFEITO DO OE DE CANELA NA METACICLOGÊNESE *IN VITRO*

Por ensaio de metaciclogênese *in vitro* foi possível observar que o OE de canela não afetou significativamente a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas até a concentração de 15 $\mu\text{g/ml}$. A partir dessa concentração observou-se uma redução no número de tripomastigotas, sendo a metaciclogênese totalmente inibida a partir de 25 $\mu\text{g/ml}$ ($CI_{50} = 18,2 \mu\text{g/ml}$) (FIGURA 14). Após 48 horas de tratamento com a CI_{50} as poucas células ainda não lisadas já se movimentavam pouco, em comparação com as do controle. No tratamento com 35 $\mu\text{g/ml}$ após 24 horas a maioria das células já havia sido lisada e as poucas restantes já não se movimentavam mais.

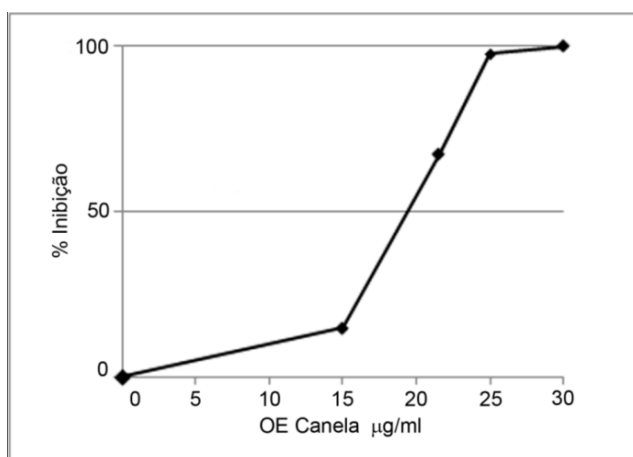


FIGURA 14 - EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A METACICLOGÊNESE *IN VITRO* DO *TRYPANOSOMA CRUZI* CLONE DM28C

4.7 EFEITO DO OE DE CANELA SOBRE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS PURIFICADOS

Foi possível observar que o OE de canela afetou de modo linear formas tripomastigotas metacíclicas purificadas até a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, sendo esta forma visivelmente mais sensível que formas epimastigotas. Estimou-se a CI_{50} em

5,05 $\mu\text{g/ml}$ para formas tripomastigotas metacíclicas (FIGURA 15). O índice de seletividade (IS) aumentou em mais de 4 vezes (9,78), quando comparado ao IS em formas epimastigotas (2,05).

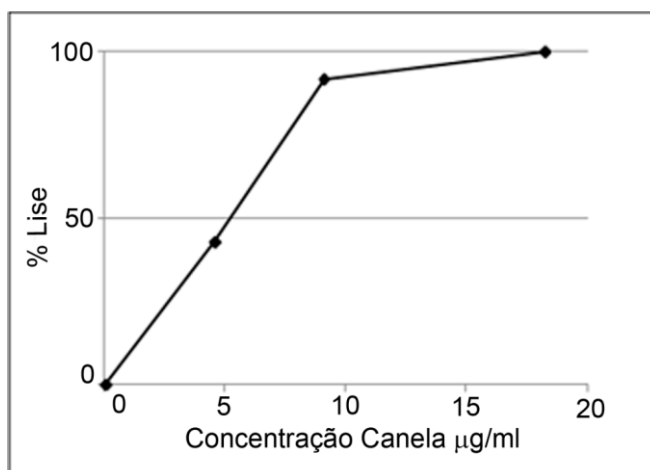


FIGURA 15 - EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CLONE DM28C, PURIFICADOS APÓS METACICLOGÊNESE *IN VITRO*

4.8 EFEITO DO OE DE CANELA NA PROLIFERAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES

O OE de canela foi aplicado sobre células Vero previamente infectadas, para garantir que seria avaliado o efeito sobre a proliferação dos amastigotas e não sobre a infectividade dos tripomastigotas utilizados na infecção.

A CI_{50} , que corresponde à concentração que inibiu em 50% a proliferação [de acordo com o Percentual de Inibição (PI) calculado] de amastigotas totais foi de 20 $\mu\text{g/ml}$ (TABELA 3).

TABELA 3 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (PI) DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA (OE) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *T. CRUZI*.

	Média de amastigotas por célula	Média de amastigotas total	PI (%) [*]
Controle	7,5	25746	-
10 µg/ml OE	6,8	20315	21,10
20 µg/ml OE	5,1 ^{**}	12717 ^{**}	50,61

*PI = 100 – (T/C x 100), onde T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas e C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle (não tratadas).^{**} Significativamente diferente do controle (P < 0,05).

4.9 CITOMETRIA

Parasitas tratados com 24 µg/ml (aproximadamente a CI₅₀) do OE de canela por 24 horas foram analisados quanto à integridade da membrana plasmática por iodeto de Propídio (IP), e integridade mitocondrial por avaliação do potencial de membrana mitocondrial utilizando Rodamina 123 (Rhd 123).

O iodeto de propídio é um corante fluorescente que não é capaz de atravessar a membrana plasmática íntegra, só penetrando portanto em células cuja membrana tenha perdido integridade. Uma vez dentro das células não viáveis ele se liga ao DNA e fluoresce. A rodamina 123 é um fluoróforo que se liga à membrana mitocondrial de células que conservam seu potencial de membrana mitocondrial normal e portanto são viáveis. Quando a célula por algum motivo perde o potencial de membrana, não há deposição da rodamina 123, e portanto não há fluorescência mitocondrial.

