



Atividade biológica de derivados vegetais de famílias da flora brasileira sobre as linhagens I e II de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP como pré-requisito para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Aluna: Renata Tomé Alves

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A474a Alves, Renata Tomé
Atividade biológica de derivados vegetais de famílias da flora brasileira sobre as linhagens I e II de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) / Renata Tomé Alves. – Araraquara, 2011
105 f

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: João Aristeu da Rosa

Co-orientador: Sérgio de Albuquerque

1. Lippia sp. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Atividade tripanocida. 4. Citotoxicidade. 5. Doença de Chagas. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Albuquerque, Sérgio, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho a minha querida avó Dida (Íride Zanazzi Tomé, in memoriam) pelo exemplo de força e amor incondicional e ao pequeno Nando, pela vida que se renova.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado garra e prudência para enfrentar os dias árduos de pesquisa, em que às vezes parece que nada vai dar certo.

Agradeço meus amados pais, Antonio Carlos e Cida, que, com muito amor e carinho, sempre estiveram presentes em minha vida. Muito obrigada por apoiarem meus sonhos e me ensinarem, por meio de seus exemplos, os verdadeiros valores da vida.

Às minhas queridas irmãs Fernanda e Juliana pelo exemplo de dignidade e amizade. Obrigada pelos conselhos preciosos, pelo amor incondicional e por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido namorado Márcio, pelo exemplo de generosidade, humildade e serenidade. Obrigada pela paciência, amor, carinho e, principalmente, por ter ficado ao meu lado nas horas mais difíceis, tornando-me uma pessoa melhor.

Agradeço meus familiares, em especial, aos meus cunhados Cláudio pelo apoio, pelo ombro amigo e pelas oportunidades dadas e ao Rafael, pela força e pelos bons momentos vivenciados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pelo exemplo de generosidade e comprometimento com a pesquisa. Obrigada pelo incentivo, amizade e, principalmente, pela confiança nos meus sonhos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pelo exemplo de determinação e humildade. Obrigada pela amizade, confiança e por, gentilmente, ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Doutorado. Obrigada por ter confiado em mim e no meu trabalho, dando-me a oportunidade de pesquisar em uma área de tamanho interesse e satisfação.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP) – “Júlio de Mesquita Filho” por ter me aceitado no programa de pós-graduação em

Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia e aos Laboratórios de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP e da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto-SP pela disponibilidade da estrutura laboratorial necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pela atenção e apoio.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, pela amizade, incentivo e experiência profissional que contribuíram para meu crescimento científico, registro aqui meus sinceros agradecimentos.

Agradeço às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Sônia Ornellas Silva, Laura Rosim, Angela Virgínia Cafarelli Bergo, Márcia Regina Buda Adlof e, em especial, Claudia Lúcia Molina pelo atendimento feito com paciência e atenção.

Agradeço a Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, pelo carinho, amizade e apoio.

Agradeço o Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior e a Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto-SP, pela amizade, apoio e pela companhia agradável e divertida.

Agradeço a Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, do Instituto de Química de Araraquara-SP, Unesp, pelo apoio e confiança.

Agradeço as funcionárias Isabel Martinez e Therezinha Aparecida Ricci (Nina), do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, Miriam, Antonia, Cristiane, Vânia Cláudia e Georgius da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP pela convivência, paciência, amizade e apoio.

Agradeço aos alunos dos Laboratórios de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, Vagner José Mendonça, Jader de Oliveira, Júlio Miné, Júlio Ferreira Filho, e da USP de Ribeirão Preto-SP, Mariana Rosa, Kelly Rodrigues, Luis Gustavo R. Oliveira, Christian C. Kuehn, Carla D. S. Sponchiado e Mariana Bronzon, pela amizade construída no decorrer destes anos, pelo companheirismo, apoio constante, incentivo e por todos os momentos que passamos juntos.

Às minhas queridas amigas Aline Rimoldi, Maria Fernanda Falcone Dias, Juliana Damieli Nascimento, Tatiana A. Mulinari, Mariana Bryan Augusto e Gilsane G. Morais pelos conselhos, pelas orientações na vida pessoal e na vida acadêmica, pelas alegrias e boas risadas e por estarem sempre ao meu lado como grandes amigas. Obrigada por tudo!

