

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

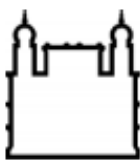
INSTITUTO CARLOS CHAGAS  
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

ESTUDO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIMENTA DE  
MACACO (*PIPER ADUNCUM*) E PIMENTA LONGA (*PIPER HISPIDINERVUM*)  
CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*

LUZ HELENA VILLAMIZAR SILVA

CURITIBA/PR

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS  
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

LUZ HELENA VILLAMIZAR SILVA

ESTUDO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIMENTA DE  
MACACO (*PIPER ADUNCUM*) E PIMENTA LONGA (*PIPER HISPIDINERVUM*)  
CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos  
Chagas como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurilio José Soares

CURITIBA

2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Luz Helena Villamizar

Estudo do efeito inibitório dos óleos essenciais de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) e pimenta longa (*Piper hispidinervum*) contra *Trypanosoma cruzi* / Luz Helena Villamizar Silva. – Curitiba, 2015.  
ix, 69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2015.  
Bibliografia: f. 55-69

1. Pimentas. 2. Óleo essencial. 3. Linalol. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Atividade tripanocida. 6. Doença de Chagas. I. Título.

CDD 616.9363

Dedico este trabalho ao casal mais lindo do mundo, meus pais.

Às minhas irmãs e à bela Gabriela

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Maurilio, meu orientador, pela oportunidade, paciência, dedicação e apoio total.

À Lia Medeiros pelas assessorias, ajudas, conselhos com tudo em cada passo deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Celular do ICC pela companhia e alegrias compartilhadas de cada dia.

Ao pessoal de Lab. de Cultivo de Parasitas do ICC pela paciência e ajuda com *T. cruzi*.

Ao pessoal da Sala de Preparo do ICC pelo carinho e claro, bom trabalho.

À secretaria e Coordenação Acadêmica pela colaboração sem limites.

A todos os laboratórios, salas e dependências do ICC pois em todos recebi apoio e aprendizagem.

Ao Rafael Kessler pela ajuda enorme durante todo o trabalho, orientação em cada experimento, apoio e doação de parasitas.

À Priscilla Wowk pelas aulas de infecção, ajuda gigante em cada erro, paciência e atenção.

À Fabiola Holetz & Saloe Bispo pelo carinho, apoio e doação de metacíclicos.

À Priscila Hirawia pelas leituras e trabalhos no citometro de fluxo.

Ao Wendell Girard Dias, Suzana Côrte-Real e Roger Magno Macedo Silva pelo uso da microscopia eletrônica de transmissão da plataforma PDTIS do IOC/FIOCRUZ-RJ.

À Erika Izumi e Guilherme Ferreira pela colaboração com os experimentos com hemácias.

Ao Bruno e Alejandro por cada dia em español, pela colaboração na banca.

À Iriane Eger, pelas correções de cálculos, centrifugações, protocolos e bom exemplo de profissionalismo.

À Professora Maria das Graças Cardoso da Universidade de Lavras pelos óleos essenciais fornecidos e pela análise de Cromatografia de Gases / Espectroscopia de Massas (CG-EM).

Aos professores de cada disciplina. Pelo aprendizado e bons ensinamentos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do ICC e ao órgão financiador CNPq.

Ao programa Estudante Convênio CNPq – PEC-PG.

À minhas parceiras de casa, Carolina e Amanda pela companhia e troca de bons momentos.

Aos meus pais por converter a distância em motivação e anseios, pela sua ajuda incondicional, pela entrega e amor infinito. Pela sincronia em cada passo, pelo acompanhamento me fazendo saber que acreditavam em mim. Por terem me entregado tudo. Por que muito “obrigada” nunca vai ser suficiente.

Às minhas irmãs e sobrinha, pelo apoio moral, querendo sempre que tudo ficasse certo mesmo sem entender o que eu estava falando.

Aos meus tios Elizabeth & José Antonio, pelo impulso a voar e chegar muito bem, literalmente. Pela sua confiança, pelo seu carinho, pelo seu apoio.

Ao José G. Rodriguez pela ajuda fornecida. Pelo apoio e parceria em cada fracasso, em cada sucesso. Pelo carinho sem limites. Pela dedicação e paciência.

A toda minha família, sempre maravilhosa, sempre atenta.

Aos meus amigos pelas boas energias, incluindo os que conheci aqui no Brasil, dentro e fora do ICC, por cada sorriso de motivação. Aos que estão na distância, aos que nunca me esqueceram, aos que sempre me escreveram, aos que me esperam, aos que me fazem rir de mim mesma, aos que patinaram comigo, aos que esqueci (temporariamente) e ainda assim me tem paciência.

Ao Cristian, meu cavaleiro. Por trazer à minha vida tranquilidade, ilusão e emoção. Por me lembrar quem sou e para onde vou. Pelo amor que me motiva cada dia. Por estar lá e aqui, no passado, no presente e no futuro. Pelo teu carinho e proteção, por cuidar de mim assim.

A Deus pela sincronia e pelos sussurros na hora certa.

A todas as pessoas que me apoiaram ou acompanharam de alguma ou outra maneira, para chegar, permanecer e realizar este trabalho, a todos e cada um, sinceramente, muchas gracias!!

## RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada e endêmica em 18 países da América Latina. Esta doença ainda não possui um tratamento efetivo e afeta cerca de 7-8 milhões de pessoas no mundo. Na busca por um composto alternativo natural, a presente dissertação teve por objetivo avaliar o potencial tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) e *Piper aduncum* (pimenta de macaco) sobre diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c (epimastigotas; amastigotas intracelulares; tripomastigotas metacíclicas e de cultivo). O OE de pimenta longa é rico em safrol e demonstrou baixa atividade contra *T. cruzi* ( $IC_{50}/24h > 100 \mu g/ml$  para formas epimastigotas e tripomastigotas) e leve citotoxicidade contra células Vero. O OE de pimenta de macaco foi efetivo contra formas epimastigotas ( $IC_{50}/24h = 84,74 \mu g/ml$ ), sendo porém mais eficaz contra formas tripomastigotas metacíclicas ( $12,1 \mu g/ml$ ) e de cultura celular a  $28^{\circ}C$  ( $2,8 \mu g/ml$ ). Os valores obtidos contra as formas tripomastigotas foram maiores do que os obtidos com a droga de referência benzonidazol a  $28^{\circ}C$  ( $IC_{50}/24h = 16,1 \mu g/ml$ ). Entretanto, contra formas amastigotas o benzonidazol foi mais ativo que o OE de pimenta de macaco ( $IC_{50}/24h = 0,8 \mu g/ml$  e  $9 \mu g/ml$ , respectivamente). Testes realizados com tripomastigotas de cultura a  $4^{\circ}C$  (mesma condição térmica de armazenamento de bolsas de sangue) demonstraram alta atividade do OE de pimenta de macaco ( $IC_{50}/24h = 3,8 \mu g/ml$ ), em comparação com os resultados obtidos com a droga de referência violeta de genciana ( $IC_{50}/24h = 60,7 \mu g/ml$ ). Avaliação da citotoxicidade do OE de pimenta de macaco contra células Vero a  $37^{\circ}C$  ( $CC_{50}/24h = 42,8 \mu g/ml$ ) e hemácias a  $4^{\circ}C$  ( $CC_{50}/24h = 351,6 \mu g/ml$ ) demonstrou um alto índice de seletividade (IS) contra tripomastigotas (11,26 e 92,52, respectivamente). Estes índices sugerem que o OE de pimenta de macaco não é um candidato para ensaios clínicos, mas sim um composto promissor para quimioprofilaxia de bolsas de sangue. Ensaios por citometria de fluxo evidenciaram que o OE de pimenta de macaco não afeta o ciclo celular de formas epimastigotas, mas inibe consideravelmente o potencial da membrana mitocondrial destas formas. Análise por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que tratamento de tripomastigotas com  $3,8 \mu g/ml$  (correspondente ao  $IC_{50}/24h$ ) produz danos ultra-estruturais como lise de membranas e perda de citoplasma. Análise por Cromatografia de Gases e Espectroscopia de Massas (CG-EM) demonstrou que os constituintes majoritários do OE de pimenta de macaco são nerolidol e linalol (25% e 13,42%, respectivamente). Testes com tripomastigotas de cultura a  $4^{\circ}C$  demonstraram que nem sempre o constituinte majoritário de um OE é o mais eficiente como tripanocida, pois linalol apresentou melhor efeito tripanocida ( $IC_{50}/24h = 306 ng/ml$ ) que nerolidol, o qual não induziu alterações visíveis por microscopia óptica. Nossos dados indicam que linalol é um composto promissor contra tripomastigotas, pois foi 168,6 vezes mais eficiente que benzonidazol em testes com formas tripomastigotas de cultura. Em conclusão, as propriedades tripanocidas do OE da pimenta de macaco e seu constituinte linalol devem ser estudadas mais aprofundadamente, especialmente devido à sua seletividade contra tripomastigotas de cultura. Linalol surge como um potencial candidato para quimioprofilaxia de bolsas de sangue.

**Palavras chave:** pimentas, óleo essencial, linalol, *Trypanosoma cruzi*, atividade tripanocida, doença de Chagas.

## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, a neglected tropical disease endemic in 18 countries in Latin America. There is no effective treatment for this disease, which affects about 7-8 million people in the world. In the search for a natural alternative compound, this dissertation aimed to evaluate the trypanocidal potential of essential oils (EOs) of *Piper hispidinervum* (long pepper) and *Piper aduncum* (jack pepper) in vitro against different evolutive forms of *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c (epimastigotes; intracellular amastigotes, metacyclic and cell derived trypomastigotes). The long pepper OE is rich in safrole and showed low activity against *T. cruzi* ( $IC_{50}/24h > 100 \mu\text{g/ml}$  for epimastigotes and trypomastigotes) and mild cytotoxicity against Vero cells. The jack pepper EO was effective against epimastigotes ( $IC_{50}/24h = 84.74 \mu\text{g/ml}$ ), but was more effective against metacyclic ( $12.1 \mu\text{g/ml}$ ) and cell derived ( $2.8 \mu\text{g/ml}$ ) trypomastigotes at  $28^{\circ}\text{C}$ . The values obtained with trypomastigotes were much better than those obtained with the reference drug benznidazole at  $28^{\circ}\text{C}$  ( $IC_{50}/24h = 16.1 \mu\text{g/ml}$ ). However, benznidazole against amastigotes was more active than the jack pepper EO ( $IC_{50}/24h = 0.8 \mu\text{g/ml}$  and  $9 \mu\text{g/ml}$ , respectively). Tests performed with cell derived trypomastigotes at  $4^{\circ}\text{C}$  (same thermal condition to stock blood) showed high activity of the jack pepper EO ( $IC_{50}/24h = 3.8 \mu\text{g/ml}$ ) as compared to the results obtained with the reference drug gentian violet ( $IC_{50}/24h = 60.7 \mu\text{g/mL}$ ). Evaluation of the jack pepper EO cytotoxicity against Vero cells at  $37^{\circ}\text{C}$  ( $CC_{50}/24hr = 42.8 \mu\text{g/ml}$ ) and red blood cells at  $4^{\circ}\text{C}$  ( $CC_{50}/24h = 351.6 \mu\text{g/ml}$ ) showed a high selectivity index (SI) against trypomastigotes (11.26 and 92.52, respectively). These indexes suggest that the jack pepper EO is not a good candidate for treatment of chagasic patients, but is a promising compound for treating blood bags. Flow cytometry assays showed that jack pepper EO does not affect the cell cycle of epimastigotes, but significantly inhibits the mitochondrial membrane potential of these forms. Analysis by transmission electron microscopy showed that treatment of trypomastigotes with  $3.8 \mu\text{g/ml}$  ( $IC_{50}/24h$  value) produced ultrastructural damage such as membrane lysis and loss of cytoplasm. Analysis by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS) showed that the major constituents of jack pepper EO are nerolidol and linalool (25% and 13.42%, respectively). Tests with culture trypomastigotes at  $4^{\circ}\text{C}$  showed that not always the EO major constituent is more efficient as a trypanocidal drug, as linalool showed better trypanocidal effect ( $IC_{50}/24h = 306 \text{ ng/ml}$ ) than nerolidol, which induced no visible changes as assessed by light microscopy. Our data indicate that linalool is a promising compound against trypomastigotes, because it was 168.6 times more efficient than benznidazole in tests with cell derived trypomastigotes. In conclusion, the trypanocidal properties of jack pepper EO and its major constituent linalool should be further studied, especially because of their selectivity against cell derived trypomastigotes. Linalool appears as a potential candidate for a drug for use in the treatment of blood bags.

**Key Words:** peppers, essential oil, *Trypanosoma cruzi*, trypanocidal activity, Chagas disease.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 O CICLO DE VIDA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	2
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	3
1.4 PRODUTOS NATURAIS	4
1.4.1 Extratos Vegetais	4
1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS	6
1.6 PIMENTAS	10
1.7 ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA LONGA ( <i>PIPER HISPIDINERVUM</i> )	11
1.8 ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO ( <i>PIPER ADUNCUM</i> )	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3. METODOLOGIA</b>	15
3.1 CÉLULAS VERO	15
3.2 HEMÁCIAS	15
3.3 PARASITA	16
3.3.1 Formas epimastigotas	16
3.3.2 Formas tripomastigotas de cultura	16
3.3.3 Formas tripomastigotas metacíclicas	16
3.3.4 Formas amastigotas intracelulares	17
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS	17
3.4.1 Obtenção	17
3.4.2 Caracterização química por GC - MS	18
3.5 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	18
3.5.1 Efeito sobre epimastigotas	18
3.5.1.1 Avaliação pelo método MTT	19
3.5.2 Efeito sobre tripomastigotas de cultura	20
3.5.3 Efeito sobre tripomastigotas metacíclicas	20
3.5.4 Efeito sobre amastigotas intracelulares	21
3.6 EFEITO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	21
3.7 CITOTOXICIDADE	22
3.7.1 Células Vero	22
3.7.2 Citotoxicidade em hemácias	23
3.8 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	23
3.9 CITOMETRIA DE FLUXO	23
3.9.1 Avaliação de alterações no ciclo celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.9.2 Avaliação do potencial de membrana de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	23
3.10 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	24
<b>4. RESULTADOS</b>	26

4.1 ÓLEO ESSENCIAL X EPIMASTIGOTAS	26
4.1.1 Compostos isolados	26
4.1.2 Combinação de compostos	27
4.2 ÓLEO ESSENCIAIS X TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS	30
4.3 ÓLEOS ESSENCIAIS X TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA	31
4.3.1 Ensaio a 28°C	31
4.3.2 Ensaio a 4°C	32
4.4 ÓLEO ESSENCIAL X AMASTIGOTAS INTRACELULARES	33
4.5 CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO	36
4.5.1 Sobre células Vero	36
4.5.2 Sobre hemácias humanas	36
4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE	37
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO	39
4.7.1 Ciclo celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	39
4.7.2 Potencial de membrana mitocondrial de <i>T. cruzi</i>	39
4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	40
4.9 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO	41
4.10 ATIVIDADE DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO CONTRA <i>T. CRUZI</i>	43
4.10.1 Linalol	43
4.10.2 Nerolidol	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada e endêmica em 18 países da América Latina (WHO, 2013). Esta doença ainda não possui um tratamento efetivo e afeta cerca de 7-8 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2015), sendo cerca de cinco milhões no Brasil (Coura e Dias, 1997; Salomón, 2012).

Apesar de endêmica na América Latina, esta parasitose é encontrada nos cinco continentes, principalmente por propagação devida às imigrações latinas (Schmunis e Yadon, 2010). Outras vias de transmissão ocorrem através de transplantes de órgãos e tecidos (Schmunis e Yadon, 2010; Fishman e Rubin, 1998), contato com mucosa conjuntiva ou oral (Giddings et al., 2006), transmissão vertical da mãe ao feto (Jackson et al., 2009), acidentalmente em laboratórios (Herwaldt, 2001), por via vetorial biológica através de insetos hematófagos infectados (Rassi et al., 2009) e/ou por transfusão sanguínea (Assal e Corbi, 2011; Bihl et al., 2007).

A doença de Chagas é silenciosa e caracteriza-se por apresentar duas fases (Moncayo e Silveira, 2009). A fase aguda perdura por 4 a 8 semanas, reconhecida pela replicação parasitária detectável por exame microscópico de sangue fresco (Bern, 2011). Esta fase pode ocorrer de modo assintomático, oligosintomático ou com quadros clínicos multi-sistêmicos (Gascon et al., 2010), nos quais há efetividade de cerca de 80% no tratamento segundo critérios clínicos, parasitológicos e sorológicos (Rassi et al., 2009). Existem porém, críticas e controvérsias em relação ao tratamento, em função dos efeitos colaterais ocasionados pelo fármaco atualmente disponível, o benzonidazol (Bern, 2011).

A fase crônica caracteriza-se por redução parasitêmica (Rodrigues et al., 2009). Esta fase pode ocorrer de duas formas: (a) indeterminada, caracterizada por ausência de danos orgânicos demonstráveis por diagnóstico sorológico (anticorpos IgG) laboratorial (Rassi et al., 2007), ou (b) determinada, que pode apresentar-se com mega-esôfago, megacólon, dano nervoso parassimpático e/ou cardiomegalia (Bern, 2011). A doença de Chagas lidera na categoria de entidades tropicais responsáveis pela miocardite, demonstrando alto impacto na saúde pública (Bonney and Engman, 2008).

## 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado (Euglenozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) que possui um ciclo de vida heteroxênico (Figura 1.1), circulando entre um hospedeiro vertebrado (mamíferos) e um hospedeiro invertebrado triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae).

O inseto vetor (conhecido popularmente como barbeiro) ingere formas tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro vertebrado. Estas formas se diferenciam em epimastigotas no lúmen do trato intestinal do vetor. As formas epimastigotas proliferam mediante divisão binária e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas na porção final do intestino (ampola retal) do inseto em função de um estresse nutricional (Nussbaum et al., 2010; Urbina, 2010).

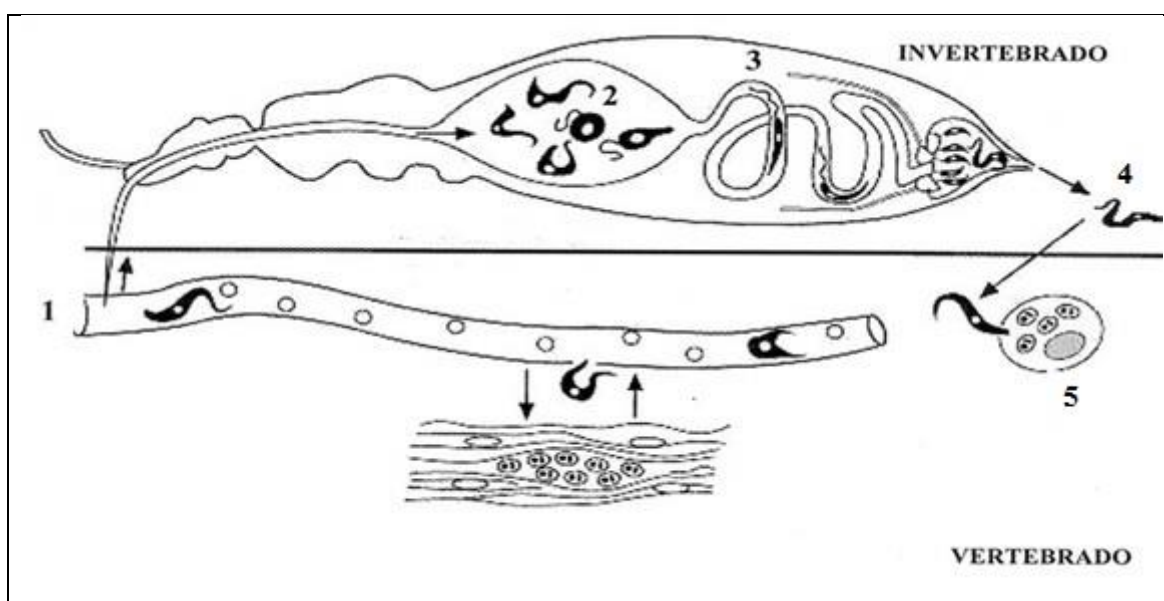


Figura 1.1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. 1: tripomastigotas sanguíneos; 2: epimastigotas; 3: epimastigotas em stress; 4: tripomastigotas metacíclicas; 5: amastigotas intracelulares.

Fonte: <http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/engparabook/ch082.htm>

As formas tripomastigotas metacíclicas, altamente infectivas, são depositadas na pele do hospedeiro mamífero quando o inseto defeca no momento do repasto sanguíneo. Estas formas atingem a corrente sanguínea e invadem diferentes tipos celulares, conseguindo assim evadir-se do sistema imune e diferenciando-se para formas intracelulares amastigotas. As formas amastigotas dividem-se assexuadamente e diferenciam-se em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea pela lise da membrana plasmática da célula hospedeira. O ciclo de vida é

completado quando um inseto vetor ingere estas formas tripomastigotas sanguíneas (Nussbaum et al., 2010; Urbina, 2010).