Ao avaliar a viabilidade de parasitas tratados com iodeto de propídio (IP) observamos que após 24 horas a viabilidade das células tratadas é a mesma de células controle (FIGURA 16a). O mesmo foi observado na avaliação do potencial de

membrana mitocondrial, onde as células tratadas mantiveram seu potencial igual ao das células controle (FIGURA 16b).

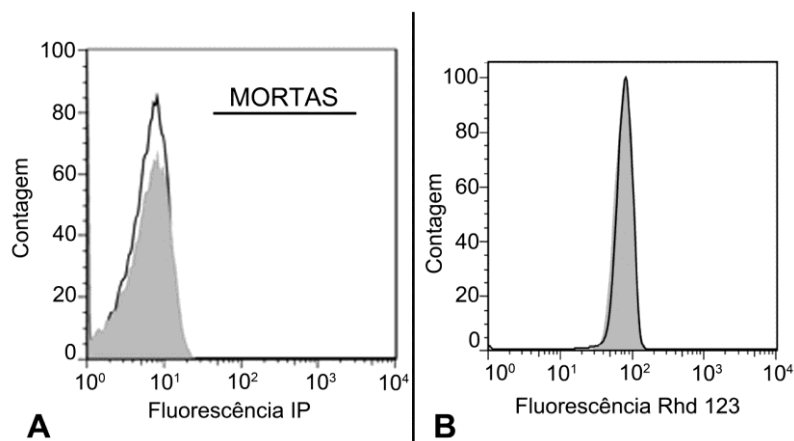


FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DO CLONE DM28C TRATADAS COM A CI_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA POR 24 HORAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. (A) CÉLULAS AVALIADAS QUANTO À INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR IODETO DE PROPÍDIO; (B) CÉLULAS AVALIADAS QUANTO AO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR RODAMINA 123. CONTROLE= CINZA PREENCHIDO; CI_{50} = LINHA PRETA.

5 DISCUSSÃO

Investigamos nesta dissertação a atividade inibitória dos óleos essenciais (OEs) de alecrim, cabreúva, canela, citronela, limão, *E. citriodora*, *E. globulus*, pinho e pitanga sobre o *Trypanosoma cruzi*. Recentemente o interesse por encontrar compostos ativos sobre tripanosomatídeos patogênicos, juntamente com o maior conhecimento sobre compostos naturais - mais especificamente, sobre óleos essenciais - vem crescendo, resultando em diversos artigos científicos demonstrando a atividade biológica de OEs e/ou de seus principais constituintes sobre estes parasitas.

A atividade biológica dos OEs provavelmente está relacionada às suas funções na natureza, onde desempenham papel de proteção nas plantas, atuando como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e contra herbivoria, através da redução do apetite do animal por aquela planta que possui o óleo essencial (BAKKALI *et al.*, 2008). A atividade dos OEs está associada à característica lipofílica das moléculas que os constituem. Como típicas moléculas lipofílicas, elas atravessam a membrana

celular e desestruturam a camada de fosfolipídios que constitui as membranas celulares, podendo levar a um extravasamento de moléculas e à lise celular (BAKKALI *et al.*, 2008).

Nesta dissertação a triagem dos diferentes OEs foi realizada em formas epimastigotas de *T. cruzi* mantidas em culturas axênicas, as quais são mais fáceis de cultivar, o que as tornam úteis para a identificação de compostos ativos contra estes parasitas. Entretanto, atividade *in vitro* sobre epimastigotas de *T. cruzi* não garante uma atividade promissora sobre as outras formas do parasita. Assim, um número considerável de extratos de plantas com resultados inibitórios positivos *in vitro*, tanto para formas epimastigotas quanto para outras formas evolutivas de *T. cruzi*, não se torna uma nova alternativa quimioterápica (LIRUSSI *et al.*, 2004). Por este motivo, há ainda a necessidade de se analisar um grande número de óleos essenciais, ou seus constituintes e derivados, até se obter moléculas promissoras sobre os diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*.

Dentre os óleos essenciais estudados na presente dissertação, o OE de canela mostrou maior atividade sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, com uma $CI_{50} = 24,13 \mu\text{g/ml}$, seguindo-se os OEs de cabreúva ($CI_{50} = 60,87 \mu\text{g/ml}$), pitanga ($CI_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$) e capim citronela ($CI_{50} = 94 \mu\text{g/ml}$).

5.1 ÓLEOS ESSENCIAIS TRIADOS

Os OEs de alecrim, cabreúva, capim citronela, limão siciliano, *E. citriodora*, *E. globulus*, *Pinus* sp. e pitanga não tiveram ação tripanocida relevante na triagem em formas epimastigotas de *T. cruzi* (CI_{50} maior que $60 \mu\text{g/ml}$, quando comparado com o CI_{50} de benzonidazol = $15,8 \mu\text{g/ml}$). Por este motivo foram descartados das análises posteriores em formas tripomastigotas e amastigotas. Entretanto, dados da literatura (discutidos abaixo) mostram que constituintes isolados destes OEs podem ter boa atividade sobre tripanosomatídeos, e portanto merecem ser analisados em mais detalhes no futuro.