Com muito carinho e admiração agradeço ao Cristiano Soleo Funari e Luis Octávio Regasini, do Instituto de Química de Araraquara-SP, Unesp, pelo apoio constante, pela confiança e amizade. Muito obrigada por terem me ajudado a tornar possível este trabalho!

Um agradecimento especial à minha tia Marinei, que, com o coração repleto de amor e preocupação, sempre esteve presente em minha vida. Obrigada pelo exemplo de força e perseverança!

Enfim, obrigada a todos que, diretamente ou não, contribuíram para que eu não desperdiçasse a vida e as oportunidades surgidas e que trilharam comigo variados caminhos. Que cada um saiba que de alguma maneira foi responsável por essa conquista.

“DE TUDO ficou um pouco.
Se de tudo fica um pouco,
Mas por que não ficaria
Um pouco de mim?
Fica sempre um pouco de tudo.
Às vezes um botão. Às vezes um rato.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A atividade de 92 extratos etanólicos de espécies de Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae, e Verbenaceae foi avaliada sobre formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi*, nas concentrações de 500, 350, 250 e 100 µg/ml. Quinze extratos de *Lippia salviaefolia*, *L. sidoides*, *L. laciocalycina*, *L. lupulina*, *L. balansae*, *L. velutina* e suas frações hexânicas, de acetato de etila, n-butanólicas e aquosas foram avaliados sobre formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi*, nas concentrações de 32, 8, 2 e 0,5 µg/ml. Adicionalmente, as amostras mais promissoras de *Lippia* sp foram avaliadas, *in vitro*, sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e, *in vivo*, em camundongos BALB/c. A citotoxicidade foi avaliada em fibroblastos da linhagem LLCMK₂ e o benzonidazol foi utilizado como controle positivo. Todos os 92 extratos etanólicos, testados sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, foram inativos. Os melhores resultados entre as 92 amostras avaliadas foram obtidos com o extrato etanólico de *Ocotea paranapiacabensis*, por apresentar atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia e toxicidade moderada, e com o extrato de *Aegiphilla lhotzkyana*, que demonstrou atividade tripanocida moderada sobre a cepa Bolívia e moderada citotoxicidade. Dentre os extratos etanólicos de *Lippia* sp avaliados, o de folhas de *L. velutina* apresentou a maior atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas e toxicidade moderada, mas foi inativo contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Os melhores resultados foram obtidos da sua fração de acetato de etila que apresentou atividade, sobre formas epimastigotas, 42 vezes maior do que o benzonidazol, com Índice de Seletividade (IS) de 371,0, além de atividade moderada sobre as formas tripomastigotas. Esta amostra foi inativa contra as formas amastigotas do parasito. Em relação ao ensaio *in vivo*, tanto o extrato etanólico quanto sua fração de acetato de etila de *L. velutina* não diminuíram a parasitemia, nem aumentaram o tempo de sobrevivência dos camundongos. Em conclusão, o *screening* de plantas brasileiras indicou o potencial efeito tripanocida dos extratos etanólicos obtidos de *Ocotea paranapiacabensis*, *Aegiphilla lhotzkyana*, bem como o de folhas de *L. velutina*, especialmente da sua fração de acetato de etila, que foi mais ativa do que o benzonidazol.

Palavras-chave: *Lippia* sp, *Trypanosoma cruzi*, atividade tripanocida, citotoxicidade, cepas, biodiversidade, doença de Chagas.