### *1.3 Tratamento da doença de Chagas*

Benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NX) são os fármacos comumente utilizados para o tratamento de pessoas diagnosticadas com Doença de Chagas. O benzonidazol é o mais difundido (Rajão et al., 2014) por ser o melhor tolerado pelos pacientes (Maya et al., 2007). O tratamento com BZ apresenta uma taxa de eficácia de aproximadamente 80% na fase aguda e 20% na fase crônica, sendo mais efetivo em indivíduos menores de 16 anos (Rassi et al., 2009). Os efeitos colaterais produzidos pelo BZ, como dermatite alérgica (de moderada a grave), parestesias, trombocitopenia e leucopenia, levam à interrupção do tratamento em 7 a 13% dos casos (Bern, 2011).

Por sua vez o nifurtimox não é muito utilizado em pacientes chagásicos, devido aos inúmeros efeitos colaterais, como desconforto abdominal, cefaléia, vertigem, insônia, mialgia e diminuição da memória em curto prazo. Conseqüentemente, a interrupção do tratamento pode chegar a 40% dos pacientes.

Os dois fármacos produzem anorexia, náuseas, êmese, perda de peso e neuropatia periférica (Bern, 2011). Cabe resaltar que existem pacientes chagásicos que não podem receber o tratamento porque estas drogas são contra-indicadas para pacientes com disfunção renal e/ou hepática grave, mulheres grávidas, pessoas com problemas de deglutição (Hidron et al., 2010), ou pessoas com hemopatias, infecções sistêmicas, insuficiência respiratória e neoplasias (Coura et al., 2002).

Embora na maioria dos casos o benzonidazol produza menos efeitos colaterais do que o nifurtimox, persiste ainda outra problemática: a eficiência parcial no tratamento de pacientes chagásicos pode resultar em contaminação das bolsas de sangue usadas em transfusões, que também podem estar contaminadas ocasionando a transmissão da doença no momento da transfusão sanguínea (Martin et al., 2014). Também não há um tratamento eficiente para as bolsas de sangue, pois a alternativa de profilaxia com violeta de genciana também produz efeitos colaterais nos receptores como coloração das mucosas e aglutinação das hemácias (Docampo e Moreno, 1990).

Estudos recentes mostraram que o BZ produz dano ao DNA mitocondrial, oxidação de nucleotídeos e desempacotamento da cromatina do parasita. Em

parasitas que super expressam proteínas envolvidas no reparo de DNA por recombinação foram mais resistentes ao BZ, indicando que BZ causa quebras na dupla fita de DNA (Rajão et al., 2014).

Ainda não há um consenso sobre a padronização de testes *in vivo* e *in vitro* de novos compostos alternativos, sejam naturais ou sintéticos. Sugere-se que é preciso estabelecer critérios mínimos para a tomada de decisões objetivas, garantindo assim resultados confiáveis (Romanha et al., 2010). Estes protocolos podem levar à identificação de novos compostos que possam ser testados em ensaios pré-clínicos, um passo fundamental no processo de desenvolvimento de drogas.

Apesar dos incontáveis esforços em conseguir drogas alternativas sem efeitos colaterais e que possam estar à mão de todos os pacientes chagásicos, existe ainda a necessidade de se encontrar uma molécula ou composto eficiente, seja natural ou sintético. Esta droga deve ser tolerada sem exceções, de baixo custo de aquisição e que deve melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados (Castro et al., 2006; Romanha et al., 2010), conseguindo assim substituir as duas drogas atualmente em uso.

#### 1.4 Produtos Naturais

Em função dos efeitos tóxicos descritos anteriormente para as drogas atualmente em uso contra doença de Chagas, se faz necessária uma busca por moléculas alternativas naturais ou sintéticas. Já existe uma alternativa interessante de compostos sintéticos como os derivados de azole (Diniz et al., 2013; Buckner e Urbina, 2012) As drogas alternativas naturais podem ser de origem animal (ainda pouco estudadas contra *T. cruzi*) ou vegetal, obtidas como extratos ou derivados (isolados).

Como exemplo de produtos de origem animal temos a esponja do mar do (Caribe *Verongula rígida*), de cujos extratos foram isolados nove derivados dos quais um demonstrou atividade contra *T. cruzi* (Galeano et al., 2011). Outras alternativas naturais também pouco estudadas são os derivados de algas marinhas (Bianco et al., 2013). Por exemplo, extratos da alga marinha vermelha *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Ceramiales) demonstraram atividade anti-leishmanica, antifúngica e também contra formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Felício et al., 2010).

#### 1.4.1 Extratos Vegetais

Dos produtos naturais atualmente testados contra *T. cruzi*, a alternativa mais estudada é a de origem vegetal (Coura e Castro, 2002). Nas últimas duas décadas, estima-se que a atividade tripanocida de mais de 100 famílias de plantas tenha sido estudada, incluindo aproximadamente 400 espécies de plantas (Izumi et al., 2012). A atividade microbicida destes compostos reside nos mecanismos de defesa das plantas para sua própria sobrevivência, mediados pela produção de metabólitos secundários que atuam como inseticidas, bactericidas, fungicidas ou parasiticidas (Bakkali et al., 2008).

Os derivados de plantas podem ser obtidos como extratos, os quais podem provir de partes específicas ou de uma mistura de partes das plantas. Boa parte dos estudos do efeito de extratos sobre tripanosomatídeos vem sendo feita em *Leishmania* (Ribeiro et al., 2014). Segue abaixo três exemplos recentes de estudos em *Leishmania*.

Um estudo com extratos de 16 plantas medicinais do Brasil demonstrou que sete foram eficazes contra *L. amazonensis* (Ribeiro et al., 2014). O mais potente extrato obtido pelos autores foi o extrato hexânico de baru (*Dipteryx alata*, Fabaceae) com  $CI_{50}/48h$  (Concentração Inibitória necessária para diminuir em 50% um processo biológico; no caso, crescimento do parasita em cultura) de 0,08  $\mu g/ml$  contra formas promastigotas. Resultados satisfatórios também foram obtidos com extrato hexânico de jamelão (*Syzygium cumini*, Myrtaceae), extratos etanólico e hexânico de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril*, Fabaceae) e extratos etanólicos de folhas de *Jacaranda caroba* e *J. cuspidifolia* (Bignoniaceae).

Resultados positivos também foram obtidos contra formas promastigotas de *L. braziliensis* incubadas com sesquiterpenos ricos em lactona isolados de extratos de margaridão (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) por Toledo e colaboradores (2014). Após 72 horas de incubação a concentração  $CI_{50}/72h$  foi de 2,2  $\mu g/ml$  para um de seis isolados testados. Nenhum dos compostos testados foi citotóxico nas concentrações usadas (até 50  $\mu g/ml$ ).

Extratos de plantas também se mostraram eficientes contra *L. donovani*. Incubação de formas promastigotas e amastigotas por 92 horas com extrato de folha de *Vitex peduncularis* (Verbenaceae) resultou em  $CI_{50}/92h$  de 2,4 e 0,93  $\mu g/ml$ , respectivamente. Quando incubado com macrófagos por 48 horas este extrato

apresentou CC<sub>50</sub>/48h (Concentração Citotóxica 50%) de 123,7 µg/ml (Rudrapaul et al., 2014).

Da mesma maneira, extratos vegetais tem mostrado atividade microbicida também contra o *Trypanosoma cruzi*. Testes em formas epimastigotas com extratos de 13 diferentes plantas demonstraram eficiência com extratos de pau-sangue (*Croton celtidifolius*, Euphorbiaceae), catuaba (*Trichilia catigua*, Meliaceae), aroeira-salsa (*Schinus molle*, Anacardiaceae), timuto-pinheirinho (*Polygala sabulosa*, Polygalaceae), pinheirinho da praia (*Polygala cyparissias*), alecrim-de-santa-catarina (*Polygala paniculata*), carqueja (*Baccharis platypoda*, Asteraceae), jambolão (*Eugenia jambolana*, Myrtaceae) e pitanga (*Eugenia uniflora*, Myrtaceae) (Pizzolatti et al., 2002). Por outro lado, extratos de agrião-do-Pará (*Spilantes oleracea*, Compositae), bacopari (*Rheedia gardneriana*, Guttiferae) e de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*, Leguminosae) não mostraram atividade contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Pizzolatti et al., 2002). Nesses experimentos, os autores assinalam o extrato hexânico (EH) de *Polygala sabulosa* como o melhor composto tripanocida, com CI<sub>50</sub>/72h de 1 µg/ml. Em testes de extratos de diclorometano de partes aéreas (partes que encontram-se acima de solo) de *Polygala sabulosa* contra formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, após incubação por 48 horas com 250 µg/ml obteve-se lise de 100% dos parasitas (Pizzolatti et al., 2002).

Izumi e colaboradores (2008) realizaram testes com extratos vegetais contra as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e demonstraram que extratos e frações de tanaceto (*Tanacetum parthenium*, Asteraceae) são eficientes, com CI<sub>50</sub> de 2 µg/ml. Além disso, os autores também demonstraram atividade contra as formas epimastigotas, com CI<sub>50</sub>/96h de 0.5 µg/ml. A citotoxicidade (CC<sub>50</sub>/96h) deste extrato foi de 3,2 µg/ml (índice de seletividade = 6,4).

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram utilizadas em testes de extratos hidroetanólicos de matico (*Aristeguietia glutinosa*, Asteraceae), obtendo-se lise de 80% dos parasitas a uma concentração de 250 µg/ml (Varela et al., 2014). Estes autores também realizaram testes *in vivo*, demonstrando que derivados desta planta inibem a atividade mitocondrial e a síntese de esteróis da membrana celular dos parasitas, sem apresentar danos tóxicos visíveis em murinos, durante tratamento por sete dias.

Apesar do grande número de testes de extratos vegetais contra tripanosomatídeos (revisto em Alviano et al., 2012), existem relativamente poucos relatos sobre o uso de uma outra alternativa de origem vegetal, os óleos essenciais



(OEs). Por exemplo, já foi demonstrado em *Trypanosoma brucei* que tanto o OE quanto extratos de alfavaca (*Ocimum gratissimum*, Lamiaceae) apresentam resultados tripanocidas eficientes sem citotoxicidade para células de mamíferos (Kpadonou et al., 2014).

### 1.5 Óleos essenciais

São compostos naturais, voláteis, aromáticos e de alta pureza produzidos por todos os órgãos das plantas como metabólitos secundários, cujas técnicas para obtenção foram desenvolvidas pelos árabes na Idade Média mediante vapor ou hidrodestilação. Os óleos essenciais (OEs) desempenham diferentes funções protetoras para as plantas por serem antissépticos e biocidas (Lima et al., 2011), protegendo a planta não somente contra microorganismos patógenos, mas também contra herbívoros, pela baixa palatabilidade. Outro papel importante dos OEs está em manter a conservação da espécie, atraindo insetos que favoreçam a dispersão de pólen ou sementes, ou repelindo ameaças. Devido ao odor agradável, muitos OEs são amplamente utilizados para perfumes, usos culinários e fitoterápicos (Bakkali et al., 2008).

A composição química dos OEs difere não somente no número de moléculas constituintes. A composição química de um mesmo OE pode variar em função de diferentes condições de extração, de cultivo e de meio ambiente. Também podem influir a fase do ciclo vegetativo, a idade, o órgão da planta e a composição do solo (Bakkali et al., 2008). Na composição química dos OEs existem 2 ou 3 compostos majoritários dentre aproximadamente 20–60 constituintes totais. Estes componentes são em maioria (90%) terpenos e terpenóides, havendo também constituintes alifáticos caracterizados por seu baixo peso molecular (Bakkali et al., 2008).

Os OEs são considerados compostos sem alvo celular específico, devido à variedade molecular de sua composição. Seu mecanismo de ação, por conter moléculas lipofílicas, consiste em romper e/ou atravessar a membrana plasmática (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Helander et al., 1998). Os OEs também podem causar diminuição do potencial da membrana mitocondrial, seguido de despolarização e alteração no transporte de íons como  $\text{Ca}^{++}$  (Richter e Schlegel, 1993; Novgorodov e Gudz, 1996).

Um possível mecanismo de ação dos metabólitos secundários (fenóis ou flavonóides) de óleos essenciais contra células eucariotas pode ser provocar um

conjunto de desequilíbrios intracelulares, produzindo descontrolo de agentes oxidantes, antioxidantes e pró-oxidantes dentro e fora de organelas em função da despolarização das membranas (Sakagami e Satoh, 1997; Sakagami et al., 1999; Fukumoto e Mazza, 2000; Sakihama et al., 2002; Burt, 2004). Esta desordem mediada pelos fenóis produz alteração da fluidez normal das membranas, causando liberação de íons cálcio, proteínas, radicais livres e citocromo C, levando à morte celular por apoptose e/ou necrose (Yoon et al., 2000; Armstrong, 2006).

Cabe destacar que um único OE, como por exemplo o de katrafay (*Cedrelopsis grevei*, Rutaceae), pode apresentar diversas propriedades anti-tumorais, anti-inflamatórias, anti-oxidantes e anti-maláricas (Aofolous et al., 2013). Estes autores sugerem que o estudo de OEs como biocidas deve ser mais aprofundado. Em uma revisão recente (Borges et al., 2012) foi evidenciada a atividade eficiente de diferentes OEs contra o *T. cruzi*, sendo que nem todos foram tóxicos contra células de mamíferos. Já se postulou que os OEs, assim como os seus constituintes majoritários, são candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas anti *T. cruzi* (Flores et al., 2008).

Os OEs tem demonstrado eficiência contra bactérias e protozoários patogênicos para a conservação de carnes (Hernández-Ochoa et al., 2014). Estes autores extraíram, mediante hidrodestilação, OE de cominho (*Cuminum cyminum*, Apiaceae), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e helénio (*Inula helenium*), e demonstraram a eficiência destes OEs contra bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*) e *Toxoplasma gondii*.

Os OEs também podem ser larvicidas e anti-maláricos. Ntonga e colaboradores (2014) extraíram OE de manjerição (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae), de alfavaca (*Ocimum canum*, Lamiaceae) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*, Poaceae), e demonstraram que estes OEs (ricos em linalol, cineol e geraniol respectivamente) foram ativos contra larvas de *Anopheles funestus* e contra *Plasmodium falciparum*.

Como já mencionado anteriormente, extrato de jamelão (*Syzygium cumini*) é um eficiente leishmanicida (Rodrigues et al., 2014a; Ribeiro et al., 2014). Além disto, o OE desta planta e seu constituinte majoritário ( $\alpha$ -pineno) apresentam atividade leishmanicida, com eficiência quase 3 vezes maior sendo obtida com o  $\alpha$ -pineno (Rodrigues et al., 2014b). Tratamento de amastigotas intracelulares de *Leishmania*

*amazonensis* por 48 horas com o OE resultou em um  $CI_{50}/48h$  de 38,1  $\mu g/ml$  para o OE e de 15,6  $\mu g/ml$  para o  $\alpha$ -pineno.

Os OEs de diversas espécies de *Annona* spp. (Annonaceae), como *Annona verpetorum*, (Costa et al., 2002), *Annona pickelii* e *Annona salzmännii* (Costa et al., 2013) foram eficientes contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de 31,9  $\mu g/ml$  para *A. verpetorum*. Também já se demonstrou que o OE de *Xylopiia frutescens* (Annonaceae) e *Xylopiia laevigata* tem eficiência contra tripomastigotas de *T. cruzi*, em concentrações não citotóxicas para macrófagos murinos (Silva et al., 2013).

Em testes com formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*, os OEs de alecrim (*Lippia sidoides*, Verbanaceae), *Lippia origanoides*, melhoral (*Justicia pectoralis*, Acanthaceae), alfavaca (*Ocimum gratissimum*), erva-de-Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides*, Amaranthaceae) e vitex (*Vitex agnus-castus*, Lamiaceae) demonstraram efeito tripanocida, sendo que os OEs de alecrim e alfavaca apresentaram índices de seletividade de 18.7 e 15.7, respectivamente (Borges et al., 2012).

Escobar e colaboradores (2010) demonstraram uma diversidade de resultados quando testaram óleos essenciais de 19 amostras de diferentes espécies de *Lippia* (Verbenaceae) - e sete dos seus compostos majoritários - obtidos de diferentes regiões da Colômbia, contra epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Por exemplo, o OE de *Lippia alba* apresentou valores  $CI_{50}/72h$  variando de 5,5  $\mu g/mL$  a  $>100 \mu g/ml$ , dependendo da região de coleta.

Recentemente, Azeredo e colaboradores (2014) testaram oito OEs demonstrando atividade tripanocida em todos eles. O óleo essencial de canela (*Cinnamomum verum*) apresentou  $CI_{50}/24h$  de 5,05  $\mu g/ml$  contra formas tripomastigotas metacíclicas. Resultados satisfatórios também foram obtidos em epimastigotas com o uso de OEs de cabreúva (*Myrocarpus frondosus*), pitanga (*Eugenia uniflora*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e limão (*Citrus limon*).

Em um conjunto de trabalhos do Laboratório de Biologia Celular de Microorganismos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz foram testados OEs de diversas especiarias contra as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. O melhor resultado foi obtido com uso do OE de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) contra formas amastigotas, com  $CI_{50}/48h$  de 5,1  $\mu g/ml$  (Santoro et al., 2007a). Resultados satisfatórios com formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidos com OEs de

cravo (*Ocimum basilicum*), manjeriço (*Syzygium aromaticum*) e mil-folhas (*Achillea millefolium*), sendo que o constituinte majoritário de OE do cravo (eugenol) apresentou  $CI_{50}/24h$  de 76  $\mu g/ml$  (Santoro et al., 2007b). Bons resultados também foram obtidos com OEs de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), e com timol, o principal constituinte do OE de tomilho (Santoro et al., 2007c).

Estudos *in vivo* com OE de limão verbena (*Aloysia triphylla*) demonstraram redução de 85,4% da parasitemia em camundongos com doses de 250 mg/kg após 22 dias de infecção (Rojas et al., 2012).

Uma alternativa interessante para o estudo de OEs é o uso dos seus constituintes principais. Por exemplo, foi demonstrado que citral, o constituinte majoritário de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), inibe a diferenciação (metaciclogênese) do *T. cruzi in vitro* a uma concentração de 40  $\mu g/ml$  (Cardoso e Soares, 2010). Rotundifolona, o constituinte majoritário do OE de *Lippia pedunculosa*, foi três vezes mais eficiente (a 10  $\mu g/ml$ ) contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* do que o OE total (Santos et al., 2014). O uso individual ou combinado de constituintes majoritários de OEs como uma alternativa eficiente também foi demonstrado por Azeredo e Soares (2013). Testes com usos combinados apresentaram  $CI_{50}/24h$  de 3,45  $\mu g/ml$  para a tripla combinação de eugenol, timol e citral, os principais constituintes de cravo-da-Índia, tomilho e capim-limão, respectivamente. Este caminho pode levar também a tentativas de uso combinado de constituintes de OEs para reduzir os efeitos tóxicos do benzonidazol, aumentando as possibilidades de um tratamento de qualidade para os pacientes chagásicos.

Apesar de todos estes estudos, pouco tem sido feito sobre o efeito dos OEs de pimentas sobre o *T. cruzi*. Assim, nesta dissertação nos propusemos a analisar o efeito de OEs de pimenta-de-macaco e pimenta longa sobre as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*.

## 1.6 Pimentas

As pimentas (*Piper* spp., Piperaceae) formam um grande gênero de plantas que compreende mais de 700 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As pimentas são utilizadas na medicina popular como analgésicas, antissépticas, inseticidas e antimicrobianas (Chauret et al., 1996; Orjala et al., 1994; Bakkali et al., 2008; Xu e Li, 2011). Estas propriedades podem

estar associadas aos seus componentes estruturais como amidas, derivados de ácido benzóico, ciclopentenóides, fenilpropanóides, lignanas e neolignanas (Xu e Li, 2011).

Existem alguns relatos sobre o uso de extratos de pimentas contra *Leishmania*. Demonstrou-se atividade de extrato de *Piper regnellii* contra *Leishmania amazonensis* (Vendrametto et al., 2010) com  $CI_{50}/72h$  de 9 e 13  $\mu g/ml$  contra formas promastigotas e amastigotas, respectivamente, e sem citotoxicidade a estas concentrações. Eupomatenoide-5, um derivado de extratos de *Piper regnellii* var. *pallenscens* induziu apoptose em *L. amazonensis* (Garcia et al., 2013).