Esta dissertação é o primeiro estudo a analisar o efeito do óleo essencial de pitanga (*E. uniflora*) sobre *T. cruzi*. Estudos anteriores analisaram o efeito do extrato

etanólico de folhas de pitanga sobre *T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2012), *T. brucei* e *T. congolense* (ADEWUNMI *et al.*, 2001). Extrato metanólico de folhas de pitanga também já foi avaliado sobre *Trichomonas gallinae* (IBIKUNLE *et al.*, 2011). Tais estudos indicam que *E. uniflora* pode representar uma alternativa interessante como fonte de terapias alternativas no combate a protozoários patogênicos. Corroborando essa hipótese, nossos dados mostraram que o OE de pitanga (bem como os OEs de cabreúva, canela e capim citronela) foi mais efetivo sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* que os OEs de *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Achillea millefolium*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon citratus* (SANTORO *et al.*, 2007a,b,c). Os principais constituintes do OE de folhas de pitanga são curzereno (30%), germacreno B (15,6%) e germacrona (32,8%) (MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001). Estudos adicionais poderão demonstrar a eficácia destes constituintes isoladamente sobre tripanosomatídeos.

O segundo OE a apresentar melhor atividade inibitória sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* foi o de cabreúva ($CI_{50} = 60, 87 \mu\text{g/ml}$). Estudos anteriores indicam que seu principal constituinte, (E)-nerolidol (WANNER *et al.*, 2010), é o responsável pela atividade tripanocida deste OE, já que quando avaliado isoladamente sobre tripomastigotas de *T. brucei brucei* seu CI_{50} foi de $1, 7 \mu\text{g/mL}$, com IS de 35,7 (HOET *et al.*, 2006). Desta maneira, análises posteriores sobre (E)-nerolidol e seus derivados podem fornecer dados promissores sobre a atividade sobre *T. cruzi*.

No caso do OE de capim citronela, existe majoritariamente citronelal, geraniol e geranial em sua composição (ABENA *et al.*, 2007; CHANTAI *et al.*, 2012), sendo este último mais ativo em epimastigotas de *T. cruzi* ($CI_{50} = 3,1 \mu\text{g/ml}$) que em amastigotas ($CI_{50} > 30 \mu\text{g/ml}$) (ESCOBAR *et al.*, 2010). Ainda que a atividade de geranial em amastigotas seja menor que em epimastigotas, o uso do constituinte isolado foi mais eficiente como agente tripanocida que do OE de capim citronela sobre epimastigotas de *T. cruzi* ($94 \mu\text{g/ml}$), além de possuir seletividade 15 vezes maior que a encontrada para este OE (ESCOBAR *et al.*, 2010).

O OE de *Pinus* sp estudado não mostrou atividade eficiente quando comparado aos outros OEs desta dissertação. Já foi demonstrado que OE de *P. densiflora* possui em sua composição majoritariamente canfeno (22,38%), α -pineno (20,58%), α -limoneno (20,16%), acetato de bornil (9,79%) e β -pineno (6,73%). Já o OE de *P. thunbergii* possui majoritariamente α -terpinoleno (19,3%), δ -3-careno

(16,77%), β -phellandreno (13,36%), α -pineno (10,91%), 4-terpineol (5,35%), sabineno (5,15%), α -terpineno (4,22%) e β -pineno (3,96%) (PARK e LEE, 2011). O limoneno possui atividade sobre *T. cruzi* ($CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ ou 6,81 $\mu\text{g/ml}$) e *L. braziliensis* (GRAEBIN *et al.*, 2010) e o β -pineno possui atividade sobre *T. brucei brucei* (dose letal mínima $> 100 \mu\text{g/ml}$) (CHEIKH-ALI *et al.*, 2011), sugerindo que o uso de outros constituintes isolados do OE deste gênero possa ser mais efetivo sobre tripanosomatídeos (e conseqüentemente sobre *T. cruzi*) do que o OE total.

Nas espécies do gênero *Citrus* os OEs contém majoritariamente limoneno (ARRUDA *et al.*, 2009). No caso do OE de limão siciliano há também o β -pineno (ROZZA *et al.*, 2011). A atividade de limoneno já foi observada sobre promastigotas de *Leishmania* spp., cujos valores de CI_{50} variaram de 185 μM (ou 25,20 $\mu\text{g/ml}$) a 354 μM (ou 48,23 $\mu\text{g/ml}$). Em amastigotas de *L. amazonensis* isoladas de lesão e testadas *in vitro* ocorreu uma redução do CI_{50} para 147 μM (ou 20,02 $\mu\text{g/ml}$). No tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com 200 μM (27,25 $\mu\text{g/ml}$) e 300 μM (40,87 $\mu\text{g/ml}$) de limoneno observou-se redução de 52% e 78% do parasitismo intracelular, respectivamente (ARRUDA *et al.*, 2009).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) possui em sua composição majoritariamente 1,8-cineol, cânfora, α -pineno, borneol e α -terpineol (MACHADO *et al.*, 2013). O OE de *Eucalyptus citriodora* possui majoritariamente em sua composição citronelal, citronelol e isoisopulegol (BATISH *et al.*, 2006), enquanto o OE de *E. globulus* possui 1,8-cineol (33,6%), α -pineno (14,2%) e D-limoneno (10,1%) como principais constituintes (KUMAR *et al.*, 2012). Nossos dados mostram que estes três OEs não apresentaram atividade sobre *T. cruzi* em concentrações até 300 $\mu\text{g/ml}$. Entretanto, 1,8-cineol, o constituinte mais abundante no OE de alecrim e *E. globulus*, quando avaliado sobre tripomastigotas de *T. b. brucei* foi ativo com CI_{50} de 83,15 $\mu\text{g/ml}$ e IS de 3,0 (NIBRET e WINK, 2010).