ABSTRACT

Trypanocidal activity of 92 ethanol extracts of species of Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae, and Verbenaceae was evaluated using the epimastigote forms of the Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi* at a concentration of 500, 350, 250, and 100 µg/ml. Fifteen extracts of *Lippia salviaefolia*, *L. sidoides*, *L. laciocalycina*, *L. lupulina*, *L. balansae*, *L. velutina*, their liquid-liquid extraction fractions of hexane, ethyl acetate, n-butanol and water were evaluated using the epimastigote forms of B5 clone of CL Brener strain of *T. cruzi* at a concentration of 32, 8, 2, 0.5 µg/ml. Additionally, samples of the most promising of *Lippia* sp were evaluated, in vitro, using trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* and, in vivo, in BALB/c. The cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts of lineage LLCMK₂ and benznidazole was used as positive control. All the 92 ethanol extracts tested against epimastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* are inactive. The best results among the 92 samples evaluated were obtained with ethanol extracts of *Ocotea paranapiacabensis*, for showing trypanocidal activity against epimastigote forms of the Bolivia strain and being moderately toxic, and the extracts of *Aegiphilla lhotzkyana*, which showed moderate trypanocidal activity against the Bolivia strain and moderate toxicity. Among the 15 ethanol extracts of *Lippia* sp assayed, the one from of leaves of *L. velutina* showed the highest trypanocidal activity on epimastigote forms and moderate toxicity, but was inactive against trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. Best results were obtained for its ethyl acetate fraction, which showed activity in epimastigote forms, 42 times more than benznidazole, with Selectivity Index (SI) of 371.0 and moderate activity on trypomastigote forms. This sample was inactive against the amastigote forms of the parasite. For the test in vivo, both the ethanol extract and its ethyl acetate fraction of *L. velutina* not diminished the parasitemia or increase survival time of mice. In conclusion, the screening of Brazilian plants has indicated the potential trypanocidal effect of ethanol extracts obtained from *Ocotea paranapiacabensis*, *Aegiphilla lhotzkyana*, and of the ethanol extracts of leaves of *L. velutina*, especially its ethyl acetate fraction, which showed higher activity than benznidazole.

Keywords: *Lippia* sp, *Trypanosoma cruzi*, trypanocidal activity, cytotoxicity, strains, biodiversity, Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de dose-resposta sigmoidal dos extratos de frutos de *Ocotea paranapiacabensis*, Lauraceae (Am93) e de frutos de *Aegiphilla lhotzkyana*, Verbenaceae (Am160), avaliados sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi*..... 50
- Figura 2.** Curva de dose-resposta sigmoidal dos extratos etanólicos de folhas de *Lippia velutina* (EELLv14) e de ramos de *Lippia lupulina* (EESLlup12) avaliados sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*..... 55
- Figura 3.** Curva de dose-resposta sigmoidal da fração hexânica (FHex14) e de acetato de etila (FAC14) de folhas de *Lippia velutina* e da fração hexânica (FHex11) de folhas de *Lippia lupulina*, avaliados sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*..... 55
- Figura 4.** Curva parasitêmica de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/ml do clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi* e tratados com DMSO, extrato etanólico (EELLv14) e fração de acetato de etila (FAC14) de folhas de *L. velutina* e benzonidazol, na dosagem de 8mg/Kg..... 58

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Extratos etanólicos de plantas das famílias Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae avaliados sobre as formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de <i>T. cruzi</i> | 35 |
| Tabela 2. | Amostras de <i>Lippia</i> sp avaliadas sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> | 38 |
| Tabela 3. | Atividade tripanocida e citotóxica sobre as formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e de fibroblastos da linhagem LLCMK ₂ , respectivamente..... | 49 |
| Tabela 4. | Atividade tripanocida e citotóxica sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de <i>T. cruzi</i> e de fibroblastos da linhagem LLCMK ₂ , respectivamente..... | 49 |
| Tabela 5. | Atividade tripanocida e citotóxica de espécies de <i>Lippia</i> sp sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> e de fibroblastos da linhagem LLCMK ₂ , respectivamente.... | 53 |
| Tabela 6. | Atividade tripanocida e citotóxica de <i>Lippia</i> sp sobre as formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> e de fibroblastos da linhagem LLCMK ₂ , respectivamente..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECG – Ecocardiograma

DTU - *Discrete Typing Unit*

LAFEPE – Laboratório Farmacêutico de Pernambuco

EELLSal – Extrato etanólico de folhas de *L. salviaefolia* Cham.

EESLSal – Extrato etanólico de ramos de *L. salviaefolia* Cham.

EEFLb – Extrato etanólico de flores de *L. balansae* Briq.

EELLb – Extrato etanólico de folhas de *L. balansae* Briq.

EESLb – Extrato etanólico de ramos de *L. balansae* Briq.

EELSLias – Extrato etanólico de folhas e ramos associados de *L. lasiocalycina* Cham.

EELLSid – Extrato etanólico de folhas de *L. sidoides* Cham.

EESLSid – Extrato etanólico de ramos de *L. sidoides* Cham.