Outro composto derivado de pimenta, o DMC (2',6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona), obtido de extrato de *Piper aduncum*, foi efetivo contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, com  $CI_{50}/48h$  de 0,5 e 24  $\mu g/ml$ , respectivamente (Torres-Santos et al., 1999). Segundo os autores, o mecanismo de ação deste composto não estava na ativação do metabolismo oxidativo de nitrogênio dos macrófagos, mas sim na ação direta sobre os parasitas.

Flores e colaboradores (2007) demonstraram que os constituintes majoritários de extrato de *Piper rusby* (kavapyrone e chalcone flavokavain) são leishmanicidas tanto in vitro como in vivo.

Existem poucos estudos, também em *Leishmania*, usando o OE de pimentas. Demonstrou-se atividade de *Piper auritum* contra formas promastigotas de *L. major*, *mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, com  $CI_{50}/72h$  variando entre 12,8 e 63,3  $\mu g/ml$ . Este OE não apresentou citotoxicidade contra macrófagos nestas concentrações (Monzote et al., 2010). Já o OE de *Piper cubeba*, embora não tenha sido ativo contra *L. amazonensis*, foi efetivo contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de 45,5 e 87,9  $\mu g/ml$ , respectivamente (Esperandim et al., 2013).

### 1.7 Óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum*)

A *pimenta longa* (Figura 1.2) é uma Piperaceae com alta capacidade regenerativa e de rebrota. Análise da composição química de seu OE demonstrou safrol (89%) como constituinte majoritário (Zacaroni et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (Miranda, 2002; Cremasco et al., 2012; Pacheco et al., 2013). O OE de pimenta longa utilizado nesta dissertação foi obtido pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras-MG

(UFLA), que recentemente publicou (Zacaroni et al., 2009) a composição química deste óleo e seu efeito fungitóxico contra *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*.



Figura 1.2 *Piper hispidinervum* (pimenta longa).

Fonte: <http://www.oleos essenciais.org/oleo-essencial-de-pimenta-longa/>

Análises químicas do OE de pimenta longa demonstram a existência de arilpropanóides, os quais atuaram como inibidores parciais contra o fungo *Mycosphaerella fijiensis*, causador da sigatoka negra em culturas de bananeiras (Hanada et al., 2004). Os autores sugeriram que o responsável pelo efeito fungicida seria também o safrol, por ser o constituinte majoritário deste OE.

O OE pimenta longa apresenta atividade como inseticida, sendo eficiente no combate a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), cujas larvas são a principal praga na cultura do milho (Cruz et al., 2014). Relatos de Estrela e colaboradores (2006) também demonstraram atividade inseticida de OEs de pimenta longa e pimenta de macaco. Neste caso os ensaios foram contra *Sitophilus zeamais*, um coleóptero (gorgulho) que é uma das principais pragas de grãos armazenados de milho. Os autores mostraram que o OE de pimenta de macaco foi mais eficiente que o OE de pimenta longa quando aplicado por fumigação ou por aplicação tópica no inseto.

### 1.8 Óleo essencial de pimenta de macaco (*Piper aduncum*)

Esta pimenta é um arbusto tropical (Figura 1.3) característico da América Central e do Sul. No Brasil encontra-se naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica.

O OE da pimenta de macaco pode apresentar uma grande variedade em seu principal constituinte, de acordo com o lugar de coleta. OEs obtidos de espécimes de

áreas desmatadas da Amazônia e Norte do Brasil são ricos (35-90%) em dilapiol. Porém, aqueles derivados de floresta Atlântica, nordeste e sudeste brasileiro são enriquecidos nos monoterpenos E-nerolidol e linalol (Almeida et al., 2009).



Figura 1.3 *Piper aduncum* (pimenta de macaco).

Fonte: <http://toptropicals.com/pics/garden/05/23/3783.jp>

Demonstrou-se que o OE de pimenta de macaco rico em dilapiol causou 100% de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, a uma concentração de 600 ppm (Almeida et al., 2009). Estes autores também ressaltaram que o isômero isodilapiol não apresenta a mesma atividade.

O OE de pimenta de macaco também pode ser utilizado como repelente contra o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Araújo et al., 2012) e como inseticida contra formigas (Souto et al., 2012) e baratas (Ling et al., 2009). Extrato etanólico de pimenta de macaco apresentou alta atividade contra o fungo dermatófico *Trichophyton interdigitale*, incluindo aqueles resistentes ao fluconazol (Santos et al., 2014), embora a variação na obtenção dos compostos e o tipo de extração/maceração influenciassem no resultado. Di-hidrochalconas isoladas de extratos de pimenta de macaco tem ação antibacteriana (Orjala et al., 1994).

Não existem relatos sobre o uso do OE de pimenta de macaco contra o *T. cruzi*. Batista e colaboradores (2008) isolaram cinco compostos (cromenos) desta planta e demonstraram atividade epimastigotas de *T. cruzi* após 72 h de tratamento. O melhor  $CI_{50/72h}$  obtido foi de 2,82  $\mu$ M para um derivado de benzopirano, sugerindo que esta planta deve ser considerada como candidata para estudos mais aprofundados contra o *Trypanosoma cruzi*. De fato, estudos com derivados de pimentas contra *T. cruzi* (Flores et al., 2008), incluindo extratos de *P. aduncum*

(Flores et al., 2009), mostraram eficiência com  $CI_{50}$  a concentrações menores que 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Estes dados demonstram a existência de poucos estudos sobre o uso de extratos e OEs de pimentas contra tripanosomatídeos, havendo apenas um relato sobre o uso de OE contra *T. cruzi*. Assim, esta dissertação se propõe a analisar o efeito tripanocida de outras pimentas e estudar a atividade tripanocida dos OEs de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) em bioensaios de 24 horas contra diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade tripanocida do óleo essencial de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) e de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) sobre o *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar o efeito tripanocida dos óleos essenciais de pimenta de macaco e de pimenta longa sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas de cultura e tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*, calculando o coeficiente de inibição  $CI_{50}/24h$ . selecionar o óleo com melhor efeito para análises mais detalhadas.
- B. Avaliar o efeito tripanocida do óleo essencial de pimenta de macaco sobre as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células Vero, calculando o coeficiente de inibição  $CI_{50}/24h$ .
- C. Avaliar o efeito citotóxico dos óleos essenciais sobre células Vero e hemácias humanas, calculando o coeficiente de citotoxicidade  $CC_{50}/24h$  e o Índice de Seletividade.
- D. Analisar a composição química dos óleos essenciais de pimenta longa e pimenta de macaco por cromatografia de gases / espectroscopia de massas.
- E. Analisar por citometria de fluxo possíveis alterações no ciclo celular e no potencial de membrana de parasitas tratados com óleo essencial de pimenta de macaco.
- F. Analisar por microscopia eletrônica de transmissão a morfologia de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com óleo essencial de pimenta de macaco.
- G. Calcular o índice de seletividade do constituinte majoritário do óleo essencial da pimenta de macaco.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CÉLULAS VERO

Células Vero (ATCC CCL-81) foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas contendo meio RPMI-1640 com L-glutamina (Gibco), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, SP, Brasil), com passagens seriadas quando as células atingiam confluência em monocamada. Para os ensaios de citotoxicidade, as monocamadas celulares foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e tratadas com tripsina 0,25% + EDTA 0.1% durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para liberar as células do substrato. Após este tratamento acrescentou-se às garrafas meio RPMI-1640 + 10% SFB para inibir a ação da tripsina, o sobrenadante foi coletado e as células foram obtidas por centrifugação a 100g por 2 minutos.

Para os experimentos, após contagem em câmara de Neubauer as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço em meio RPMI-1640 para os testes de citotoxicidade e placas de 24 poços e meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich) para a avaliação do efeito inibitório sobre formas amastigotas de *T. cruzi*. As placas foram incubadas por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a adesão das células ao substrato. Análise visual foi feita em microscópio invertido, observando-se as células espalhadas e aderidas, sendo trocado então o meio para a remoção daquelas que não aderiram. Após 24 horas de incubação as células foram lavadas com meio de cultura e as placas foram utilizadas nos diferentes experimentos.

#### 3.2 HEMÁCIAS

Hemácias humanas foram obtidas a partir de 10 ml de sangue (tipo O+) de um doador voluntário saudável, utilizando um protocolo previamente descrito (Izumi et al., 2012). Após a coleta, o sangue foi desfibrilado para separar a hemoglobina e então lavado com salina glicosada estéril (0,85% NaCl + 5% glicose + 100 ml água destilada) para remoção da hemoglobina liberada pelo procedimento de desfibrilação. O produto final foi diluído em solução com 99,5% salina glicosada e 0,5% DMSO e centrifugado por 5 minutos a 1400g. O sobrenadante transparente foi descartado e as hemácias do pellet foram ajustadas à concentração de 6% por diluição em salina glicosada.

### 3.3 PARASITA

Nesta dissertação foram diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c, obtidas *in vitro*.

#### 3.3.1 Formas epimastigotas

Formas epimastigotas foram mantidas a 28°C em meio LIT (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, através de passagens a cada três dias. Para os experimentos, parasitas obtidos a partir de culturas de 72 horas foram adicionados a placas de 96 poços, a uma concentração de  $5 \times 10^6$  parasitas/poço.

#### 3.3.2 Formas tripomastigotas de cultura

Células Vero e formas tripomastigotas de cultura foram adicionadas a garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo 8 ml de meio DMEM na proporção de 1:10, respectivamente. Após 4 horas de interação as garrafas foram lavadas com PBS para retirada dos parasitas não interiorizados. Adicionou-se meio novo e o meio foi trocado a cada 24 horas durante 3 dias. Após 96 horas da infecção, formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante foram coletadas por centrifugação a 3000g durante 10 minutos. Para os experimentos os parasitas foram semeados em placas de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^7$  parasitas/poço.

#### 3.3.3 Formas tripomastigotas metacíclicas

Formas epimastigotas de cultura em final de fase logarítmica de crescimento (5 dias) foram submetidas a estresse nutricional para completar o processo de diferenciação em tripomastigotas *in vitro* (Bonaldo et al., 1988; Contreras et al., 1985; Contreras et al., 1988). Em resumo, epimastigotas (de culturas com densidade de  $5-7 \times 10^7$  células/ml) foram coletadas por centrifugação a 7000g por 5 minutos a 10°C e suspensas em meio TAU (Triatomine Artificial Urine: 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM tampão fosfato pH 6,0) na concentração de  $5 \times 10^8$  células/ml. Após incubação por 2 horas a 28°C (estresse nutricional) as células foram transferidas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 ml de meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 10 mM L-prolina, 50 mM glutamato sódico, 2 mM aspartato sódico e 10 mM glicose), na concentração final de  $5 \times 10^6$  células/ml. Após 72 horas de cultivo as formas tripomastigotas metacíclicas liberadas no

sobrenadante (porcentagem de diferenciação: cerca do 80%) foram coletadas por centrifugação e purificadas por passagem através de coluna de afinidade contendo a resina DEAE-celulose equilibrada em tampão PSG (47,47 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 37,76 mM NaCl, 55,5 mM glicose).

#### 3.3.4 Formas amastigotas intracelulares

Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir de culturas de células Vero infectadas com tripomastigotas de cultura. Para isso, células Vero foram coletadas e após verificada a viabilidade celular pelo corante vital Azul de Tripán foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço em meio DMEM. Após 24 horas de cultivo, formas tripomastigotas de cultura foram adicionadas então a cada poço na proporção de 1:10 células por parasita, seguindo-se incubação por 3 horas. As culturas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitas não interiorizados e mantidas então em 1 ml de meio DMEM. Após 24 horas as células Vero infectadas continham amastigotas intracelulares as quais foram então utilizadas nos experimentos.

### 3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.4.1 Obtenção

Os óleos essenciais de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) e de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) foram obtidos por destilação em aparelho de Clevenger pela Dra. Maria Graças Cardoso, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. Folhas de *Piper aduncum* foram coletadas em março de 2013 durante o período da manhã, sem chuva, na cidade de Lavras. Folhas de *Piper hispidinervum* foram coletadas no Horto da UFLA durante o primeiro trimestre de 2013.

Os óleos essenciais foram armazenados a 4°C (estoque #1). Para o uso, pequenas quantidades foram diluídas a uma concentração de 100 mg/ml (estoque #2) em DMSO, garantindo-se assim que a concentração final de DMSO nos bioensaios não fosse maior do que 0,5%. Os estoques foram mantidos no escuro para evitar a sua degradação (Guimarães et al., 2008).

### 3.4.2 Caracterização química por GC-MS

A análise dos componentes dos óleos essenciais de pimenta de macaco e pimenta longa foi realizada no Departamento de Química da UFLA em cromatógrafo Shimadzu (GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas com detector seletivo (QP 5000). A coluna empregada foi de tipo sílica fundida e fase ligada (DB5, 30m x 0,25mm) e o gás da fase móvel, hélio (1 mL/min.). As condições de análise foram: injeção a 220°C e detecção a 240°C. A temperatura do forno foi de 40 a 240°C, com acréscimo de 3°C/min; a coluna teve uma pressão inicial de 100,2 KPa; taxa de split 1:10 e volume injetado de 1 µL (soluções a 1% v/v) em diclorometano. Os espectros de massa de cada composto foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229, como também pelo índice de Kovats tabelado.

## 3.5 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica para controlar os processos, diminuir a variabilidade e garantir os resultados e modelos aqui executados. A incubação com os óleos essenciais das pimentas foi realizada durante 24 horas em todos os bioensaios.

### 3.5.1 Efeito sobre epimastigotas

Epimastigotas de culturas de três dias foram coletadas e ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/poço em meio LIT, sendo semeadas em placas de 96 poços. Acrescentou-se então diferentes concentrações dos óleos essenciais (concentração final: 9, 18, 37, 75, 150 ou 300 µg/ml) ou benzonidazol (conc. final: 50, 25, 12,5 ou 6,25 µg/ml). Como controle usou-se meio LIT contendo DMSO a 0,5%.

Após 24 horas de incubação a 28°C fez-se observação visual ao microscópio invertido para avaliar a morfologia e mobilidade dos parasitas, a fim de evitar resultados falso-positivos ou negativos nas leituras por espectrofotometria. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, em leitor de 550 nm. O gráfico do isoblograma (curva concentração-efeito) foi obtido com o software CompuSyn, que também forneceu o valor do  $CI_{50}/24h$  (concentração que inibiu o crescimento das culturas em 50%).

Após obter o valor individual de  $CI_{50}/24h$  para cada óleo essencial (OE) e o benzonidazol (Bz), bioensaios adicionais foram realizados incubando-se as formas

epimastigotas com as seguintes combinações: (a) valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta de macaco + valor  $CI_{50}/24h$  do benzonidazol, na proporção 10:1, (b) valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta longa + valor  $CI_{50}/24h$  do benzonidazol, na proporção 13:1 e (c) valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta de macaco + valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta longa + valor  $CI_{50}/24h$  do benzonidazol na proporção 10:13:1. Estas combinações foram então usadas em diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{6}$ . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e os dados foram quantificados com o software CompuSyn.

#### *3.5.1.1 Avaliação pelo método MTT*

A avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre as formas epimastigotas foi baseada no método colorimétrico de brometo de tiazol azul de tetrazólio, MTT (Francis e Rita, 1986). Este corante vital permite quantificar o coeficiente de inibição celular ao avaliar a redução de substrato feita por desidrogenases presentes na membrana mitocondrial das células viáveis. Este processo forma cristais de formazan com coloração violácea, sendo que a intensidade da cor depende diretamente da quantidade de células viáveis: quanto mais intensa a cor, maior é o número de células viáveis. A leitura da cor foi feita em leitora de placas ELISA (modelo EL800, Biotek) a 550 nm.

Após o período de incubação com os óleos essenciais, acrescentou-se a cada poço 50  $\mu$ l de MTT (previamente preparado a 10 mg/ml em PBS), com concentração final de MTT a 2,5 mg/ml por poço. Devido à fotosensibilidade do MTT, as placas foram incubadas no escuro, envolvidas em papel alumínio, por 3 horas a 28°C. As placas foram então centrifugadas a 475g durante 10 minutos e o sobrenadante foi removido por inversão brusca da placa. Para lisar as células, acrescentou-se a cada poço 20  $\mu$ l de SDS (sodium dodecyl sulfate), incubando-se por uma hora a 28°C. Durante este período as células ficaram lisadas na sua totalidade, mas não solubilizadas. Para isso, 80  $\mu$ l de DMSO foram acrescentados em cada poço e incubou-se por 1 hora a 28°C. Finalmente, o material residual foi retirado manualmente com auxílio de um palito e as placas foram levadas à leitora de ELISA a 550 nm para medir as absorbâncias nos poços.

Dos valores de densidade ótica (DO) obtidos no leitor de ELISA calculou-se a média para cada concentração utilizada. O valor da DO obtido com as células não tratadas (controle) foi utilizado como 100% de viabilidade celular. Por comparação

com o controle foi possível se estimar a porcentagem de células mortas em cada concentração do tratamento. Os cálculos foram feitos com ajuda do software Excel. Finalmente, os dados de viabilidade celular versus concentração do óleo essencial foram analisados no software CompuSyn, onde se obteve o coeficiente de inibição celular  $CI_{50}/24h$  e o isoblograma para cada óleo essencial aqui testado.

### 3.5.2 Efeito sobre tripomastigotas de cultura

#### 3.5.2.1 Efeito a 28°C

Formas tripomastigotas de cultura foram obtidas *in vitro* segundo o item 3.3.2 e a concentração dos parasitas foi ajustada para  $5 \times 10^7$  células/poço. As células foram semeadas em placas de 96 poços com meio DMEM. Em seguida, diferentes concentrações (concentração final: 1, 10, 50 ou 100  $\mu g/ml$ ) dos óleos essenciais ou benzonidazol (Bz) foram adicionadas aos poços. As placas foram incubadas a 28°C por 24h. Após este período cada poço foi diluído na proporção de 1:10 em formol a 10% em PBS.

Avaliação do  $CI_{50}/24h$  foi feita por contagem em câmara de Neubauer. O valor obtido com as células não tratadas (controle) foi utilizado como 100% de viabilidade celular. Por comparação com o controle foi possível se calcular a porcentagem de células mortas em cada concentração do tratamento. Os cálculos foram feitos com ajuda do software Excel. Finalmente, os dados de viabilidade celular versus concentração do óleo essencial foram analisados no software CompuSyn, onde se obteve o coeficiente de inibição celular  $CI_{50}/24h$  e o isoblograma para cada óleo essencial aqui testado.

#### 3.5.2.2 Efeito a 4°C

Formas tripomastigotas de cultura foram obtidas *in vitro* segundo o item 3.3.2 e a concentração dos parasitas foi ajustada  $5 \times 10^7$  células/poço. As células foram semeadas em placas de 96 poços com meio DMEM. Em seguida, diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta de macaco (concentração final: 1, 10, 50 ou 100  $\mu g/ml$ ) foram adicionadas aos poços. Como controles positivos foram utilizados o corante violeta de genciana (quimioprolíptico usado em bolsas de sangue) a diferentes concentrações (1 e 25  $\mu M$ ) e o benzonidazol (1 – 50  $\mu g/ml$ ). Para ter uma maior rapidez na leitura de resultados, a avaliação foi feita pelo método MTT e os dados foram quantificados no Excel e CompuSyn.

### *3.5.3 Efeito sobre tripomastigotas metacíclicas*

Formas tripomastigotas metacíclicas foram ajustadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/poço e semeadas em placas de 96 poços com meio TAU3AAG. Em seguida, diferentes concentrações (concentração final: 1, 10, 50 ou 100  $\mu\text{g/ml}$ ) dos óleos essenciais foram adicionadas aos poços. As placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  por 24h e então cada poço foi diluído na proporção de 1:10 em formol a 10% em PBS. A avaliação do  $\text{CI}_{50}/24\text{h}$  foi feita com contagem na câmara de Neubauer e análise pelo software CompuSyn, como descrito acima.

### *3.5.4 Efeito sobre amastigotas intracelulares*

Formas amastigotas intracelulares foram obtidas como descrito no item 3.3.4. Culturas infectadas foram incubadas por 24 horas e então o meio de cultura foi substituído por meio RPM-1640 contendo diferentes concentrações (concentração final: de 1 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ) do óleo essencial de pimenta de macaco ou de benzonidazol em 1 ml/poço. Seguiu-se incubação por mais 24h e as placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

Cálculo do efeito inibitório do óleo essencial de pimenta de macaco sobre as formas amastigotas foi obtido por contagem de 100 células Vero por poço, mediante fotografias aleatórias dos poços adquiridas em microscópio invertido. As variáveis utilizadas foram: (a) número de células infectadas, (b) número de células não infectadas, (c) número de amastigotas por célula.