Contrariamente aos resultados encontrados com os OEs de *Eucalyptus* spp. avaliados nesta dissertação, extratos de *E. globulus* e *E. citriodora* demonstraram atividade inibitória sobre tripomastigotas de *T. evansi* e *T. b. brucei* (BAWM *et al.*, 2010; HABILA *et al.*, 2010). Tais divergências podem ser resultantes tanto de prováveis diferenças de composição entre extratos e OEs, quanto de diferenças de sensibilidade das espécies e formas evolutivas avaliadas.

5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA

O OE de canela não foi o que obteve melhor índice de seletividade (IS), mas ainda assim foi o que obteve maior atividade tripanocida, sendo esta significativamente maior que a dos OEs estudados nesta dissertação. Apesar de sua excelente atividade tripanocida, seu CI_{50} ainda foi superior ao do benzonidazol. O índice de seletividade obtido com esse fármaco referência foi de 9,33 em formas epimastigotas, evidenciando sua menor citotoxicidade *in vitro* quando comparado aos IS dos OEs aqui avaliados, como o de canela (2,05), limão (2,63) e pitanga (2,46). Porém, alguns estudos mostraram que tratamento com concentrações altas de OE em camundongos não produziram nenhum efeito tóxico aos animais. Costa e colaboradores (2011) mostraram que tratamento oral com OE de capim-limão em camundongos Swiss a longo prazo (21 dias) em doses até 100 mg/kg é relativamente seguro, não sendo observado efeito nocivo ao fígado e funções renais por todo o período do tratamento. Na toxicidade aguda, a $LD_{50}=3500$ mg/kg, dose relativamente alta. Também foi observada diminuição no colesterol sanguíneo dos camundongos que receberam as maiores doses. Arruda e colaboradores (2009) mostram que em 80% dos camundongos infectados com *L. amazonensis*, tratados com limoneno observou-se redução significativa no tamanho médio da lesão, além de redução na carga parasitária de 99.9%, após 15 semanas. Com tratamento tópico das lesões, 67-87% dos animais estavam completamente curados. Interessante notar que não se observou nenhum efeito colateral nos camundongos tratados.

Rojas, Palacios e Ronceros (2012) investigaram a atividade do OE de *Aloysia triphylla* (cedrina) em camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa silvestre não estandardizada) e observaram que o tratamento (administrado por sonda orogástrica de 8 a 28 dias pós-infecção) produziu redução significativa da parasitemia a uma dose de 250 mg/kg, além de reduzir o número de amastigotas, infiltrados inflamatórios no coração e os níveis de creatina quinase-MB (CK-MB) no plasma (isoenzima utilizada como marcador para miocardite na doença de Chagas experimental) quando comparados a grupos infectados e sem tratamento. No tratamento com benzonidazol não foi observado aumento significativo nos níveis de

CK-MB plasmáticos. Esses resultados mostram que além de efetivo sobre *T. cruzi* o OE de *A. triphylla* foi capaz de retardar a invasão do músculo cardíaco nos camundongos tratados.

Em resumo, os trabalhos acima mencionados (ARRUDA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011; ROJAS, PALACIOS e RONCEROS, 2012) mostram que OEs, ou seus principais constituintes, apresentam melhor atividade *in vivo* do que *in vitro*, possuindo atividade positiva sobre infecções parasitárias e nenhuma atividade citotóxica, podendo ainda terem efeitos secundários benéficos (não relacionados à infecção pelo parasita, como a redução de colesterol plasmático observada por Costa e colaboradores (2009)), constituindo-se assim em potenciais anti-tripanosomatídeos.

Nossos dados demonstraram que o OE de canela teve atividade sobre epimastigotas de *T. cruzi* em concentrações menores do que outros OEs estudados anteriormente. Assim, sua CI_{50} (24,13 $\mu\text{g/ml}$) é menor do que o obtido com OEs de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão), ou seus principais constituintes (SANTORO *et al.*, 2007a,b,c). Sua atividade também foi maior do que aquela obtida com outros OEs sobre outros tripanosomatídeos patogênicos (HABILA *et al.*, 2010; PARREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2011).

Em amastigotas, a CI_{50} do OE de canela foi 20 $\mu\text{g/ml}$ (IS=2,47), valor semelhante ao encontrado na triagem com formas epimastigotas, sendo esta concentração menor que a encontrada com jacaranona (principal constituinte de *Pentacalia desiderabilis*), a qual não mostrou atividade sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. chagasi* a uma concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (MORAIS *et al.*, 2012). Entretanto, o valor foi quatro vezes maior que o CI_{50} encontrado por Santoro e colaboradores (2007a) com óleo essencial de *C. citratus* (CI_{50} = 5,1 $\mu\text{g/ml}$). O IS encontrado em formas amastigotas foi semelhante ao do OE de *Lippia alba* (Escobar *et al.*, 2010).

Nossos dados demonstraram que o OE de canela interferiu na metaciclogênese de *T. cruzi*, sendo o processo de diferenciação inibido em 50% a uma concentração de 18,2 $\mu\text{g/ml}$. Cardoso e Soares (2010) mostraram que o citral, principal constituinte do OE de *Cymbopogon citratus*, também foi capaz de inibir a diferenciação do parasita em 50% (CI_{50}), porém a uma concentração de 30,8 $\mu\text{g/ml}$.