EERLSid – Extrato etanólico de raízes de *L. sidoides* Cham.

EEFLlup – Extrato etanólico de flores de *L. lupulina* Cham.

EELLlup – Extrato etanólico de folhas *L. lupulina* Cham.

EESLlup – Extrato etanólico de ramos de *L. lupulina* Cham.

EERLlup – Extrato etanólico de raízes de *L. lupulina* Cham.

EELLv – Extrato etanólico de folhas de *L. velutina*

EESLv – Extrato etanólico de ramos de *L. velutina*

FHex – Fração hexânica

FAc – Fração de acetato de etila

FBu – Fração de n-butanol

FAq – Fração aquosa

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

PMS – *Phenazine methosulfate*

DMSO – Dimetilsulfóxido

SDS – Dodecil sulfato de sódio

CPRG – *Chlorophenol red β -D-galactopyranoside*

LLCMK₂ – Lipid metabolism of monkey kidney

LIT – *Liver Infusion Tryptose*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1..... | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.1. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas..... | 18 |
| 2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 2.3. Patologia da doença de Chagas..... | 22 |
| 2.4. Terapêutica..... | 23 |
| 2.5. Atividade tripanocida de produtos de origem vegetal..... | 26 |
| 3. OBJETIVOS..... | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1. Parasitas..... | 34 |
| 4.2. Material botânico e extração..... | 34 |
| 4.2.1. Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae..... | 34 |
| 4.2.2. <i>Lippia</i> sp., Verbenaceae..... | 36 |
| 4.3. Ensaio <i>in vitro</i> da atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de <i>T. cruzi</i> | 39 |
| 4.4. Ensaio <i>in vitro</i> da atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 40 |
| 4.5. Ensaio de citotoxicidade..... | 41 |
| 4.6. Ensaio sobre as formas tripomastigotas..... | 42 |
| 4.7. Ensaio sobre as formas amastigotas..... | 44 |
| 4.8. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vivo</i> em camundongos BALB/c | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 47 |
| 5.1. Atividade tripanocida e citotoxicidade dos extratos etanólicos de Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae..... | 48 |
| 5.2. Atividade tripanocida das amostras de <i>Lippia</i> sp., Verbenaceae..... | 52 |
| 5.2.1. Sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade em células LLCMK ₂ | 52 |
| 5.2.2. Sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 56 |
| 5.2.3. Avaliação da atividade tripanocida, <i>in vivo</i> , em camundongos BALB/c..... | 57 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |
| CAPÍTULO 2 – Artigos científicos..... | 78 |
| 1) Screening for trypanocidal activity of six species of <i>Lippia</i> (Verbenaceae) native in Brazil..... | 79 |
| 2) Trypanocidal activity of Brazilian plants against the Y and Bolivia strains of <i>Trypanosoma cruzi</i> | 94 |

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Na América Latina, a doença de Chagas é uma parasitose que afeta, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, aproximadamente 10 milhões de pessoas e representa um risco para 25 milhões (WHO, 2010).

Uma vez que essa zoonose atinge principalmente populações pobres, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas não se torna atraente para as grandes empresas farmacêuticas, o que a torna, nesse panorama atual, extremamente negligenciada, fato preocupante diante das necessidades dessas populações (NWAKA; RIDLEY, 2003; DIAS et al., 2009). Os dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol, têm potenciais efeitos adversos tóxicos e de eficácia variável, sendo ineficazes na erradicação da infecção durante a fase crônica, quando a maioria dos doentes é diagnosticado, o que, conseqüentemente, contribui para a sua baixa taxa de utilização (DOCAMPO, 2001; COURA, 2009). Por isso, a triagem de potenciais novos compostos é essencial (COURA; CASTRO, 2002).

A dificuldade de se encontrar uma substância capaz de combater o parasito pode estar diretamente ligada à heterogeneidade das diferentes populações de *T. cruzi*, que apresentam diferenças na morfologia, na virulência e patogenicidade, na habilidade de evasão à resposta imune do hospedeiro, na sensibilidade a drogas, na constituição antigênica e nas propriedades bioquímicas (FERNANDES et al., 1998; TIBAYRENC; AYALA, 2002). Assim, para a avaliação de novos fármacos, devem ser consideradas cepas de distintos grupos de *T. cruzi* (ANDRADE, 1976; MACEDO et al., 2002).