Com os dados obtidos calculou-se o Índice de Sobrevivência (IS) para cada concentração testada, baseando-se na seguinte fórmula:

$$\text{IS} = \text{Número de células infectadas} \times \text{Número de amastigotas por célula}$$

O coeficiente de inibição que inibiu em 50% o crescimento das amastigotas intracelulares ( $\text{CI}_{50}/24\text{h}$ ) foi estimado a partir dos valores de SI. Os cálculos e análise estatística foram obtidos com auxílio do software Excel.

## *3.6 EFEITO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI*

Uma vez que a análise química do óleo essencial de pimenta de macaco demonstrou que seus constituintes majoritários eram linalol e nerolidol, estes



constituintes foram testados sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura, seguindo os mesmos protocolos descritos para os testes com os óleos essenciais. Os componentes majoritários foram testados nas concentrações finais de 500, 250 ou 100 ng/ml e a validação da viabilidade celular foi feita pelo método do MTT.

No caso das formas tripomastigotas de cultura, a metodologia do MTT foi adaptada para facilitar a obtenção de dados. Devido ao pequeno tamanho das formas tripomastigotas a intensidade de coloração por MTT permitia avaliar rapidamente em ensaio colorimétrico a viabilidade das células. Para calcular a correlação entre quantidade de células viáveis e a densidade ótica, formas tripomastigotas foram semeadas em diferentes concentrações ( $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  células/poço) em 200 µl de meio LIT em placas de 96 poços. Aos poços foram acrescentados 50, 25 ou 15 µl de MTT preparado como descrito anteriormente, para que as concentrações finais deste corante fossem de 2, 1 e 0,6 µg/ml respectivamente. Análise dos dados demonstrou que resultados reproduzíveis podiam ser obtidos com uma concentração de  $5 \times 10^7$  células/ml e MTT a 1 mg/ml (2,5 vezes menos do usado para epimastigotas). Estes valores foram usados então nos testes com os compostos majoritários sobre as formas tripomastigotas..

### 3.7 CITOTOXICIDADE

#### 3.7.1 Em células Vero

Células Vero a uma concentração de  $2 \times 10^4$  cels/poço em meio RPMI-1640 foram cultivadas por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> na presença dos óleos essenciais (conc. final: 300, 150, 75, 37, 18 ou 9 µg/ml), linalol e nerolidol (conc. final: 500, 250, 125, 60 ou 30 ng/ml), benzonidazol (conc. final: 1000, 100, 10 ou 1 µg/ml) ou violeta de genciana (conc. final: 1000, 500 ou 100 µg/ml). Após o período de incubação foram adicionados a cada poço 50 µl de MTT a 2,5 mg/ml, segundo Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificado por Sieuwerts e colaboradores (1995). Incubação das placas com MTT e leitura das absorbâncias foram realizadas como descrito no item 3.5.1.1

O cálculo do coeficiente de citotoxicidade que afeta 50% da população (CC<sub>50</sub>/24h) foi definido comparando-se os valores de células tratadas com os de células controle não tratadas. Todos os bioensaios citotóxicos foram acompanhados

de observação visual a cada 12 horas, analisando a integridade do tapete celular (confluência e adesão celular) com auxílio de microscópio invertido.

### 3.7.2 Citotoxicidade em hemácias

A solução de hemácias foi semeada em placas de 96 poços com diferentes concentrações (conc. final: 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 ou 0.1 mg/ml) dos óleos essenciais de pimenta de macaco e pimenta longa, com concentração final a 3% de solução de hemácias em cada poço. As placas foram então incubadas a 4°C durante 5 horas. Como controle, hemácias não tratadas foram diluídas só com o veículo (salina glicosada). Após o tempo de incubação (5 horas) as placas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 2 minutos. Foram retirados então 100 µl de sobrenadante de cada poço e transferidos para uma placa nova, imediatamente, esta nova placa foi lida em leitor de ELISA a 450nm sem centrifugação ou lavagem.

lidas diretamente no leitor de ELISA a 450 nm, sem centrifugação ou lavagem.

O coeficiente de citotoxicidade que afetou 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi calculado com auxílio do software Excel seguindo os mesmos parâmetros já descritos acima.

### 3.8 INDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O índice de seletividade (IS) de cada composto foi obtido a partir da razão entre o CC<sub>50</sub>/24h das células de mamífero (Vero ou hemácias) e o CI<sub>50</sub>/24h de cada uma das formas evolutivas do parasita:

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

### 3.9 CITOMETRIA DE FLUXO

#### 3.9.1 Avaliação de alterações no ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*

A avaliação de possíveis alterações no ciclo celular de epimastigotas causadas pelo tratamento com CI<sub>50</sub>/24h do óleo essencial de pimenta de macaco foi feita em citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Formas epimastigotas foram incubadas por 24 horas com o óleo essencial a uma concentração correspondente ao CI<sub>50</sub>/24h. Células controles foram mantidas em meio LIT sem adição do óleo essencial.

Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes em PBS, com centrifugações a 7000g por 2 minutos. O conteúdo de cada poço foi vertido em

diferentes tubos de plástico (300 µl de volume por tubo) e acrescentou-se 1 ml de iodeto de propídio a 10 µg/ml, diluído em 5% de detergente NP40 e 5% de RNase, com incubação por 20 minutos a 28°C. Cada leitura no citômetro capturou 20,000 eventos por amostra. As amostras foram excitadas com 536 nm e a fluorescência emitida foi lida a 623 nm. Os dados foram processados no software FlowJo (Treestar software).

### 3.9.2 Avaliação do potencial de membrana de *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliar o efeito de tratamento com  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta de macaco sobre *T. cruzi*, bioensaios com formas epimastigotas foram analisados com o mesmo citômetro de fluxo citado acima. Após incubação dos parasitas com o óleo essencial a 28°C durante 24 horas, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS (com centrifugações a 7000g por 2 minutos). Acrescentou-se então às culturas Rhodamina 123 a 10µg/ml e incubou-se durante 20 minutos a 28°C. Controle positivo foi feito acrescentando-se CCCP (Carbonyl cyanide 3-clorophenyldrazone) a uma concentração de 10 µM. Controle negativo foi feito sem adição de óleo essencial. Todas as culturas foram lavadas em PBS e o conteúdo de cada poço foi vertido em tubos de plástico (300 µl de volume por tubo). Cada tubo foi analisado a 530/30 nm no citômetro de fluxo mediante a captura de 20,000 eventos por leitura.

A análise dos dados foi realizada com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade (FSC x SSC scatter). O estado normal do potencial de membrana nos parasitas está diretamente relacionado à quantidade de Rhodamina 123 lida no citômetro. Estes valores foram expressos como intensidade de fluorescência e processados com auxílio do software FlowJo (Treestar software).

### 3.10 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* não tratadas (controle em meio DMEM e 0,5% de DMSO) e tratadas com  $CI_{50}/24h$  (3,8 µg/ml) do óleo essencial de pimenta de macaco foram mantidas a 4°C durante 24 horas. Em seguida, os parasitas foram lavados com PBS e fixados durante uma hora com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Após centrifugação por 9.300g por 1 minuto as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato contendo 5 mM de cloreto de cálcio e 0,8% de ferricianeto de potássio. Após as

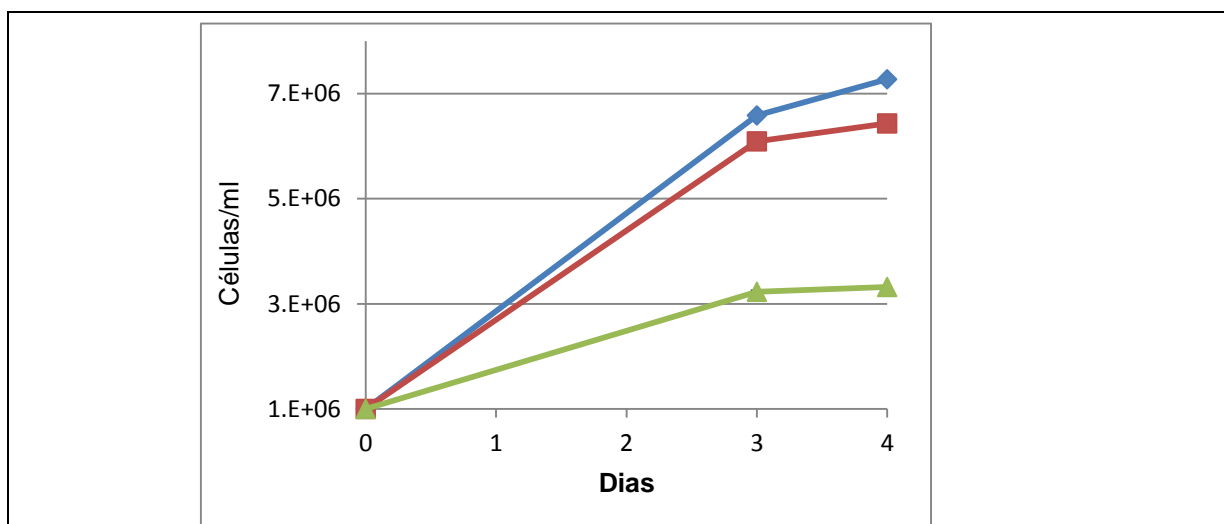
fixações, as células foram desidratadas em acetona 50%, 70%, 90% e 100% durante 2 minutos (2 vezes cada). Posteriormente, as amostras foram incubadas over-night com uma mistura acetona:resina PolyBed na proporção 1:1. Depois do período “overnigh” o material foi incluído em resina pura por 6 horas e em seguida a resina foi polimerizada em blocos de inclusão a 60°C durante 3 dias. Após este período, cada bloco foi seccionado a 70 nm de espessura em ultramicrótomo, os cortes obtidos foram coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As grades foram analisadas em microscópios eletrônicos de transmissão do Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná (MET JEOL JEM 1200EX-II) e da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ (MET JEOL JEM 1011). As imagens digitais obtidas foram processadas com o software Adobe Photoshop CS5 para ajuste de briho e contraste.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ÓLEO ESSENCIAL X EPIMASTIGOTAS

Inicialmente realizou-se um experimento controle em triplicata para avaliar o efeito da adição de DMSO (diluente dos óleos essenciais) a 1% ou 5% ao meio de cultura, o que poderia gerar possível dano sobre o crescimento normal das culturas (Figura 4.1). Após inóculo em meio LIT a uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células/ml, formas epimastigotas foram mantidas por 4 dias a  $28^\circ\text{C}$ , com contagem diária do número de células com o equipamento CellCounter Z. Este bioensaio demonstrou que adição de DMSO a 1% não afetou significativamente o crescimento das culturas em até 3 dias de cultivo). Assim, nos experimentos subsequentes (realizados por incubações por 24h em meio contendo DMSO) o DMSO foi usado a uma concentração que nunca excedeu a 0,5%.

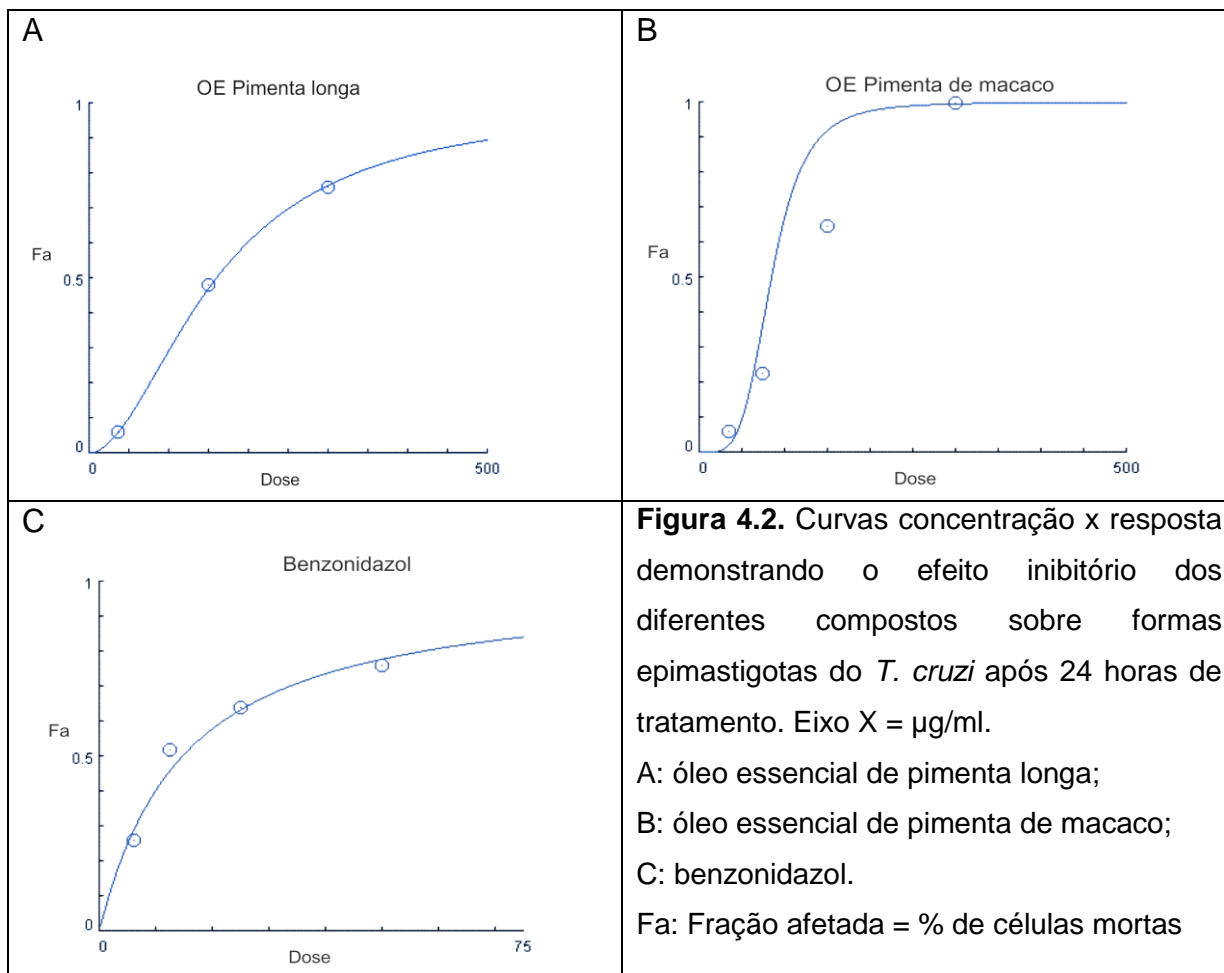


**FIGURA 4.1.** Curva de crescimento (em dias) de epimastigotas mantidos em meio LIT contendo DMSO 1% (vermelho) ou 5% (verde). Em azul: controle (meio LIT sem DMSO). Cada ponto no gráfico representa media e desvio padrão de 3 experimentos.

#### 4.1.1 Compostos isolados

Formas epimastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de óleos essenciais de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) ou pimenta longa (*Piper hispidinervum*) durante 24 horas a  $28^\circ\text{C}$ . Culturas de epimastigotas também foram testadas com benzonidazol nas mesmas condições. Os dados obtidos permitiram construir gráficos de isobologramas com curvas de concentração x efeito.

A partir do isobogramas o software CompySyn calculou os valores do  $CI_{50}/24h$  para cada óleo essencial. Os valores obtidos foram de 156,187  $\mu\text{g/ml}$  para pimenta longa (Fig. 4.2A), 95,45  $\mu\text{g/ml}$  para pimenta de macaco (Fig. 4.2B) e 14,7  $\mu\text{g/ml}$  (45  $\mu\text{M}$ ) para benzonidazol (Fig. 4.2C).

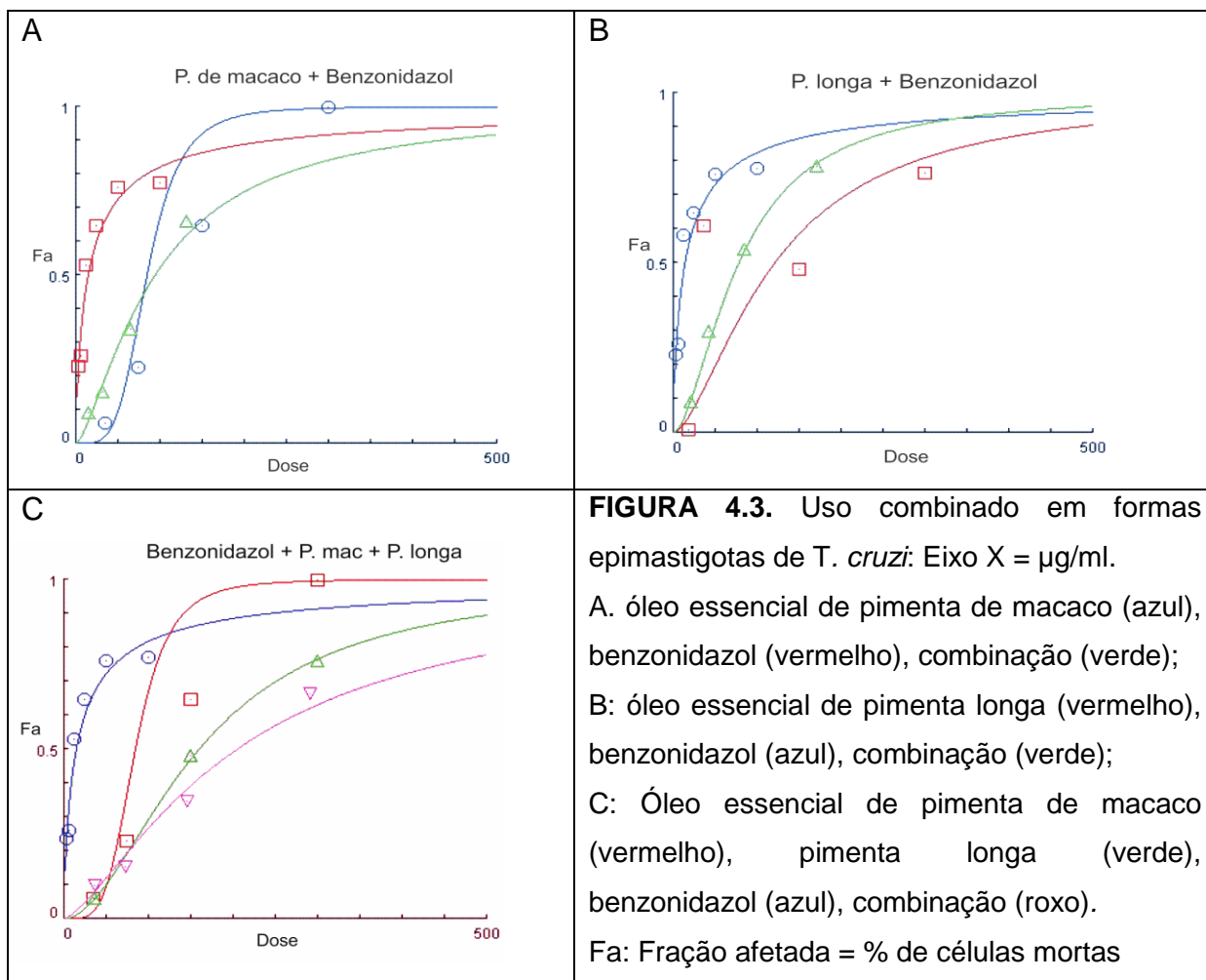


#### 4.1.2 Combinação de compostos

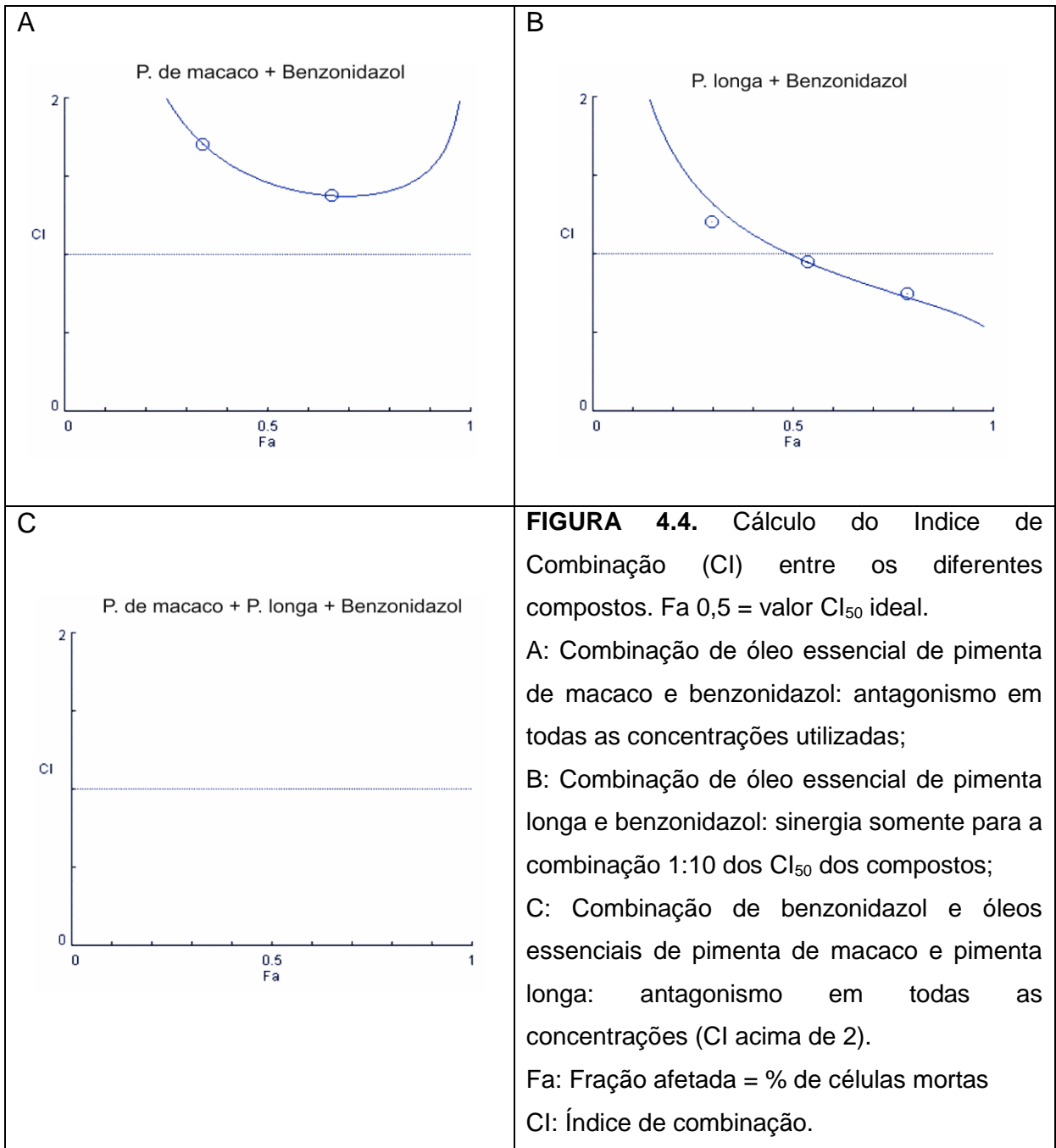
Avaliação do uso combinado de óleo essencial de pimenta de macaco e benzonidazol demonstrou que para obter efeito inibitório sobre metade da população ( $CI_{50}/24h$ ) de epimastigotas o valor teórico combinado foi de 85,45 e 8,54  $\mu\text{g/ml}$  de cada composto, respectivamente (Figura 4.3A).