Em formas metacíclicas purificadas, o OE de canela aqui avaliado teve uma atividade ainda maior, resultando em uma CI_{50} de 5,05 $\mu\text{g/ml}$, aumentando o índice de seletividade para 9,78. O aumento no índice de seletividade em tripomastigotas, quando comparado com epimastigotas de *T. cruzi*, é um dado que já foi observado por outros autores (SANTORO *et al.*, 2007a; MEDEIROS *et al.*, 2011). Tais diferenças podem ser explicadas pela existência de distintas vias metabólicas e pela composição de membrana nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. Também é possível que a composição dos distintos meios de cultivo para as diferentes formas de *T. cruzi* (LIT, RPMI-1640 e TAU3AAG), influencie na absorção e/ou degradação dos OEs.

Análise por CG-EM do óleo essencial de canela utilizado mostrou que seus principais constituintes são (E)-cinamaldeído (81,52%) e eugenol (16,68%). Em menor quantidade tem-se a presença de (E)-cariofileno(1,19%), (E)-acetato de cinamila (0,01%) e α -humuleno (0,12%). É possível que outros constituintes estejam presentes em quantidades menores ainda. Os diversos constituintes de um óleo essencial são analisados por CG-EM. A identificação é feita por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho, dados da literatura e pelo índice de retenção de Kovats (SILVA *et al.*, 2006). Portanto, a quantidade de constituintes identificados em uma amostra depende da disponibilidade de dados dentro desta biblioteca do aparelho para se comparar os resultados encontrados e de fato identificá-los.

Vários fatores, como parte da planta de onde foi extraído o óleo essencial e a época do ano de cultivo da planta, podem alterar a composição de um OE, bem como as concentrações de cada constituinte (BAKKALI *et al.*, 2008; VICTORIA *et al.*, 2012). Apesar desta possibilidade de variação, a presença majoritária de eugenol e cinamaldeído, e também dos componentes-traço cariofileno e acetato de cinamila, já foi demonstrada em óleos essenciais de *Cinnamomun* spp. (CHENG *et al.*, 2006; JAYAPRAKASHA, MOHAN RAO E SAKARIAH, 2003 *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2007).

Com base nas diferenças encontradas na composição dos OEs de folhas de *Cinnamomum osmophloeum*, Cheng e colaboradores (2006) classificaram estes OEs em nove quimiotipos: cassia, cinamaldeído, cumarina, linalol, eugenol, canfora, 5-terpineol, linalol/terpineol e tipo misto, de acordo com o componente majoritário. Esses autores observaram também que os OEs de *C. osmophloeum* do tipo

cinamaldeído e do tipo cinamil acetato tiveram atividade antifúngica mais forte dentre os quimiotipos analisados, atribuindo esta maior atividade à maior concentração de cinamaldeído. Observações similares também foram feitas pelo mesmo grupo em trabalhos anteriores, onde estudaram o efeito antitérmico, antibacteriano, antiácido, antimofa, antimosquito e antipatogênico de *C. osmophloeum*. Assim, Singh e colaboradores (2007) também atribuíram o efeito antifúngico do OE de *Cinnamomum zeylanicum* à alta concentração de cinamaldeído. O OE de canela aqui investigado também possui majoritariamente cinamaldeído em sua composição. Por esta razão podemos sugerir que a atividade tripanocida deste OE pode estar relacionada à este componente, o qual merece estudos mais detalhados no futuro.

A atividade citotóxica e tripanocida do cinamaldeído pode estar relacionada à sua estrutura química. Cinamaldeído possui ligação carbono-carbono dupla conjugado com o grupo carbonila aldeídico. Em geral, os aldeídos insaturados (por exemplo, cinamaldeído e mirtenal) são capazes de formar ligações covalentes com os resíduos de aminoácidos de proteínas, inativar a maior parte das proteínas e afetar um grande número de atividades celulares (NIBRET e WINK, 2010). O mecanismo de ação destes compostos contra tripanosomas também pode ser através de adições de aldeído-tiol a componentes que contém enxofre, os quais ou são encontrados no meio de cultura de células (por exemplo, cisteína mercaptoetanol) ou são componentes essenciais encontrados no citoplasma celular, como tripanotiona e tripanotiona redutase. A privação destes agentes antioxidantes vitais (substâncias utilizadas para a criação de um ambiente redutor no interior das células) resultará em um estresse oxidativo nas células. O mesmo mecanismo de ação ou efeito foi demonstrado na linhagem de células de mamíferos HL-60, o que resulta em estresse oxidativo nas células (NIBRET E WINK, 2010).

Eugenol, um dos principais constituintes do OE de canela, é também o principal constituinte de *Syzygium aromaticum* (cravo-da Índia) e seu efeito sobre formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) já foi estudado, sendo a CI_{50} de 246 $\mu\text{g/ml}$ e 76 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (SANTORO *et al.*, 2007b). Análise dos nossos dados demonstra que o OE total de canela foi mais ativo sobre *T. cruzi* que eugenol. Isso pode ser atribuído à atividade de outro componente deste OE sobre os parasitas, ou ao possível sinergismo entre os componentes desta mistura, o que potencializaria a atividade do componente ativo. Interessante notar que eugenol foi associado à indução de apoptose em *Leishmania donovani* pela

geração de espécies reativas de oxigênio tendo a mitocôndria como alvo (MISRA *et al.*, 2009).