Diante desse quadro, é evidente a necessidade de se desenvolverem terapias que bloqueiem a multiplicação de *T. cruzi*, sem efeitos adversos severos (COURA; CASTRO, 2002).

Há muito tempo, as plantas medicinais são utilizadas no tratamento de doenças parasitárias, e muitos trabalhos corroboram a validade terapêutica atribuída a produtos de origem vegetal, bem como descrevem a atividade tripanocida de vários princípios ativos naturais (SEPULVEDA-BOZA; CASSELS, 1996; BASTOS et al., 1999; PIETERS; VLIETINCK, 2005; VAN MIERT et al., 2005; SARAIVA et al., 2007; BATISTA JR. et al., 2008).

Em face da rica flora brasileira e dos inúmeros trabalhos sobre a ação tripanocida de produtos naturais, teve-se o interesse em avaliar a ação tripanocida de plantas de algumas famílias observadas anteriormente por Buainain e colaboradores (1992). Neste trabalho, foi realizado um *screening* de 103 extratos alcoólicos obtidos a partir de raízes, tubérculos, folhas e sumidades florais de exemplares pertencentes a 19 famílias de vegetais, com o intuito de verificar a ação inibitória sobre o desenvolvimento de *T. cruzi*. Os dados mostraram a inibição total de crescimento das formas epimastigotas do parasito em 32 extratos de plantas pertencentes às famílias Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae.

Os resultados apresentados por esses pesquisadores são promissores e mereciam ser reavaliados por outras metodologias, bem como por material coletado de fonte diversa, uma vez que o período em que o extrato é obtido e as partes vegetais coletadas influenciam a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

A tripanossomíase americana, posteriormente denominada doença de Chagas, foi descrita pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909. Em sua descrição, foram abordados todos os aspectos da doença, como o agente etiológico, o vetor, o modo de transmissão, a existência de reservatórios silvestres e domésticos, a patogenia e sintomatologia que ela pode causar ao homem, esclarecendo toda a cadeia epidemiológica da doença (CHAGAS, 1909).

Essa zoonose ocorre nas zonas rurais da América Latina, quando o protozoário *Trypanosoma cruzi* entra em contato com a pele lesada ou mucosa de um hospedeiro, e é transmitida principalmente por meio das fezes de insetos hematófagos da subfamília Triatominae (WHO, 1991; ARAS et al., 2003).

Estima-se que a existência de pessoas infectadas por *T. cruzi* em países não endêmicos é decorrente principalmente da emigração e da falta de triagem em bancos de doação de sangue. Esse fato é observado em países como os Estados Unidos, onde se supõe que vivam entre 100.000 e 370.000 pessoas infectadas; no Japão, cerca de 150.000; na Austrália, por volta de 80.000; e, na Europa, em torno de 250.000. A transfusão de sangue pode ser considerada o segundo mecanismo mais importante de transmissão da doença de Chagas, representando de 12 a 20% das infecções (SCHMUÑIS, 1991; SCHMUÑIS; DIAS, 2000).

No Brasil, a criação da Iniciativa Cone Sul em 1991 foi estimulada pelos dados obtidos a partir de inquéritos entomológicos e de soro-prevalência na

população, quando se delimitou uma área de risco de transmissão domiciliar de 36% e uma taxa de prevalência de 4,2% na população rural. A estratégia dos países participantes - Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai - foi o combate ao principal vetor, o *Triatoma infestans*, além da redução do risco de transmissão por transfusão sanguínea (VINHAES; DIAS, 2000).

Dias (2000) avaliou que a incidência de doença de Chagas no Brasil decresceu drasticamente e que o mais importante foi o efetivo controle de sua transmissão natural em âmbito nacional. “O panorama futuro da doença de Chagas humana se desenha otimista, caso se mantenha minimamente ativos e adequados os programas nacionais já em curso, especialmente se as atuais iniciativas de ampliação e sustentação desses programas, em nível do Cone Sul, do Pacto Andino e da região do México e América Central, cumprirem o seu papel”.