Por outro lado, em relação ao uso combinado de óleo essencial de pimenta longa e benzonidazol, o valor teórico obtido foi de 72,7 e 5,45  $\mu\text{g/ml}$  de cada composto, respectivamente (Figura 4.3B).

Finalmente, bioensaio com tripla combinação (óleos essenciais de pimenta longa e pimenta de macaco + benzonidazol) mostrou que para se obter o valor combinado de  $CI_{50}/24h$  é necessário teoricamente 112,3, 84,2 e 8,4  $\mu g/ml$  de cada composto, respectivamente (Figura 3.3C). Mas em todos os casos as curvas concentração X efeito mostraram que a combinação das concentrações não produziu melhor efeito que o uso dos compostos isoladamente.



Com o programa CompuSyn foram produzidos gráficos de Índice de Combinação (CI). Estes gráficos (com valores de 0 a 2) mostram relações de antagonismo ou sinergia quando dois ou mais compostos são usados em combinação. Assim, valores abaixo de 1 significam sinergia, acima de 1 significam antagonismo e próximos a 1 significam indiferença. Os gráficos obtidos mostraram a ocorrência de antagonismo ou indiferença para a maioria das concentrações testadas (Figura 4.4; Tabela 1), exceto para a concentração inicial 1:10 dos valores de  $CI_{50}$  da combinação pimenta longa/benzonidazol (Figura 5.4B).





Os dados obtidos estão sumarizados na tabela 4.1 abaixo.

**Tabela 4.1.** Efeito de tratamento de epimastigotas de *T. cruzi* mantidas a 28°C em meio LIT com diferentes compostos.

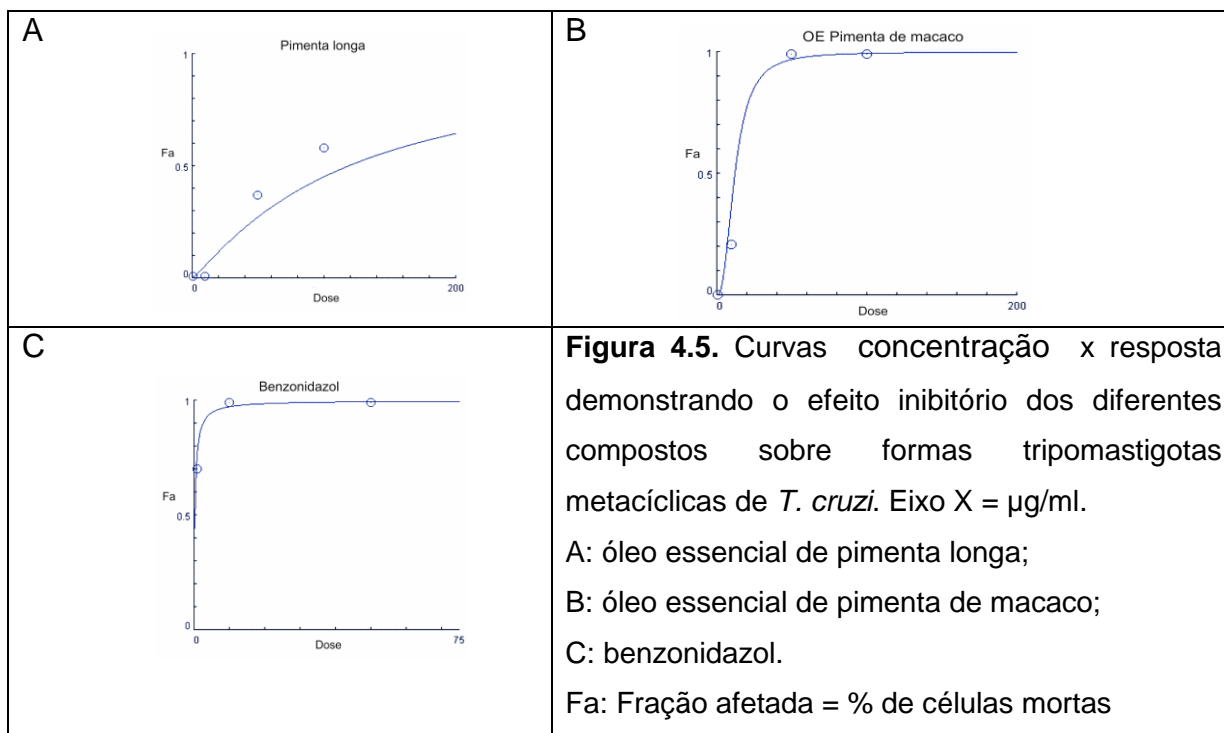
	Composto	Coefficiente de Inibição $CI_{50}/24h$ ( $\mu g/ml$ )	Índice de combinação (CI)	Relação
Individual	OE de pimenta longa	156,20	NA	NA
	OE de pimenta de macaco	84,7	NA	NA
	Benzonidazol	14,7	NA	NA
Dupla combinação	OE de pimenta longa	72,7	1,07	Indiferente
	Benzonidazol	5,45		
Dupla combinação	OE de pimenta de macaco	85,45	1,59	Antagonismo
	Benzonidazol	8,54		
Tripla combinação	OE de pimenta de macaco	120	2,59	Antagonismo
	OE de pimenta longa	112,3		
	Benzonidazol	8,4		

OE = Óleo essencial; NA = Não se aplica

#### 4.2. ÓLEO ESSENCIAL X TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS

Formas tripomastigotas metacíclicas foram incubadas com benzonidazol (controle) e os óleos essenciais. Os isobogramas obtidos (Figura 4.5) permitiram calcular os valores de  $CI_{50}/24h$  para o óleo essencial de pimenta longa (118,39  $\mu g/ml$ ), o óleo essencial de pimenta de macaco (12,1  $\mu g/ml$ ) e para o benzonidazol (0,28  $\mu g/ml$ ).

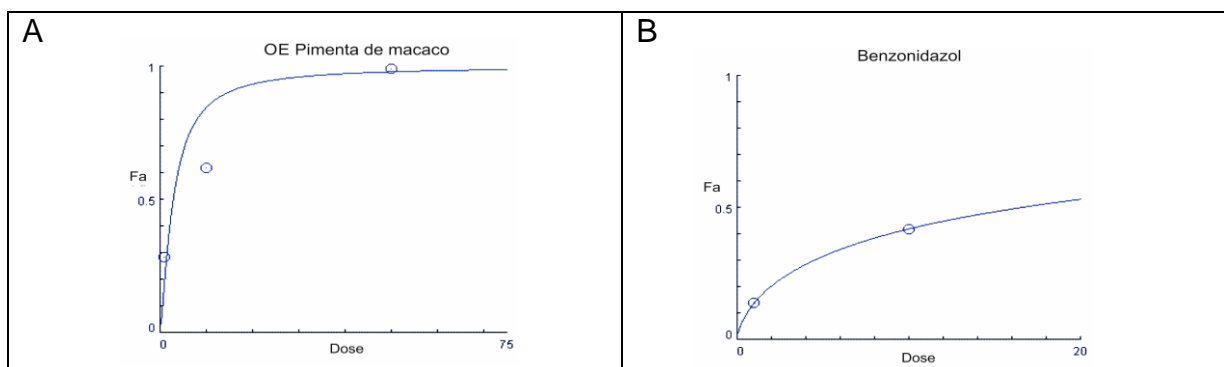
Este ensaio demonstrou uma maior sensibilidade das formas tripomastigotas metacíclicas ao benzonidazol em relação aos óleos essenciais testados. Como a pimenta de macaco demonstrou um valor próximo ao  $CI_{50}$  do benzonidazol, e como a pimenta longa demonstrou um alto valor de  $CI_{50}$ , os testes subsequentes nesta dissertação foram realizados apenas com a pimenta de macaco.



### 4.3 ÓLEOS ESSENCIAIS X TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA

#### 4.3.1 Ensaio a 28°C

Neste ensaio foi possível estimar as concentrações  $CI_{50}/24\text{h}$  para formas tripomastigotas de cultura em 16,1  $\mu\text{g/ml}$  para benzonidazol e 2,8  $\mu\text{g/ml}$  para o óleo essencial de pimenta de macaco (Figura 4.6). Como esperado, em relação à pimenta longa, o valor calculado foi maior do que 100  $\mu\text{g/ml}$  (dado não mostrado), reforçando assim a eliminação desta pimenta dos testes subsequentes desta tese.



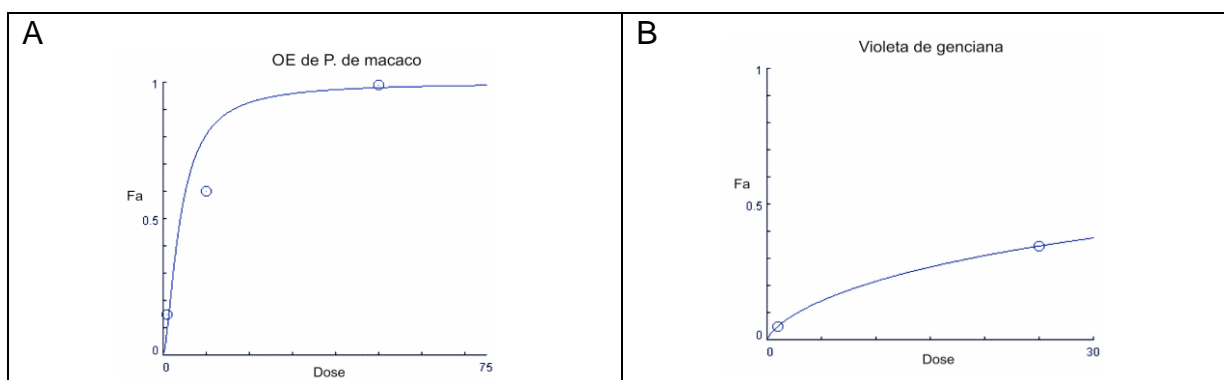
**FIGURA 4.6.** Curvas concentração x resposta demonstrando o efeito inibitório de diferentes compostos sobre formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* a 28°C. Eixo X =  $\mu\text{g/ml}$ .

A: óleo essencial de pimenta de macaco; B: Benzonidazol; Fa: Fração afetada = % de células mortas

#### 4.3.2 Ensaio a 4°C

Foi realizado um ensaio por 24h a 4°C (em geladeira), a fim de mimetizar as condições de manutenção de bolsas de sangue em estoques de banco de sangue. Tripomastigotas de cultura foram incubados com óleo essencial de pimenta de macaco ou com benzonidazol. Este teste permitiu estimar um  $CI_{50}/24h$  de 3,8  $\mu g/ml$  para o óleo essencial de pimenta de macaco nestas condições

Os parasitas tratados com benzonidazol por 24 horas a 4°C não apresentaram danos morfológicos, perda de motilidade ou taxas de morte consideráveis segundo observações ao microscópio invertido. Mas o meio de cultura continha inúmeras aglutinações de material cristalino, provavelmente formado por aglutinação das moléculas de benzonidazol, levando assim à sua perda de atividade. Assim, neste experimento utilizamos o corante violeta de genciana como controle, o qual apresentou um  $CI_{50}/24h$  estimado de 60,7  $\mu M$  ou 24,7  $mg/ml$  (Figura 4.7), um valor cerca de 6,500 vezes mais alto do que o obtido com o óleo essencial de pimenta de macaco (3,8  $\mu g/ml$ ).



**FIGURA 4.7** Curvas concentração x resposta demonstrando o efeito inibitório dos diferentes compostos sobre formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* a 4°C.

A: Óleo essencial de pimenta de macaco ( $\mu g/ml$ );

B: Violeta de genciana ( $\mu M$ )

Fa: Fração afetada = % de células mortas

#### 4.4 ÓLEO ESSENCIAL X AMASTIGOTAS INTRACELULARES

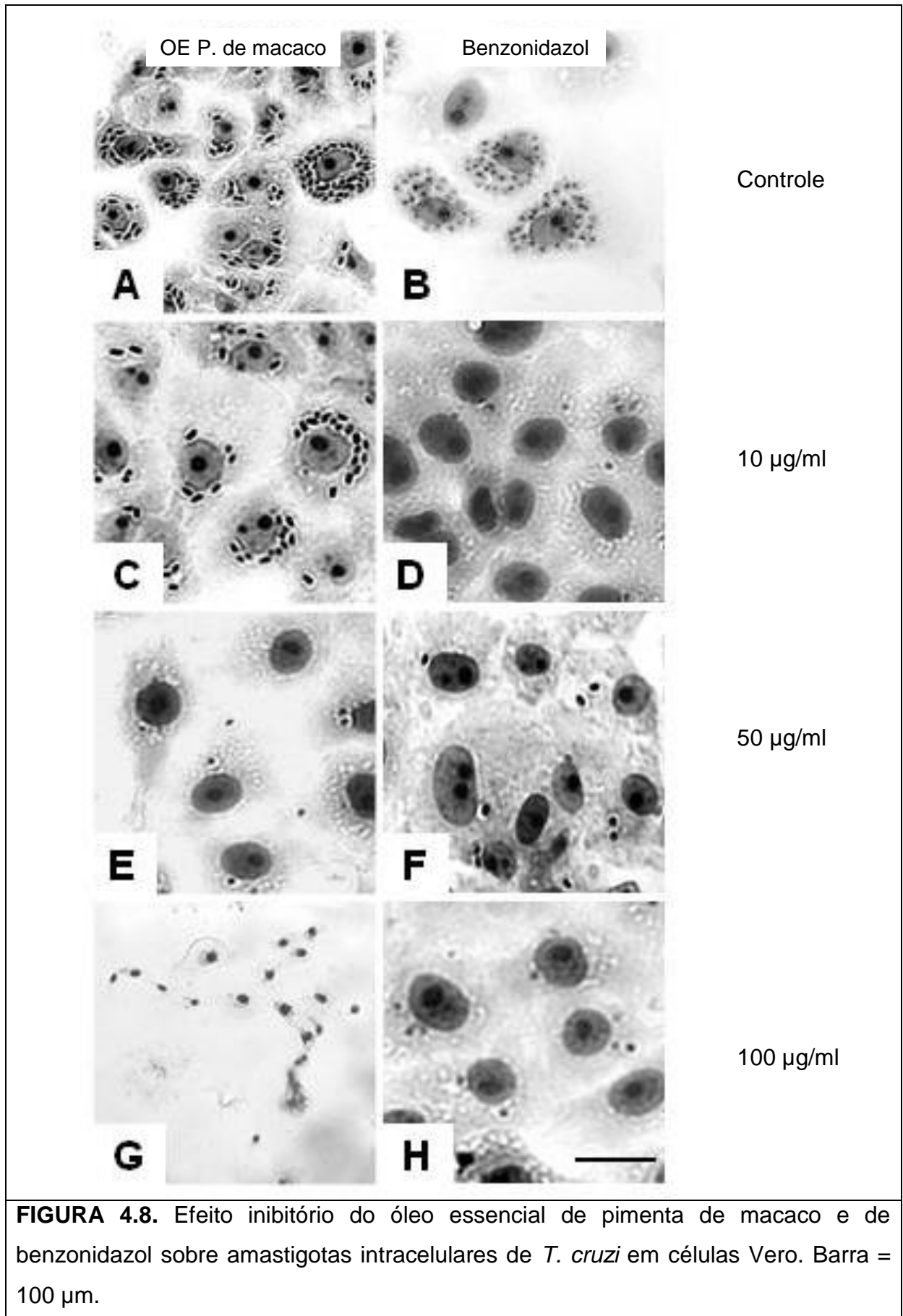
Células Vero foram infectadas com tripomastigotas e após 24h foram incubadas com diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta de macaco.

Após 24 h de tratamento o acompanhamento por microscópio invertido permitiu demonstrar efetividade na inibição de crescimento das formas amastigotas intracelulares em concentrações crescentes do óleo essencial (Figura 4.8).

Foram adquiridas aproximadamente 10 fotografias por poço para cada concentração testada e o contraste e brilho das imagens foram ajustados com auxílio do software ImageJ. Foram então analisadas aleatoriamente 2 a 3 imagens, contando-se no total 100 células por poço e o número total de amastigotas intracelulares.

Em ensaios com o óleo essencial de pimenta de macaco estimou-se que aproximadamente, 79,06% das células Vero estavam infectadas. Esta análise também permitiu calcular aproximadamente 7 amastigotas por célula. O índice de sobrevivência (Survival Index, SI) obtido como produto destas duas variáveis foi estabelecido como 100% e utilizado para comparação com as diferentes concentrações utilizadas. O mesmo procedimento foi utilizado para o benzonidazol (Tabela 4.2).

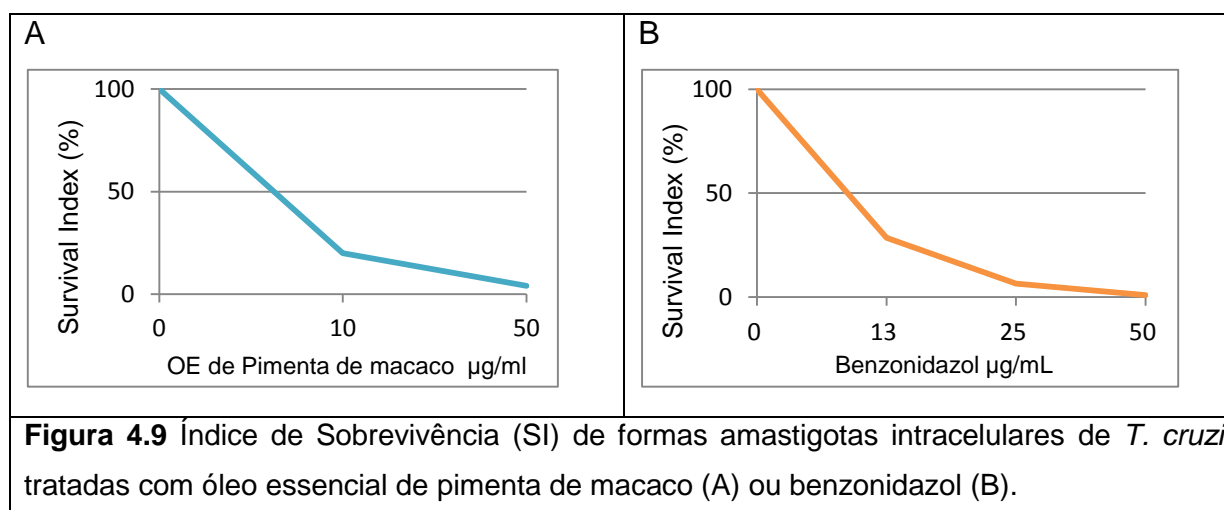
Cabe ressaltar que a concentração de 12,5 µg/ml do óleo essencial diminuiu em 71,4% o número de amastigotas intracelulares. Este comportamento foi similar ao obtido com 10 µg/ml benzonidazol (inibição de 80%), demonstrando que nesta concentração o óleo essencial é tão eficiente quanto a droga padrão. Entretanto, na concentração de 100 µg/ml de óleo essencial de pimenta de macaco as células hospedeiras sofreram considerável efeito citotóxico (Figura 4.8G), quando comparadas com o tratamento com benzonidazol (Figura 4.8H).