O método utilizado para a triagem de OE sobre as formas epimastigotas foi o método colorimétrico do MTT, que também avalia a viabilidade celular através da atividade mitocondrial, já que a formação de cristais formazan, que conferem a coloração violácea, depende da atividade das desidrogenases mitocondriais. Quanto mais células viáveis em uma cultura mais cristais serão produzidos, e mais intensa será a coloração violácea. Neste sentido, podemos dizer que se uma cultura celular crescer menos que outra ou se tiver mais células mortas (portanto, com menos células viáveis), teremos coloração menos intensa nesta cultura.

A CI_{50} calculada através da comparação da absorbância de células tratadas com a absorbância de células controle reflete, portanto, a quantidade de células viáveis (com atividade mitocondrial normal) presentes na cultura no momento em que foram analisadas. Esse resultado foi corroborado pela nossa análise por citometria de fluxo, pois os epimastigotas sobreviventes ao tratamento por 24 horas com o OE de canela foram os analisadas por citometria e se mostraram sem alteração de potencial de membrana mitocondrial e sem interrupção de membrana plasmática.

Outras possibilidades que explicariam são a de que (a) o OE de canela pode estar interferindo diretamente nas desidrogenases mitocondriais sem contudo alterar o potencial de membrana, ou, (b) o OE de canela é autofluorescente e assim pode mascarar a alteração no potencial de membrana mitocondrial na análise por citometria de fluxo. Maiores estudos sobre o efeito do OE de canela em *T. cruzi* são necessários para identificar quais as vias que levaram à morte do parasita.

Devido a boa atividade do OE de canela demonstrada nesta dissertação, o estudo mais aprofundado da atividade de seus constituintes voláteis isolados, ou derivados de seus constituintes, surgem como fortes candidatos a maiores estudos visando melhorar sua seletividade sobre o *T. cruzi*. Dentre as diferentes possibilidades de estudo, podem ser citadas (a) a caracterização da atividade de seus constituintes isolados para identificação do composto ativo, (b) a observação de possíveis efeitos de sinergia entre os diferentes constituintes e (c) a obtenção de derivados do principal constituinte (cinamaldeído). Ainda há a necessidade de se estudar o mecanismo de ação deste OE sobre o parasita, e que tipo de morte celular este OE causa.

6. CONCLUSÕES

- A. Os óleos essenciais avaliados foram efetivos sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O OE de canela foi o mais tripanocida com $CI_{50} = 24,13 \mu\text{g/ml}$, seguido dos OEs de cabreuva ($CI_{50} = 60,87 \mu\text{g/ml}$) e pitanga ($CI_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$). Os OEs de alecrim, *E. citriodora*, *E. globulus* não mostraram atividade com concentração de $300 \mu\text{g/ml}$. Entretanto, nenhum dos OEs avaliados foi mais eficiente que o benzonidazol ($CI_{50} = 15,8 \mu\text{g/ml}$).
- B. O OE menos citotóxico sobre células Vero foi o OE de limão ($CC_{50} = 281,69 \mu\text{g/ml}$), seguido do OE de citronela ($CC_{50} = 178,95 \mu\text{g/ml}$) e pitanga ($CC_{50} = 172,42 \mu\text{g/ml}$). Somente o OE de canela e cabreúva foram mais citotóxicos sobre células Vero que o benzonidazol ($CC_{50} = 147,37 \mu\text{g/ml}$).
- C. Os OEs mais seletivos sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* foram os OEs de limão (IS = 2,63), pitanga (IS = 2,46), cabreúva (IS = 2,32) e canela (IS = 2,05), entretanto nenhum OE avaliado foi mais seletivo que o benzonidazol (IS = 9,33).
- D. Os componentes majoritários do OE de canela avaliado são (E)- cinamaldeído (81,52%) e eugenol (16,68%).
- E. O OE de canela foi capaz de inibir a diferenciação epimastigota-tripomastigota *in vitro* de *T. cruzi* com $CI_{50} = 18,2 \mu\text{g/ml}$.
- F. O OE de canela foi capaz de inibir a proliferação de amastigotas intracelulares, com $CI_{50} = 20 \mu\text{g/ml}$.
- G. O OE de canela foi capaz de lisar formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* com $CI_{50} = 5,05 \mu\text{g/ml}$.
- H. O tratamento com $24 \mu\text{g/ml}$ do OE de canela em formas epimastigotas de *T. cruzi* por 24 horas não mostrou alterações na permeabilidade de membrana plasmática (iodeto de propídio) ou no potencial de membrana (rodamina 123) mitocondrial das células tratadas na avaliação por citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NAGAO, T.; KINJO, J.; OKABE, H.; HIGO, H.; AKAHANE, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 1485-1487, 2002
- ABENA, A.; GBENOU, J.D.; YAYI, E.; MOUDACHIROU, M.; ONGOKA, R.P.; OUAMBA, J.M.; SILOU, T. Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of *Cymbopogon nardus* (L) Rendle of Benin and Congo. **Afr J Trad**, v.4, p. 267–272, 2007
- ADEWUNMI, C.O.; AGBEDAHUNSI, J.M.; ADEBAJO, A.C.; ALADESANMI, A.J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 19-24, 2001
- ALVIANO, D.S.; BARRETO, A.L.S.; DIAS, F.A.; RODRIGUES, I.A.; ROSA, M.S.S.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M.A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 283, 2012.
- ANDRÉS, M.F.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SANZ, J.; BURILLO, J.; SAINZ, P. **Nematicidal activity of essential oils: a review**. doi: 10.1007/s11101-012-9263-3, 2012
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components- a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 462-468, 2005
- APETREI, C.L.; TUCHILUS, C.; APROTOSOAIE, A.C.; OPREA, A.; MALTERUD, K.E.; MIRON, A. Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Investigations of *Pinus cembra* L. Bark and Needles. **Molecules**, v. 16, p. 7773-7788, 2011
- ARRUDA, D.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomed Pharmacother**, v. 63, 643-649, 2009
- BALDWIN, I.T. Plant Volatiles. **Curr Biol**, v. 20, p. R392-R397, 2010