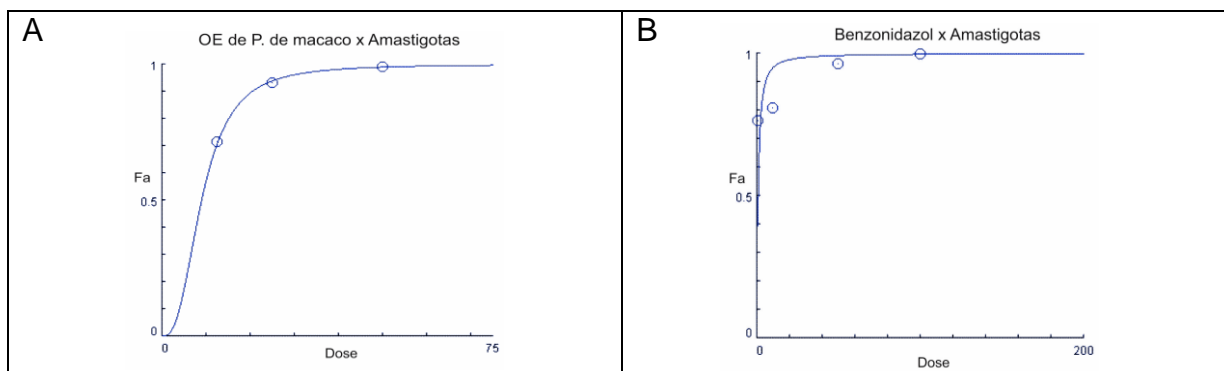
**Tabela 4.2.** Efeito do tratamento com óleo essencial (OE) de pimenta de macaco ou benzonidazol (Bz) sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células Vero.

Composto	Concentração (µg/ml)	% Células Infectadas	Nº Amastigotas por célula	Índice de Sobrevivência	Percentual de Infecção
OE de pimenta de macaco	Controle	79,06	7,11	562,7	100
	12,5	54,65	2,93	28,55	28,55
	50	32,51	0,39	12,88	6,55
	100	0	0	0	0
Bz	Controle	87,28	11,5	1005,6	100
	10	74,87	2,5	193,4	20
	50	0,373	0,95	0,35	4

Os gráficos que representam os Índices de Sobrevivência (Survival Index) de cada composto estão apresentados na Figura 4.9.



A partir dos gráficos de Índice de sobrevivência foi possível plotar os isobogramas e calcular o valor  $CI_{50}/24h$  para pimenta de macaco como 9 µg/ml. O benzonidazol foi bem mais eficiente, obtendo-se um valor de  $CI_{50}/24h$  igual a 0,8 µg/ml (Figura 4.10).



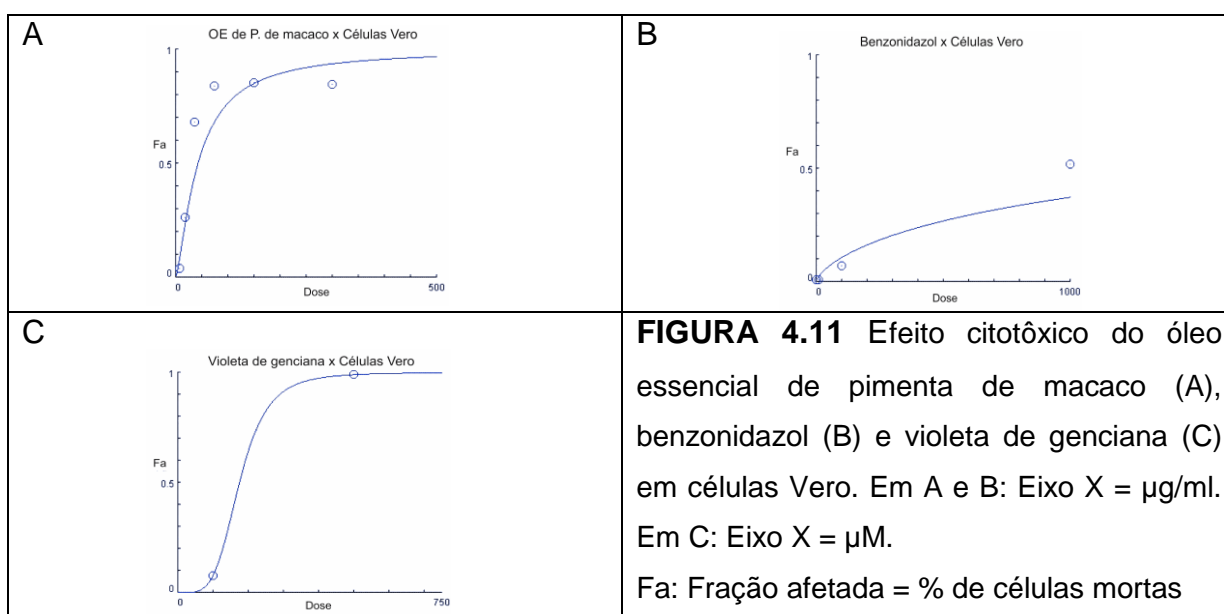
**Figura 4.10** Efeito inibitório do óleo essencial de pimenta de macaco (A) e benznidazol (B) sobre células Vero infectadas com *T. cruzi*. Eixo X =  $\mu\text{g/ml}$ .

Fa: Fração afetada = % de células mortas

## 4.5. CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO

### 4.5.1 Sobre células Vero

Bioensaios de citotoxicidade com o óleo essencial de pimenta de macaco e com benznidazol foram realizados por 24 horas. Os dados obtidos confirmaram que este óleo essencial é citotóxico para estas células, com valor de  $CC_{50}/24h = 42,8 \mu\text{g/ml}$ . Por outro lado, o benznidazol foi bem menos citotóxico, com  $CC_{50}/24h = 1 \text{ mg/ml}$ . Para violeta de genciana o resultado foi de  $CC_{50}/24h = 175,17 \mu\text{M}$  ou  $71,4 \text{ mg/ml}$  (Figura 4.11).



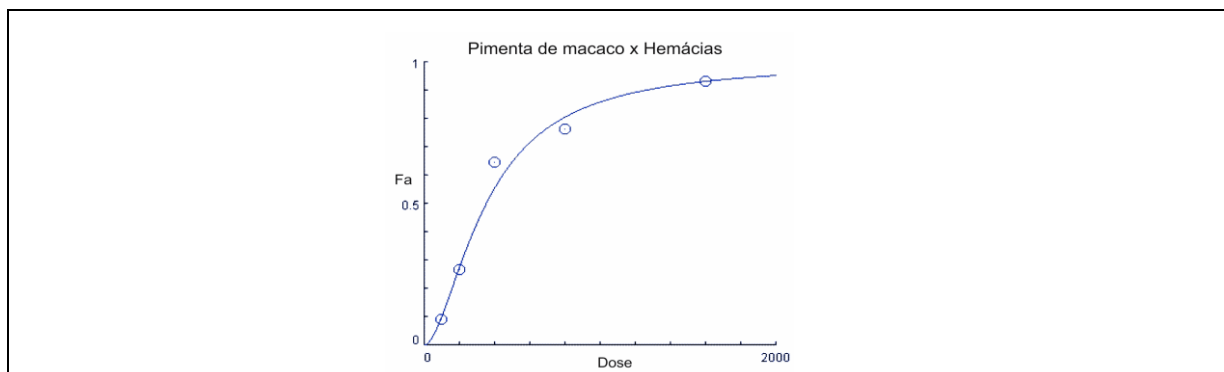
**FIGURA 4.11** Efeito citotóxico do óleo essencial de pimenta de macaco (A), benznidazol (B) e violeta de genciana (C) em células Vero. Em A e B: Eixo X =  $\mu\text{g/ml}$ . Em C: Eixo X =  $\mu\text{M}$ .

Fa: Fração afetada = % de células mortas

### 4.5.2 Sobre hemácias humanas

Para complementar os bioensaios realizados com formas tripomastigotas de cultura a  $4^{\circ}\text{C}$ , também realizamos testes de citotoxicidade em hemácias humanas,

simulando condição de armazenamento de bancos de sangue. Assim, soluções enriquecidas em hemácias humanas foram tratadas por 5 horas com diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta de macaco. Os resultados demonstraram que este óleo, com  $CC_{50}$  igual a 351,6  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4.12) foi aproximadamente 92 vezes menos citotóxico que a violeta de genciana (Tabela 4,3). Lembrando que em tripomastigotas de cultura a 4°C o valor  $CI_{50}/24\text{h}$  foi 3,8  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 4.12** Efeito citotóxico de óleo essencial de pimenta de macaco em hemácias humanas a 4°C. Fa: Fração afetada = % de células mortas. Eixo X =  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Cada composto aqui testado apresentou um índice de seletividade (IS) específico para cada forma evolutiva de *T. cruzi*. O índice de seletividade ( $CC_{50}$  cél. mamífera /  $CI_{50}$  parasita) indica quantas vezes um composto é mais seletivo contra o parasita do que contra a célula hospedeira. Assim, quanto mais seletivo é um composto (isto é, quanto maior o IS), menor é a sua citotoxicidade.

Em nossos ensaios calculamos o índice de seletividade dos óleos essenciais de pimenta de macaco e pimenta longa e comparamos com a droga padrão benzonidazol. Como em nossos ensaios com tripomastigotas de cultura a 4°C os parasitas não apresentaram inibição considerável pelo benzonidazol (pela inativação do composto a esta temperatura), para estas formas o IS foi calculado com o corante violeta de genciana.

Bioensaios iniciais com o óleo essencial de pimenta longa demonstraram sua baixa citotoxicidade contra células Vero, mas também sua baixa citotoxicidade contra o *T. cruzi*. Por outro lado, o óleo essencial de pimenta de macaco apresentou melhor índice de seletividade (IS) contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Com base nestes resultados, os ensaios com o óleo de pimenta longa foram descontinuados.



Embora nenhum dos óleos essenciais tenha demonstrado melhor IS do que o benzonidazol quando testados em células Vero, o óleo essencial de pimenta de macaco apresentou o melhor IS quando testado contra formas tripomastigotas a 4°C (Tabela 4.3), demonstrando assim que este composto é altamente seletivo contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

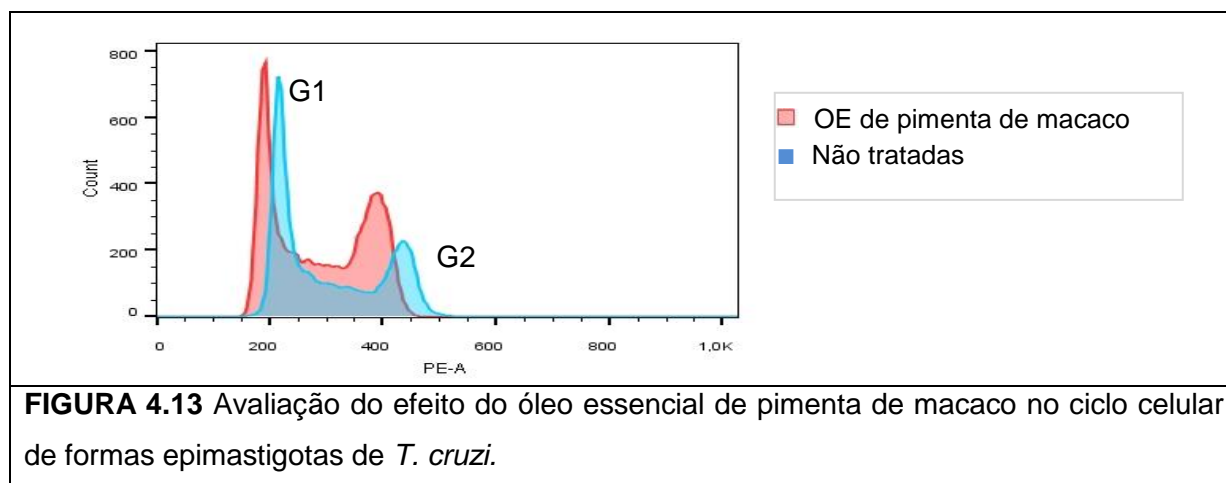
**Tabela 4.3.** Índices de seletividade dos óleos essenciais (OE) de pimenta longa e pimenta de macaco sobre diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, comparando com as drogas controle benzonidazol e violeta de genciana.

Composto	Forma evolutiva de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Inibição CI <sub>50</sub> /24h (µg/ml)	Citotoxicidade CC <sub>50</sub> /24h (µg/ml)	Índice de Seletividade
OE pimenta longa ( <i>Piper hispidinervum</i> )	Epimastigota 28°C	156,19	551,9 (células Vero)	3,5
	Tripo de cultura 28°C	> 100		NC
	Tripo metacíclico	118,39		4,6
OE pimenta de macaco ( <i>Piper aduncum</i> )	Epimastigota 28°C	84,74	42,8 (células Vero)	1,97
	Tripo de cultura 28°C	2,8		15,29
	Tripo de cultura 4°C	3,8		11,26
	Tripo metacíclico 28°C	12,1		3,54
	Tripo de cultura 4°C	3,8	351,6 (hemácias)	92,52
Benzonidazol	Epimastigotas 28°C	14,6	1021 (células Vero)	69,9
	Tripo de cultura 28°C	16,1		63,4
Violeta de genciana	Tripo de cultura 4°C	24700	71400 (Células Vero)	2,9

## 4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

### 4.7.1 Ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi*

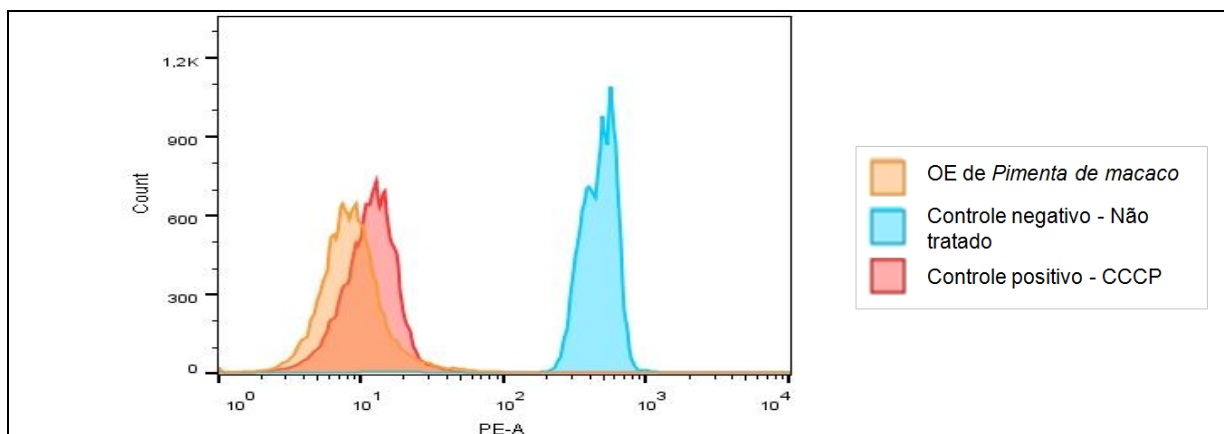
Uma vez conhecida a ação seletiva do óleo essencial de pimenta de macaco passamos a analisar o possível mecanismo de ação deste óleo nos parasitas. Marcação de epimastigotas com iodeto de propídeo após o tratamento com o composto a 28°C permitiu demonstrar que tratamento com o valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta de macaco não afetou significativamente a quantidade de DNA durante as fases G1 e G2 no ciclo de replicação celular destas formas evolutivas (Figura 4.13).



### 4.7.2 Potencial de membrana mitocondrial em epimastigotas de *T. cruzi*

Descartando a possibilidade de que o mecanismo inicial contra os parasitas fosse contra a duplicação do DNA, outro possível alvo foi estudado. Neste caso, formas epimastigotas de *T. cruzi* mantidas a 28°C durante 24 horas na presença do valor  $CI_{50}/24h$  do óleo essencial de pimenta de macaco foram incubadas com Rhodamina 123.

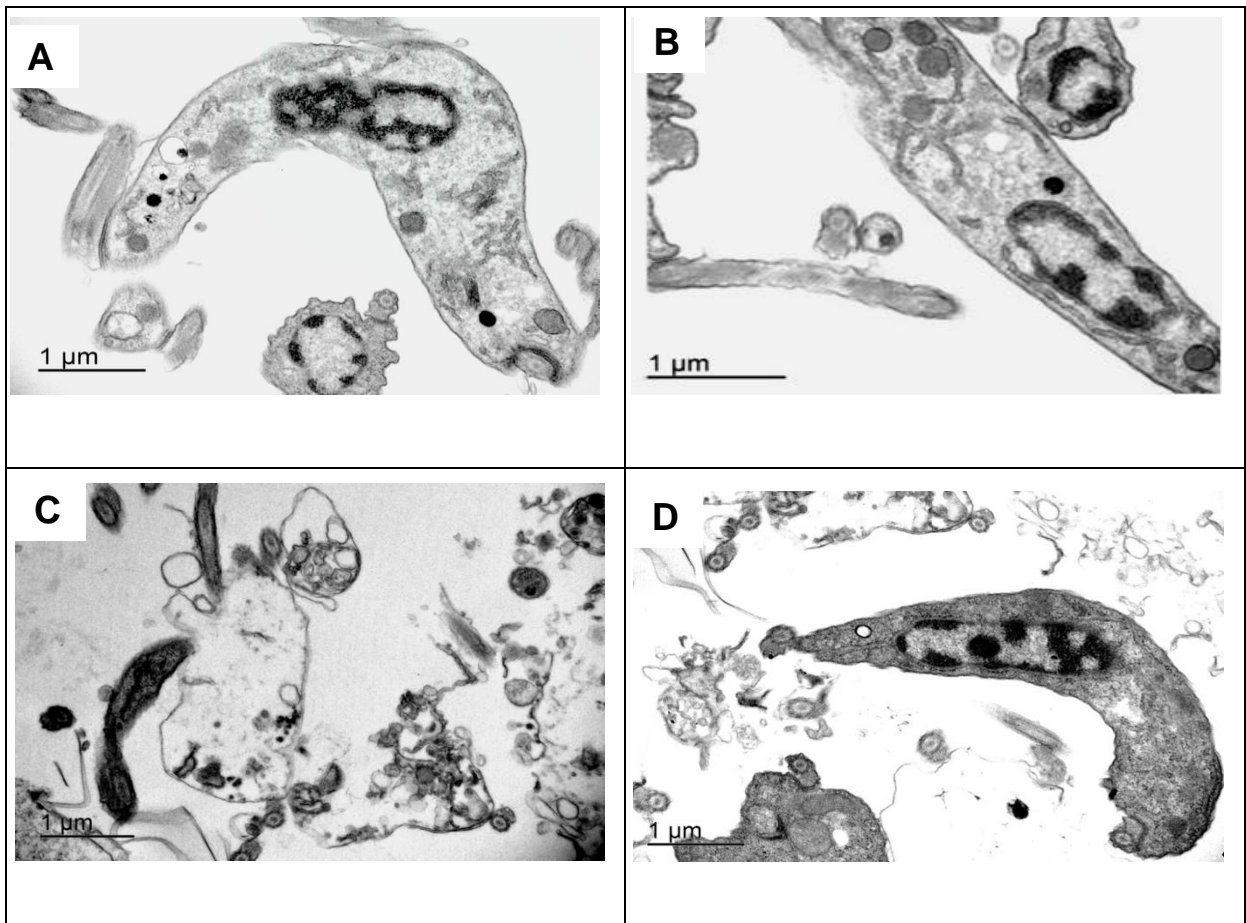
Este ensaio permitiu demonstrar que este óleo afetou o potencial de membrana em 100% das formas epimastigotas testadas (Figura 4.14), sendo esta portanto uma possível via de ação deste composto.