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 446–475, 2008

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLIA, R.K. Chemical Composition and Phytotoxicity of Volatile Essential Oil from Intact and Fallen Leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Z Naturforsch**, v. 61, p. 465-471, 2006

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

BAWM, S.; TIWANANTHAGORN, S.; LIN, K.S.; HIROTA, J.; IRIE, T.; HTUN, L.L.; MAW, N.N.; MYAING, T.T.; PHAY, N.; MIYAZAKI, S.; SAKURAI, T.; OKU, Y.; MATSUURA, H.; KATAKURA, K. Evaluation of Myanmar Medicinal Plant Extracts for Antitrypanosomal and Cytotoxic Activities. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 72, p. 525–528, 2010

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol**, v. 106, p. 1349-1358, 1988

CAMPOS, M.C.O; SALOMÃO, K.; CASTRO-PINTO, D.B.; LEON, L.L.; BARBOSA, H.S.; MACIEL, M.A.M.; CASTRO, S.L. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v.107, p.1193–1204, 2010

CARDOSO, J.; SOARES, M.J. *In vitro* effects os citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1026-1032, 2010

CHANTHAI, S.; PRACHAKOLL, S.; RUANGVIRIYACHAI, C. Influence of Extraction Methodologies on the Analysis of Five Major Volatile Aromatic Compounds of Citronella Grass (*Cymbopogon nardus*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Grown in Thailand. **Dietary Supplements**, v. 95, p. 763-772, 2012

CHEIKH-ALI, Z.; ADIKOA, M.; BOUTTIERC, S.; BORIESA, C.; OKPEKON, T.; POUPON, E.; CHAMPY, P. Composition, and Antimicrobial and Remarkable Antiprotozoal Activities of the Essential Oil of Rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum. (Zingiberaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 658-667, 2011

CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; HSUI, Y.R.; CHANG, S.T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 306–312, 2006

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem Parasitol**, v. 16, p. 315-327, 1985

CONTRERAS, V.T.; ARAUJO-JORGE, T.C.; BONALDO, M.C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 123-133, 1988

COSTA, C.A.; BIDINOTTO, L.T.; TAKAHIRA, R.K.; SALVADORI, D.M.F.; BARBISAN, L.F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice 3 after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food Chem Toxicol**, v. 49, p. 2268-72, 2011

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy- a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 549-554, 2009

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLETZ, M.; MÉRILLON, J.M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of and ORAC Assays. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 1768–1774, 2009

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIENA, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69- 91, 2002

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184-190, 2010

FERRARINI, R.S.; GRAEBIN, C.S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R.F.S.; DIAS, D.O.; ROSA, R.G.; MADEIRA, M.F.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis of limonene β -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 773-777, 2008

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2507–2515, 2008

GRAEBIN, C.S.; MADEIRA, M.D.E.F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; MIGUEL, D.C.; ULIANA, S.R.; BENITEZ, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ROSA, R.G.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis and *in vitro* activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. **Eur J Med Chem**, v. 45, p.1524-1528, 2010

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; ZACARONI, L.M.; LIMA, R.K.; PIMENTEL, F.; MORAIS, A.R. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Quim Nova**, v. 31, p. 1476-1480, 2008

GURU, P.Y.; AGRAWI, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin- bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 2, p. 204-208, 1989

HABILA, N.; AGBAJU, A.S.; LADAN, Z.; BELLO, I.A.; HARUNA, E.; DAKARE, M.A.; ATOLAGBE, T.O. Evaluation of *in vitro* activity of essential oil against *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. **J Parasitol Res**. doi:10.1155/2010/534601, 2010

HAMDAN, D.; EL-READI, M.Z.; NIBRET, E.; SPORER, F.; FARRAG, N.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Chemical composition of the essential oils of two *Citrus* species and their biological activities. **Pharmazie**, v. 65, p.141-147, 2010

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Appl Microbiol**, v. 86, p.985–990, 1999

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; HÉRENT, M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Med**, v. 72, p. 480-482, 2006

HOLETZ, F.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V. Effect of essential oil of *Ocimum gratissimum* on the trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. **Acta Protozool**, v. 42, p. 269-276, 2003

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; CHATHA, S.A.S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P.S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 1070-1078, 2010

IBIKUNLE, G.F.; ADEBAJO, A.C.; FAMUYIWA, F.G.; ALADESANMI, A.J.; ADEWUNMI, C.O. *In-vitro* evaluation of anti-trichomonal activities of *Eugenia uniflora* Leaf. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 8, p.170-176, 2011

JAYAPRAKASHA, G.K.; MOHAN RAO, L.J.; SAKARIAH, K.K. Volatile Constituents from *Cinnamomun zeylanicum* Fruit Stalks and Their Antioxidant Activities. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 4344-4348, 2003

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Med Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). **Acta Trop**, v. 122, p. 212-218, 2012

LAGO, J.H.G.; SOUZA, E.D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M.A.; MARTINS, R.C.C.; BAROLI, A.A.; CARVALHO, B.A.; SOARES, M.G.; DOS SANTOS, R.T.; SARTORELLI, P. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, p.9827-9837, 2011

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum bicornectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 36-42, 2007

LI, W.R.; SHI, Q.S.; OUYANG, Y.S.; CHEN, Y.B.; DUAN, S.S. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. **Appl Microbiol Biotechnol** doi: 10.1007/s00253-012-4460-y

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; DE SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.197-201, 2006

LIRUSSI, D.; LI, J.; PRIETO, J.M.; GENNARI, M.; BUSCHIAZZO, H.; RIOS, J.L.; ZAIDENBERG, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 75, p. 718–723, 2004

LOOSDRECHT, A.A.; NENNEL, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGESNHUIJSEN, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v.141, p. 15-22, 1991

MACHADO, D.G.; CUNHA, M.P.; NEIS, V.B.; BALEN, G.O.; COLLA, A.; BETTIO, L.E.B.; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F.L.; DALMARCO, J.B.; SIMIONATTO, E.L.; PIZZOLATTI, M.G.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, p. 999–1005, 2013

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. **Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais**. Editora: Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-Pará, 2000

MISRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P.; GUPTA, S.; KUMAR, N.; DUBE, A. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1058–1066, 2009

MEDEIROS, M.G.F.; SILVA, A.C.; CITÓ, A.M.G.L.; BORGES, A.R.; LIMA, S.G.; LOPES, J.A.D.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Internat**, v. 60, p. 237-241, 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica da Secretária de Vigilância em Saúde**, 7^o Edição. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_doenca_de_chagas.pdf> Acesso em: 25/01/2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE (SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. III, p. 14-15, 2005

MORAIS, T.R.; ROMOFF, P.; FÁVERO, A.; REIMÃO, J.Q.; LOURENÇO, W.C.; TEMPONE, A.G.; HISTOV, A.D.; SANTI, S.M.; LAGO, J.H.G.; SARTORELLI, P.; FERREIRA, M.J.P. Anti-malarial, anti-trypanosomal and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). **Parasitol Res**, v. 110, p. 95-101, 2012

NIBRET, E.; WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica* *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. **Phytomedicine**, v. 17, p. 911–920, 2010

NUSSBAUM, K.; HONEK, J.; CADMUS, C.M.C.C.; EFFERTH, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, p. 1594-1617, 2010

OLIVEIRA, V.C.S.; MOURA, D.M.S.; LOPES, J.A.D.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of the essential oils from *Cympobogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 104, p. 1053-1059, 2008

PARK, J.S.; LEE, G.H. Volatile compounds and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of the needles of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. **J Sci Food Agric**, v. 91, p. 703–709, 2011

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 1-10, 2010

PITELLA, J.E.H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 973-978, 2009

RANASINGHE, P.; PERERA, S.; GUNATILAKE, M.; ABEYWARDENE, E.; GUNAPALA, N.; PREMAKUMARA, S.; PERERA, K.; LOKUHETTY, D.; KATULANDA, P. Effects of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) on blood

glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model. **Pharmacognosy Res**, v. 4, p. 73–79, 2012

RAUBER C. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandifolia*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto R) em ratos Wistar**. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* BRITTON (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 29, v. 61-68, 2012

ROMANHA A.J.; CASTRO S.L.; SOEIRO, M.N.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 82–89, 2011

RUBIO, J.; CALDERO, J.S.; FLORESA, A.; CASTRO, C.; CESPÉDES, C.L. Trypanocidal Activity of Oleoresin and Terpenoids Isolated from *Pinus oocarpa*. **Z Naturforsch**, v. 60, p. 711-716, 2005

SANTIN, M.R.; OLIVEIRA DOS SANTOS, A.; NAKAMURA, C.V.; PRADO DIAS FILHO, B.; FERREIRA, I.C.P.; NAKAMURA, T.U. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 105, p. 1489–1496, 2009

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; FREIRE, J.M.; SOARES, M.J. 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**, v. 13, p. 1649-1656, 2007a

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp Parasitol**, v. 116, p. 283-290, 2007b

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; SOARES, M.J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitol Res**, v. 100, p. 783-790, 2007c

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Exp Parasitol**, v. 131, p.130–132, 2012

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A.S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **J Adv Pharm Technol Res**, v. 2, p. 3-8, 2011

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADOC, M.I.L.; MATOS F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **J Ethnopharmacol**, v. 89, p. 277–283, 2003

SILVA, N.A.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L.C.B.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, R.A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Rev Bras PI Med**, v. 8, p. 52-55, 2006

SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C.A.N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650- 1661, 2007.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, CI50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995

SÜNTAR, I.; TUMEN, I.; USTÜN, O.; KELES, H.; AKKOL, E.K. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. **J Ethnopharmacol**, v. 139, p. 533–540, 2012

TCHOUMBOUGNANG, F.; ZOLLO, P.H.; DAGNE, E.; MEKONNEN, Y. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Med**, v. 7, p.20-23, 2005

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas Disease. **Postgrad Med J**, v. 82, p. 788-798, 2006

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; DA SILVA, W.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012

WANNER, J.; SCHMIDT, E.; BAIL, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; GOCHEVD, V.; GIROVAD, T.; ATANASOVAE, T.; STOYANOVAE, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Selected Essential Oils and Some of Their Main compounds. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1359-1364, 2010

YORK, T.; VANVUUREN, S.F.; DEWET, H. An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. **J Ethnopharmacol**, v. 144, p.118–127, 2012

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)** Fact Sheet n° 340, August 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 30/09/2012

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases, p.56-59, 2013.