**Figura 4.14** Avaliação do efeito do óleo essencial de pimenta de macaco no potencial de membrana em formas epimastigotas de *T. cruzi*. O gráfico mostra a medida de intensidade de fluorescência das amosras após os diferentes tratamentos.

#### 4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para corroborar o resultado da citometria de fluxo, que indicava ação da pimenta de macaco sobre a mitocôndria, formas tripomastigotas de cultura foram incubadas por 24h com o valor  $CI_{50}/24h$  do óleo de pimenta de macaco (3,8  $\mu g/ml$ ) e então processadas para exame por microscopia eletrônica de transmissão. Os dados obtidos demonstraram que o tratamento com este óleo essencial afetou consideravelmente a ultra-estrutura dos parasitas, observando-se lise total das células (Figura 4.15).



**FIGURA 4.15** Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão do efeito do tratamento com óleo essencial de pimenta de macaco em formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi*. A,B: controle. C,D: células tratadas com  $CI_{50}/24h$  ( $3,8 \mu g/ml$ ) do óleo essencial. Note em D uma célula pouco afetada (devido ao uso de concentração  $CI_{50}$ ).

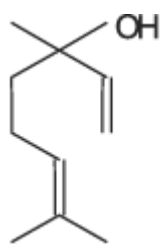
#### 4.9 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO

Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG-EM) permitiu obter a composição química destes compostos (Tabelas 4.4 e 4.5). Os principais constituintes do óleo essencial de pimenta de macaco aqui testados são nerolidol (25%) e linalol (13%).

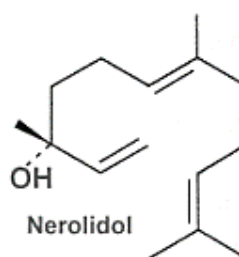
Já para a pimenta longa, o principal constituinte é o safrol (79,56%) quando a análise química é feita com OE recém coletado. Avaliação deste OE após 18 meses de armazenamento a  $4^{\circ}C$  demonstrou uma redução de cerca de 21% na quantidade de safrol (62,63%). Em nossos experimentos utilizamos OE recém coletado.

TABELA 4.4. Análise da composição química do óleo essencial de pimenta de macaco por CG/EM

Constituinte	Tempo de retenção	Área	% Área
2- cicloexen-1-ol	25,482	3092676	4,44
Alfa-copaeno	23,649	1169184	1,68
Alfa-cubebeno	24,16	884691	1,27
Alfa-epi-muurolol	34,253	1893537	2,72
Alfa-muurolol (cadinol)	34,43	975559	1,4
Alfa-ocimeno	9,359	1807180	2,6
Alfa-pineno	6,198	680357	0,98
Beta €-farneseno	26,947	2509366	3,61
Beta –pineno	7,502	988059	1,42
Beta-chamigreno	28,587	2788502	4,01
Delta-cadinemo	29,501	854201	1,23
Gama-cadineno	29,368	2439762	3,51
Gama-terpineno	9,757	3237239	4,65
Germacrene D	27,989	2804545	4,03
Linalol	11,826	9336350	13,42
Nerolidol	31,126	1,8E+07	25,22
Oxido B-alfa-bisabolol	34,751	1867181	2,68
Oxido de cariofileno	31,98	1248458	1,79
Safrol	19,945	640257	0,92
Spatulenol	31,775	4374871	6,29
Turmerona (4-heptanona)	32,49	1437434	2,07
Viridiflorol	33,043	1117593	1,61



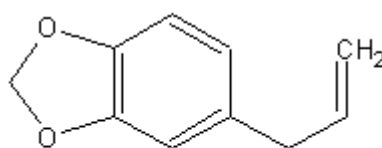
Linalol



Nerolidol

TABELA 4.5. Análise da composição química do óleo essencial de pimenta longa por por CG/EM.

Constituinte	Tempo de retenção	% Área recém colhido	% Área após 18 meses
Alfa pineno	6,19	0,54	0,57
Mirceno	7,746	0,36	0,48
Alfa careno	8,372	0,23	0,19
Beta careno	8,478	1,08	1,26
Alfa terpineno	8,736	0,33	0,25
Limoneno	9,178	0,48	0,56
1,3,6-Octatrieno	9,344	0,47	0,44
Beta ocimeno	9,743	1,35	1,11
Gama terpineno	10,238	0,4	0,3
Terpinoleno	11,313	14,13	11,68
Safrol	20,022	79,56	62,63
Biciclogermacreno	28,577	1,07	1,08



Safrol

Uma vez determinados os principais constituintes do óleo essencial de pimenta de macaco, os dois principais constituintes (nerolidol e linalol) foram testados contra formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*.

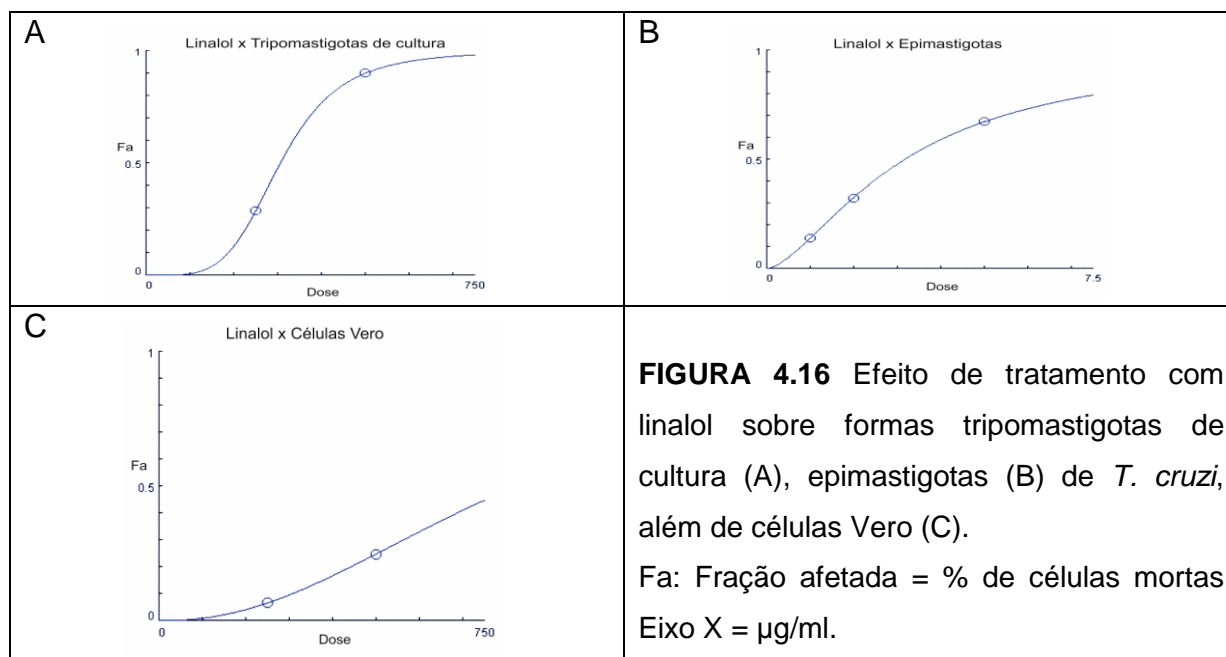
#### 4.10 ATIVIDADE DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA DE MACACO CONTRA *T. CRUZI*

##### 4.10.1. Linalol

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* mantidas a 4°C foram incubadas por 24h com linalol em concentrações de 250 ng/ml a 1 µg/ml. Este bioensaio demonstrou a alta atividade tripanocida do linalol, com CI<sub>50</sub>/24h de 306 ng/ml. Quando comparado com o benzonidazol, este composto se demonstrou ser cerca de 52 vezes mais eficiente.

Quando este composto também foi testado em formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentou um valor de  $CI_{50}/24h$  igual a 3,16  $\mu g/ml$ . Este coeficiente inibitório também foi melhor do que o obtido com benzonidazol contra estas formas evolutivas, sendo o linalol aproximadamente 5 vezes mais eficiente.

O teste de citotoxicidade de linalol em células Vero permitiu demonstrar que o linalol é citotóxico a um  $CC_{50}/24h$  de 823,6  $ng/ml$ . Estes resultados permitiram calcular o índice de seletividade (IS) para o linalol como sendo de 2,69 (Figura 4.16).



#### 4.10.2 Nerolidol

Formas tripomastigotas de cultura mantidas a 4°C foram incubadas por 24h com concentrações de 250  $ng/ml$  a 1  $\mu g/ml$  de nerolidol. Entretanto, nem mesmo a máxima concentração utilizada afetou a viabilidade dos parasitas, em avaliações por microscópio invertido e leitura no ELISA a 550 nm (dados não mostrados).

Células Vero testadas nas mesmas condições e concentrações também foram avaliadas no microscópio invertido. Após 24 horas de incubação com nerolidol todos os poços (inclusive os com máxima concentração de 1  $\mu g/ml$ ) apresentaram completa integridade do tapete celular, quando comparados com poços não tratados. Assim, embora nerolidol seja o constituinte majoritário (25%) do óleo essencial de pimenta de macaco utilizado nesta disseertação, nossos resultados demonstraram que o efeito tripanocida deste óleo essencial é devido ao linalol.

## 5. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais de origem vegetal. Estes compostos - líquidos, voláteis e lípidos - são sintetizados por vários órgãos de plantas. Seu uso como microbicida é cada dia mais estudado, devido às suas propriedades microbiológicas utilizadas primariamente como defesa para garantir a sobrevivência das plantas. Os OEs possuem propriedades antifúngicas, parasitocidas, antibacterianas, viricidas, inseticidas e contra herbivoria (Bakkali et al., 2008). Assim, bioensaios de OEs contra tripanosomatídeos patogênicos (*Leishmania* spp. *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*) podem levar à obtenção de compostos efetivos contra estes protozoários, ou que melhorem a qualidade de vida dos pacientes infectados. Entretanto, estas alternativas ainda são pouco estudadas. Em consequência de resultados promissores obtidos com OEs de *Piper auritum* contra *L. major*, *mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani* (Monzote et al., 2010) e de *Piper cubeba* contra o *T. cruzi* (Esperandim et al., 2013), resolvemos nesta dissertação aprofundar os estudos com plantas da família Piperaceae e apresentamos resultados do efeito tripanocida dos OEs de *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Piper hispidinervum* (pimenta longa) contra diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*.

O OE de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) utilizado nesta dissertação tem safrol como constituinte majoritário (79,56%). Este dado está de acordo com o obtido por outros autores (Bergo et al., 1999; Miranda 2002; Zacaroni et al., 2009; Cremasco et al., 2012; Pacheco et al., 2013). É interessante ressaltar que armazenamento de OE a 4°C durante tempo prolongado (18 meses) resultou em uma diminuição considerável (21%) da quantidade deste constituinte majoritário. Portanto, experimentos devem ser feitos apenas com OE recém coletados.

Embora não tenha apresentado citotoxicidade contra Vero, o OE de pimenta longa não apresentou coeficientes de inibição (CI<sub>50</sub>) satisfatórios contra *T. cruzi* (formas epimastigotas, tripomastigotas de cultura e tripomastigotas metacíclicas) quando comparado com a droga padrão (benzonidazol) ou com o OE de pimenta de macaco. Suas propriedades biocidas são pouco eficientes, quando comparado com o OE de pimenta de macaco já tinham sido demonstradas anteriormente em testes como larvicidas (Fazolin et al., 2006) ou em testes contra o gorgulho de milho *Sitophilus zeamais* (Estrela et al., 2006).



Uso combinado de pimenta longa com cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) também não foi eficiente contra esta praga (Cruz et al., 2014). Os nossos dados foram semelhantes, pois combinação de pimenta longa e benzonidazol não resultou em uma mistura mais eficaz contra o *T. cruzi*.

O óleo essencial de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) apresentou resultados satisfatórios contra as formas epimastigotas, tripomastigotas de cultura e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* testadas nesta dissertação. Quando incubado contra formas tripomastigotas de cultura a 4°C (mesma condição térmica de armazenamento de bolsas de sangue) este OE apresentou um excelente índice de seletividade (IS) de 92,52. Considerando-se que a primeira barreira para postular que um composto é candidato promissor para testes *in vivo* é que este deve apresentar IS maior que 50 (Romanha et al., 2010), podemos considerar o OE de pimenta de macaco (ou algum de seus constituintes) como uma alternativa promissora para mais ensaios com sangue/células sanguíneas, em condições térmicas de armazenamento de bolsas sanguíneas, visando a obtenção de um composto eficaz para eliminar a presença de *T. cruzi* em bancos de sangue.

Em nossos testes com tripomastigotas a 4°C utilizamos violeta de genciana (Docampo e Moreno, 1990) como droga de referência, uma vez que o benzonidazol (BZ), seja após 24h ou 72h, não apresentou nenhum efeito contra o parasita. Além disso, foram observadas partículas cristalinas nos poços mantidos a 4°C com BZ. É provável que a baixa temperatura tenha inativado o BZ, embora as razões disto sejam desconhecidas. Violeta de genciana foi a droga de escolha em nossos testes a 4°C por ser a utilizada no controle de *T. cruzi* em bancos de sangue (Ramirez et al., 1995).

Uma alternativa testada nesta dissertação para melhorar o efeito do OE de pimenta de macaco foi a combinação com benzonidazol ou a tripla combinação com benzonidazol + OE de pimenta longa. Embora os resultados tenham sido insatisfatórios, a combinação de fármacos para diminuir a resistência dos parasitas não deve ser descartada (Rodrigues, 2009), assim como a procura de combinações que diminuam os efeitos colaterais nos pacientes chagásicos (Araújo et al., 2000).

Os controles positivos nesta dissertação foram feitos com benzonidazol, em epimastigotas (28°C;  $CI_{50}/24h=14 \mu g/ml$ ), tripomastigotas (28°C;  $CI_{50}/24h=16,4 \mu g/ml$ ) e amastigotas (37°C;  $CI_{50}/24h=0,86 \mu g/ml$ ). Estes resultados não foram os

mesmos dos obtidos com outros pesquisadores (Rodrigues et al., 2014; Sandes et al., 2014; Franklin et al., 2013; Hamedt et al., 2013). Esta falta de consenso nos testes contra o *T. cruzi*, devido a diferentes condições de teste e diferentes cepas do parasita usadas, afetam o avanço nas pesquisas para a obtenção de drogas alternativas. Os parâmetros não padronizados são os diferentes tempos de incubação, diferentes concentrações de suplemento nos meios de cultura e/ou a variabilidade genética das diferentes cepas e clones de *T. cruzi* utilizadas em cada experimento (Andrade et al., 1985).

A citometria de fluxo permitiu avaliar o ciclo celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com OE de pimenta de macaco. Nossos resultados com o marcador lodeto de Propídio demonstraram que o ciclo celular destas formas não é afetado após incubação por 24 horas com este OE. Embora estas formas não sejam de importância médica, são mais fáceis de manter em cultivo (do que amastigotas) e permitem obter análises e informações biológicas comparativas, economizando tempo e dinheiro. Os dados obtidos neste ensaio (não inibição do processo de divisão celular de epimastigotas) sugerem que testes com amastigotas devem ser levados em consideração quando formas epimastigotas forem afetadas.

Avaliação do potencial de membrana da mitocôndria de formas epimastigotas por meio de citometria de fluxo utilizando Rhodamina 123 (marcador de fosfatidilserina) e CCCP como controle positivo (como inibidor do potencial de membrana) demonstrou que o OE de pimenta de macaco afetou em 100% as células tratadas. Como as formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* não apresentam exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana em condições normais (DaMatta et al., 2006), a marcação com Rhodamina 123 demonstra ruptura da membrana plasmática ou o início de um processo de apoptose. Este ensaio não foi realizado com formas tripomastigotas de cultura porque estas expõem fosfatidilserina na membrana plasmática em condições normais (DaMatta et al., 2006). Este experimento infelizmente não permitiu demonstrar se o OE de pimenta de macaco afeta diretamente a mitocôndria levando à morte do parasita ou se o efeito na mitocôndria é indireto como consequência da morte do parasita. Porém experimentos adicionais com lodeto de Propídeo e anexina V mediante de citometria d fluxo poderiam responder esta questão.

Análise morfológica de formas tripomastigotas de cultura incubadas com 2,87 µg/ml de OE de pimenta de macaco (CI<sub>50</sub>/24h) foi realizada por microscopia

eletrônica de transmissão. Análise das micrografias demonstrou parasitas com suas membranas consideravelmente afetadas, com conteúdo citoplasmático destruído e indefinível. Isto dificultou a identificação de rotas iniciais do mecanismo de ação do OE. Porém, é possível afirmar que este OE destruiu as membranas celulares, o que complementou a análise de citometria de fluxo com Rhodamina 123. Por outro lado, observamos que aproximadamente metade dos parasitas analisados estava sem danos morfológicos evidentes, em consequência de termos usado neste experimento a concentração  $CI_{50}/24h$  (isto é, que afeta metade da população em um tratamento por 24h).

Estudos recentes com OE de *Croton cajucara* (rico em linalol) contra *L. amazonensis* mostraram danos ultra-estruturais similares após tratamento a uma concentração  $CI_{50}/30min$  de 15 ng/ml (Rosa et al., 2003), como inchaço mitocondrial, rompimento de membranas, alteração da cromatina nuclear e do cinetoplasto. Este dado sugere que o OE de pimenta de macaco (também rico em linalol) possa afetar o *T. cruzi* em tratamentos por menor tempo. Assim, estudos para avaliar o efeito do OE de *P. aduncum* contra *T. cruzi* relacionados à integridade, potencial de membrana e sequência de danos morfológicos em menores períodos de tempo não devem ser descartados.

O OE de pimenta de macaco utilizado nesta dissertação apresentou como principais constituintes o nerolidol (25%) e o linalol (13,42%). Análise por CG-EM do OE desta pimenta em outros estudos mostrou que este OE pode apresentar quatro constituintes majoritários: a) dilapiol com 64,4% (Souto et al., 2012) ou 79,9-86,9% (Almeida et al., 2009), b) nerolidol com 79,2-82,5% (Oliveira et al., 2006), c) cineol com 54% (Oliveira et al., 2012), d) linalol com 31-41% (Navickiene et al., 2006). Uma explicação para esta variação na composição química pode ser a realização da coleta das plantas em diferentes regiões, expostas a diferentes fatores que podem alterar os compostos majoritários, como por exemplo umidade, tipo de solo, exposição solar ou frequência de chuvas. Assim para evitar problemas com a variabilidade na composição dos óleos essenciais é necessário que seja utilizado material coletado sempre do mesmo local.

Nesta dissertação avaliamos o efeito de dois dos constituintes majoritários da pimenta de macaco, nerolidol e linalol, procurando aquele que poderia ser o responsável pelas desordens estruturais, uma vez que o efeito biocida dos OEs pode ser devido ao composto majoritário de cada óleo. Os nossos resultados

demonstraram que nem sempre o composto majoritário é o responsável pela ação tripanocida. Isto foi demonstrado quando ensaios de formas tripomastigotas de *T. cruzi* a 4°C com linalol (13,43% do OE) apresentaram valor de  $CI_{50}/24h$  de 360 ng/ml, enquanto o nerolidol não conseguiu afetar a metade dos parasitas nem quando a concentração foi aumentada a até 1 µg/ml (aproximadamente 3 vezes a utilizada com linalol). Interessantemente, incubação de linalol com tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) resultou em um valor de  $CI_{50}/24h$  de 264 µg/ml (Santoro et al., 2007b), valor superior ao que observamos.

Nossos testes de citotoxicidade de nerolidol e linalol com células Vero (com auxílio de microscopia ótica e avaliação por MTT) mostraram tapete celular íntegro, sem alterações ou efeitos tóxicos, em testes com nerolidol a 1 µg/ml. Porém o linalol apresentou coeficiente de citotoxicidade  $CC_{50}/24$  de 823,6 ng/ml. Isto permitiu demonstrar que nem sempre o constituinte majoritário é quem apresenta a ação citotóxica em células de mamíferos, como sugerido em outros estudos (Almeida et al., 2009; Souto et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Liu et al., 2014).

O linalol ( $CI_{50}/24h = 306$  ng/ml) também demonstrou ser muito mais eficiente (68.611x mais) contra formas tripomastigotas de cultura sob as mesmas condições térmicas de armazenamento de bolsas de sangue (4°C) do que a droga comumente utilizada para o tratamento das bolsas, a violeta de genciana (24,71 mg/ml ou 60,7 µM). Assim, o linalol é um composto promissor para estudos mais aprofundados sobre o tratamento de bolsas de sangue. Segundo Da Silva e colaboradores (2011), o  $CI_{50}$  de violeta de genciana para um tratamento de 72 horas é de 30,6 µM (12,48 mg/ml). Mesmo assim, estas concentrações são muito altas, apresentando citotoxicidade para os pacientes que recebem as transfusões de sangue (Docampo e Moreno, 1985). Esta concentração pode ser diminuída quando se faz uma combinação de violeta de genciana com tratamento de fotoradiação com uma lâmpada de luz visível (75W), sendo necessários apenas 250 µg/ml (0,61 µM) para a lise total dos parasitas em 30 minutos (Ramirez et al., 1995).

A maior parte dos testes desta dissertação foi feita por 24 horas, com o objetivo de controlar (dentro do possível) os parâmetros de cultura adequados e normais para o *T. cruzi*. Acreditamos que em testes por mais de 24 horas (como por exemplo, 48, 72 ou 96 horas), em placas de 24 poços, os parasitas ficarão sem nutrientes suficientes e e meio com alta quantidade residual de toxinas liberadas pela morte de parasitas em função da lise promovida pelo tratamento com as

drogas. Assim, os parasitas no teste estariam sendo afetados pelo incremento de radicais livres e demais fatores decorrentes da morte das células testadas. Cabe ressaltar que os parasitas não estão nas condições normais que encontrariam dentro de um hospedeiro, o qual permite controlar os refugos de toxinas (mediante a circulação sanguínea). Além disto, existem aqueles parasitas que conseguem sobreviver à droga (por exemplo, benzonidazol) ficando resistentes ao fármaco.

Embora os modelos *in vitro* não apresentem iguais condições às encontradas *in vivo*, o screening inicial de drogas em testes *in vitro* com tripomastigotas (sanguíneas e de cultura) e o cálculo do Índice de Seletividade (ideal: maior que 50) são as opções mais adequadas para postular um composto como promissor (Romanha et al., 2010).

No 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) se definiu o benzonidazol ( $CI_{50}/96h = 3,8 \mu M$  na cepa Tulahuen de *T. cruzi*) como a droga de referência para se determinar se um novo composto pode ser considerado como candidato ao combate ao *T. cruzi*, o qual também deve apresentar um índice de seletividade maior que 50 (Romanha et al., 2010). Em nossa dissertação utilizamos no entanto a clone Dm28c de *T. cruzi*, pois este clone permite a obtenção de formas tripomastigotas de cultura mais rápida e facilmente quando comparado com a cepa Tulahen

Cabe ressaltar que as pimentas aqui estudadas fazem parte da lista de espécies com prioridades de conservação (Vieira e Silva, 2002). Já se demonstrou que as melhores condições térmicas de armazenamento para estas duas pimentas são a 20°C durante seis meses sem perda de capacidade regenerativa (Loureiro da Silva e Scherwinski-Pereira, 2011). Estes dados sugerem que estudos posteriores com estas pimentas devem ser controlados não somente nos bioensaios, mas também com as condições de armazenamento das plantas até o momento da extração do OE.

Finalizando, estudos adicionais com pimenta de macaco e/ou seus constituintes majoritários poderão fornecer dados sobre (a) a combinação de constituintes principais (incluindo combinações com benzonidazol) com menor efeito tóxicos contra células de mamíferas, (b) obtenção de derivados mais ativos de

linalol, e (c) tempos mais curtos de testes para avaliar possíveis rotas de início do mecanismo de ação do OE/linalol.

## 6. CONCLUSÕES

- O óleo essencial (OE) de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) não foi efetivo contra diferentes formas evolutivas (epimastigotas e tripomastigotas) de *T. cruzi*.
- O OE de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) foi eficaz contra o *T. cruzi*, sendo mais ativo contra as formas tripomastigotas de cultura do que contra epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas.
- O OE de pimenta de macaco apresentou um coeficiente de inibição ( $CI_{50}/24h$ ) contra formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* melhor do que a droga de referência benzonidazol.
- O OE de pimenta de macaco foi aproximadamente 92 vezes mais seletivo ( $IS=92,52$ ) a 4°C contra formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* do que contra hemácias de sangue humano, sugerindo que este OE seja uma alternativa promissora para o tratamento de sangue armazenado nas mesmas condições de bolsas de sangue.
- O OE de pimenta de macaco não afeta consideravelmente o processo de divisão celular das formas epimastigotas, como demonstrado por citometria de fluxo.
- O OE de pimenta de macaco afeta consideravelmente o potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas, como demonstrado por citometria de fluxo.
- O OE de pimenta de macaco produz danos ultra-estruturais consideráveis em formas tripomastigotas de cultura após incubação por 24 horas, sugerindo uma ação nociva deste OE a um tempo muito menor.
- Nerolidol e linalol são os constituintes principais do OE de pimenta de macaco, representando 25% e 13,42% da composição química deste OE. Safrol é o componente majoritário do OE de pimenta longa, constituindo 62% do total deste OE.

- Testes de citotoxicidade com células Vero evidenciaram que o linalol é mais tóxico do que o nerolidol, demonstrando que nem sempre o constituinte majoritário de um OE é o constituinte mais citotóxico.
- O efeito tripanocida do linalol foi maior do que o do nerolidol contra formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*. Este composto foi 47 vezes mais eficiente do que a droga padrão benzonidazol.
- Linalol também demonstrou ser altamente eficaz quando testado sob as mesmas condições térmicas de armazenamento de bolsas de sangue. Este composto foi 168,6 vezes mais eficaz do que violeta de genciana, sendo assim uma alternativa a ser investigada para o tratamento de as bolsas de sangue.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 804 pgs, 2007.

Azeredo CM, Soares MJ. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. Rev Bras Farmacogn, 23:763-768, 2013.

Azeredo CM, Santos TG, Maia BH, Soares MJ. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. BMC Complement Altern Med, 14:309, 2014.

Afoulous S, Ferhout H, Raelison EG, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, Bouajila J. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. Food Chem Toxicol, 56:352-362, 2013.

Alviano DS, Barreto AI, Dias FA, Rodrigues IA, Rosa MS, Alviano CS, Soares RM. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. Front Microbiol, 3:283, 2012.

Almeida RR, Souto RN, Bastos CN, Silva MH, Maia JG. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. Chem Biodivers, 6:1427-1434, 2009.

Andrade SG, Netto MB. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na Infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. Rev Soc Bras Med Trop, 18:143–154, 1985.

Araújo MJ, Câmara CA, Born FS, Moraes MM, Badji CA. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. Exp Appl Acarol, 57:139-55, 2012.

Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*, 45:819-824, 2000.

Armstrong JS. Mitochondria: A target for cancer therapy. *Br J Pharmacol*. 147:239-48, 2006.

Assal A, Corbi C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: Un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. *Transfus Clin Biol*, 18:286–291, 2011.

Bakkali L, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem Toxicol*, 46:446–75, 2008.

Bern, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*, 364: 2527–2534, 2011.

Bianco EM, Oliveira SQ, Rigotto C, Tonini ML, Rosa Guimarães T, Bittencourt F, Gouvêa LP, Aresi C, De Almeida MT, Moritz MI, Martins CD, Scherner F, Carraro JL, Horta PA, Reginatto FH, Steindel M, Simões CM, Schenkel EP. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules*, 18:5761-78, 2013.

Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd R, Brander C. Transfusion-transmitted infections. *J Transl Med*. 5: 25, 2007.

Bonaldo MC, Souto-Pradrón T, De Souza, W, Goldenberg S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*, 106:1349-1358, 1988.

Bonney K, Engman D. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many. *Curr Mol Med*, 8:510 – 518, 2008.

Borges AR, Aires JR, Higino TM, de Medeiros Md, Citó AM, Lopes JA, de Figueiredo RC. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp Parasitol*, 132:123–128, 2012.

Buckner FS, Urbina JA. Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2:236-242, 2012

Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94:223-253, 2004.

Cardoso J, Soares MJ. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 1026-1032, 2010.

Castro JA, Mecca MM, Bartel L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*, 25:471–479, 2006.

Chauret DC, Bernard CB, Arnason JT, Durst T, Krishnamurti HG, Sanchez-Vindas P, Moreno N, Roman LS, Poveda L. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J Nat Prod*, 4:152-155, 1996.

Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MN, Goldenberg S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 83:123-133, 1988.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*, 16:315-327, 1985.

Costa EV, Dutra LM, Nogueira PC, Moraes VR, Salvador MJ, Ribeiro LH, Gadelha FR. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Nat Prod Commun*, 7:265-6, 2012.

Coura, JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz, 97:3–24, 2002.

Coura JR. Chagas disease: What is known and what is needed. A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz, 102:113-122, 2007.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1:31-40, 2009.

Cremasco MA, Pina NB. Synthesis of piperonal from essential oil of long-pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.). Acta Amaz, 42:2, 2012.

Cruz GS, Wanderley-Teixeira V, Oliveira JV, Correia AA, Breda MO, Alves TJ, Cunha FM, Teixeira AA, Dutra KA, Navarro DM. Bioactivity of *Piper hispidinervium* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bta on the biology and immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol, 107:144-53, 2014.

DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhães L, Goldenberg S, De Souza W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. FEMS Microbiol Letters, 266:29–33, 2007.

Da Silva CF, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MN. In vitro trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. J Antimicrob Chemother, 66:1295-1297, 2011.

Dias C, Dessoy MA, Silva JJ, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quím Nova, 32:2444-2457, 2009.

Diniz Lde F, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. PLoS Negl Trop Dis, 8:e2367, 2013

Docampo R, Moreno SNJ. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemo-therapy and chemoprophylaxis of American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biochem Toxicol*, 7:159-204, 1985.

Docampo R, Moreno SN. The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metab Ver*, 22:161-178, 1990.

Escobar P, Milena Leal S, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* ssp. L essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105:184-90, 2010.

Esperandim VR, da Silva Ferreira D, Sousa Rezende KC, Magalhães LG, Medeiros Souza J, Pauletti PM, Januário AH, da Silva de Laurentz R, Bastos JK, Símaro GV, Cunha WR, Andrade E Silva ML. In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. *Planta Med*, 79:1653-655, 2013.

Estrela JL, Fazolin M, Catani V, Marcio Rodrigues Alécio MR. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesq. Agropec Bras*, 41:217-222, 2006.

Fazolin M, Vidal JL, Catani V, Alécio MR, Lima MS. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758, *Ciênc Agrotec*, 31:1, 2007.

Felício R, Albuquerque S, Young Mc, Yokoya NS E Debonsi HM. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J Pharm Biomed Anal*, 5:763-769, 2010.

Fishman, JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 338:1741–1751, 1998.

Flores N, Cabrera G, Jiménez IA, Piñero J, Giménez A, Bourdy G, Cortés-Selva F, Bazzocchi IL. Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Med*, 73:206-207, 2007.

Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL. Antiparasitic. Activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Planta Med*, 70:621-627, 2009.

Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL. Benzoic acid derivatives from *piper* species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod*, 48:1538–1543, 2008.

Francis D, Rita L. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth*, 89: 271-277, 1986.

Franklin TN, Freire-de-Lima L, de Nazareth SJ, Previato JO, Castro RN, Mendonça-Previato L, de Lima ME. Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. *Molecules*, 29:6366-82, 2013.

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 48:3597-604, 2000.

Garcia FP, Lazzarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, Oliveira SO, Nakamura CV. Eupomatenoide-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013: 940531, 2013.

Galeano E, Thomas OP, Robledo S, Muñoz D, Martínez A. Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Marine drugs*, 9:1902-1913, 2011.

Gascon, J, Bern C, Pinazo, MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*, 115:22–27, 2010.

Giddings OK, Eickhoff, CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical Route of Invasion and Protective Mucosal Immunity in *Trypanosoma cruzi* Conjunctival Infection. *Infect Immun*, 74:5549 –5560, 2006.

Guimarães LGL, Cardoso MG, Zacaroni LM, Lima RK, Pimentel F, Morais AR. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). *Quim Nova*, 31:1476-1480, 2008.

Hanada RE, Gasparotto L, Pereira Jcr. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. *Fitopatol Bras*, 29:94–96, 2004.

Hamedt AL, Ortiz IC, García-Huertas PA, Sáenz J, Araujo AC, Mattos JC, Rodríguez-Gazquez MA, Triana-Chávez O. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericóense* with trypanocidal action, *Acta Trop*, 131:92-7, 2014

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris, LGM, Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem*, 46:3590–3595, 1998.

Hernández-Ochoa L, Aguirre-Prieto YB, Nevárez-Moorillón GV, Gutierrez-Mendez N, Salas-Muñoz E. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. *J Food Sci Technol*, 51:957-63, 2014.

Herwaldt B. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev*, 14: 659-688, 2001.

Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes, C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*, 23:324–349, 2010.

Izumi E, Morello LG, Ueda-Nakamura T, Yamada-Ogatta SF, Dias-Filho BP, Cortez DA, Ferreira ICP, Morgado-Diaz JA, Nakamura CV. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp Parasitol*, 118:324–330, 2008.

Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Nakamura CV, Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat Prod Rep*, 28:809-823, 2011.

Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga VF Jr, Pinto AC, Nakamura CV. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *J Med Chem*, 55:2994-3001, 2012.

Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, Loutan L Gervaix. A congenital transmission of chagas disease in latin american immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 15: 601-603, 2009.

Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent Oil Res*, 1:119–128, 1989.

Kpadonou BG, Kpoviessi SD, Yayi Ladekan E, Gbaguidi F, Frédéric M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J, Accrombessi GC, Bero J. In vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activities of crude extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* Linn from Benin and influence of vegetative stage. *J Ethnopharmacol*, 155:1417–1423, 2014.



Lima B, López S, Luna L, Agüero MB, Aragón L, Tapia A, Zacchino S, López ML, Zygadlo J, Feresin GE. Essential oils of medicinal plants from the central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial and insect-repellent activities. *Chem Biodivers*, 8:924-36, 2011.

Ling A I, Sulaiman S, Othman H. Evaluation of *Piper aduncum* Linn. essential oil (Fam:Piperaceae) against *Periplaneta americana* (L.), Iran J Arthropod Borne Dis, 3:1-6, 2009.

Liu SQ, Scott IM, Pelletier Y, Kramp K, Durst T, Sims SR, Arnason JT. Dillapiol: A pyrethrum synergist for control of the Colorado potato beetle. *J Econ Entomol*, 107:797-805, 2014.

Loureiro da Silva, Scherwinski-Pereira. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions, *Pesq Agropec Bras*, 46:384-389, 2011.

Martin DL, Goodhew B, Czaicki N, Foster K, Rajbhandary S, Hunter S, Brubaker S, *Trypanosoma cruzi* survival following cold storage: Possible implications for tissue banking. *PloS One*, 9:e95398, 2014.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol*, 146: 601–20, 2007.

Miranda EM. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC., Brasil. *Acta Amazon*, 32:9-20, 2002.

Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:17–30, 2009.

Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 105:168-73, 2010.

Ntonga P, Baldovini N, Mouray E, Mambu L, Belong P, Grellier P. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s, Parasite (Paris, France), 21:33, 2014.

Navickiene HMD, Morandim AA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DCB, Telascree M, Cavalheiro AJ, Lopes MN, Bolzani VVS, Furaln M, Marques MOM, Young MCM, Kato MJ. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Quim Nova, 29: 467-470, 2006.

Oliveira JCS, Dias IJM, Camara CAG, Schwartz MOE. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). J Essent Oil Res, 18: 557-559, 2006.

Oliveira GL, Cardoso SK, Lara CR Jr, Vieira TM, Guimarães EF, Figueiredo LS, Martins ER, Moreira DL, Kaplan MA. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). An Acad Bras Cienc, 4:1227-1234, 2013.

Orjala J, Wright AD, Behrends H, Folkers G, Sticher O, Rügger H, Rali T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. J Nat Prod, 57:18-26, 1994.

Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Giménez A, Robledo S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. J Ethnopharmacol, 111:630-635, 2007.

Pacheco JF, Silva JB, Negreiros JRS, Silva MR, Farias SB. Germination and vigor of long-pepper seeds (*Piper hispidinervum*) as a function of temperature and light. *Rev Ciênc Agron*, 44:2, 2013.

Pizzolatti MG, Koga AH, Grisard EC e Steindel M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomed*, 422–426, 2002.

Rajão MA, Furtado C, Alves CL, Passos-Silva DG, Moura MB, Schamber-Reis BL, Munrath-Lima MK, Zuma A, Vieira-Da-Rocha JP, Borio J, Mendes I, Pena M, Macedo AM, Franco GR, Souza-Pinto NC, Medeiros MH, Cruz AK, Machado MC, Ribeiro SM, Machado CR. Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair. *Environ Mol Mutag*, 55:309-321, 2014.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Pianetti GM, Rabelo RM, Bordin JO, Moraes-Souza H. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi*-infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. *Transfusion*, 35:226-230, 1995.

Rassi A, Dias JCP, Marin-Neto JA, Rassi A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*, 95:524 – 534, 2009.

Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease. *Circulation*, 115:1101–1108, 2007.

Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli M, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, Castilho O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp Parasitol*, 143:60–8, 2014

Richter C, Schlegel J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicol Lett*, 67:119–127, 1993.

Rodrigues JH, Ueda-Nakamura T, Corrêa AG, Sangi DP, Nakamura CV. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. Plos One, 9: e85706, 2014.

Rodrigues KA, Amorim LV, Dias CN, Moraes DF, Carneiro SM, Carvalho FA, *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. J Ethnopharmacol, 160:32–40, 2014.

Rodrigues MM, Alencar BCG, Claser C, Tzelepis, F. Immunodominance: A new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease. Braz J Med Biol Res, 42:220 –223, 2009.

Rojas J, Palacios O E Ronceros S. The effect of the essential oil *from Aloysia triphylla* Britton (lemon verbena) on *Trypanosoma cruzi* in mice. Rev Per Med Exp Salud Publica, 29:61-8, 2012.

Romanha AJ, Lisboa S, Soeiro MN, 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, Bustamante JM, Freitas-Junior L, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Sonia G, Armstrong T, Degraive W, Andrade Z. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 233-238, 2010.

Rudrapaul P, Sarma IS, Das N, De UC, Bhattacharjee S, Dinda B. New flavonol methyl ether from the leaves of *Vitex peduncularis* exhibits potential inhibitory activity against *Leishmania donovani* through activation of iNOS expression. Eur J Med Chem, 87:328–35, 2014.

Sakagami, Satoh K. Modulating factors of radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate (review). Anticancer Res, 5A:3513-20, 1997.

Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 1:67-80, 2002.

Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*, 3:888-94, 2012.

Sandes JM, Fontes A, Regis-Da-Silva CG, De Castro MC, Lima-Junior CG, Silva FP, Vasconcellos ML, Figueiredo RC. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita – Baylis - Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3- (4-nitrophenyl propanenitrile). *Plos One*, 9:e93936, 2014

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Freire JM E Soares MJ. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*, 134:1649-56, 2007.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Mendonça LZ, Soares MJ. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol*, 116:283-290, 2007.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Salgado AP, Menna-Barreto RF, Soares MJ. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res*, 100:783-90, 2007.

Santos ML, Magalhães CF, da Rosa MB, de Assis Santos D, Brasileiro BG, de Carvalho LM, da Silva MB, Zani CL, de Siqueira EP, Peres RL, Andrade AA. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *Braz J Microbiol*, 10:1275-8, 2014.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*, 115:14–21, 2010.

Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, 269, 8022– 8028, 1994

Silva TB, Menezes LR, Sampaio MF, Meira CS, Guimarães ET, Soares MB, Prata AP, Nogueira PC, Costa EV, Chemical composition and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). *Nat Prod Commun*, 8:403-6, 2013.

Souto RN, Harada AY, Andrade EH, Maia JG, Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol*, 6:510-7, 2012.

Toledo JS, Ambrósio SR, Borges CH, Manfrim V, Cerri DG, Cruz AK, Da Costa FB. In vitro leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. *Molecules*, 5: 6070–6079, 2014.

Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MA, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective Effect of 2'6'-Dihydroxy-4J-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobiol Agents Chemother*, 43:1234–1241, 1999.

Varela J, Serna E, Torres S, Yaluff G, de Bilbao NI, Miño P, Chiriboga X, Cerecetto H, González M. *In vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from *Aristeguietia glutinosa* and mechanism of action studies. *Molecules*, 19:8488-502, 2014.

Vendrametto MC, Santos AO, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DA, Ueda-Nakamura T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a

compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. *Parasitol Int*, 59:154-158, 2010.

Vieira, RF, Silva SR. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da 1ª reunião técnica. Brasília: Embrapa Rec Gen Biotecnol, 184, 2002.

Xu WH, Li XC. Antifungal Compounds from *Piper* species, *Curr Bioact Compd*, 7:4, 2011.

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

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Visitado em Janeiro de 2015.

Zacaroni LM, Cardoso MG, Souza PE, Pimentel FA, Guimarães LG, Salgado AP. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazon*, 39:193 – 198, 2009.