Os casos de doença de Chagas humana estão distribuídos em uma área de três milhões de quilômetros quadrados, sendo encontrados principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, parte de Santa Catarina e região noroeste do Paraná, Minas Gerais (exceto o sul de Minas), São Paulo, Goiás e Estados do Nordeste. Na Região Amazônica, já foram detectados focos de transmissão natural no Pará, no Amapá e no Alto Rio Negro (SILVEIRA; REZENDE, 1994; BOZELLI et al., 2006; DIAS et al., 2009).

2.2. *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* inclui diferentes fases e formas no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são encontradas no vetor, sendo as primeiras

caracterizadas pelo formato alongado, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Já as tripomastigotas metacíclicas são alongadas, com cinetoplasto posterior ao núcleo, com flagelo que se estende por toda a célula e torna-se livre na porção anterior. As formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são encontradas no vertebrado, sendo a amastigota arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. A transição entre uma forma e outra envolve modificações na morfologia, na expressão gênica e no ciclo celular (HEATH et al., 1990; LANA; TAFURI, 2000).

As populações de *T. cruzi* apresentam alto grau de variabilidade intraespecífica detectada por marcadores biológicos, bioquímicos, imunológicos, genéticos e clínicos, diversidade que pode estar associada a sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros (SILVEIRA, 2000; MACEDO et al., 2001).

De acordo com a literatura, existem cepas com predominância de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, que, por sua vez, apresentam tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando, com maior frequência, esplenócitos, células do fígado e medula óssea, além de apresentar picos parasitêmicos altos e precoces. Esses parasitos, apesar de serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, determinam, na fase aguda da infecção, taxa de mortalidade elevada na grande maioria dos animais experimentais infectados (ANDRADE, 1976).

Entretanto, algumas cepas apresentam predominância de formas tripomastigotas sanguíneas largas, possuindo, assim, marcante tropismo para as células dos músculos lisos, esqueléticos e cardíaco e para o tecido

glandular. Esse tipo de morfologia confere a essa cepa maior resistência aos anticorpos circulantes, e, como consequência, os parasitos permanecem por mais tempo na corrente circulatória, o que determina picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada (RIBEIRO et al., 1982).

Na tentativa de reunir os parâmetros morfobiométricos e as características moleculares de diferentes cepas de *T. cruzi*, estas foram inicialmente agrupadas em duas linhagens principais, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, segundo nomenclatura oficial (ANONYMOUS, 1999). As cepas *T. cruzi* I são encontradas no ciclo silvestre e as cepas *T. cruzi* II estão distribuídas principalmente no ciclo doméstico, sendo frequentemente encontradas na população humana (ZINGALES et al., 1998). Posteriormente, pesquisadores adequaram essa nomenclatura, reclassificando as cepas de *T. cruzi* como pertencentes a seis DTUs, TcI, TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIIId e TcIIe, que apresentam aspectos epidemiológicos e evolucionários distintos (LEWIS et al., 2009).

De acordo com esses parâmetros, a cepa Y é constituída por formas tripomastigotas delgadas e classificadas como *T. cruzi* I (PEREIRA DA SILVA; NUSSENZWEIG, 1953; ZINGALES 1998). Já a cepa Bolívia é composta, predominantemente, por formas tripomastigotas largas e incluídas na linhagem *T. cruzi* II (FUNAYAMA; PRADO JUNIOR, 1974; ZINGALES, 1998).

A cepa CL-Brener é um híbrido originado da fusão das linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e isolada do vetor *Triatoma infestans* por Brener em 1963 (BRENER; CHIARI, 1963). Essa cepa é amplamente utilizada em pesquisas por apresentar características como infectividade em animais e resposta aos

tratamentos existentes e por possuir marcadores genéticos estáveis (ZINGALES et al., 1997).

Por meio de manipulação genética, foi desenvolvido o clone B5 da cepa CL-Brener, caracterizado pela presença do gene da β -galactosidase na cepa CL-Brener, o que confere alta especificidade e sensibilidade aos ensaios farmacológicos (BUCKNER et al., 1996).

2.3. Patologia da doença de Chagas

Em relação à patologia da doença, o curso da infecção é bastante variável e apresenta duas fases: aguda e crônica. A primeira, geralmente, é assintomática, mas de 1% a 2% dos pacientes podem apresentar sintomas como febre, linfadenopatia e hepato-esplenomegalia, após uma ou duas semanas da infecção (BRENER, 1987; MARIM, 2003).

Os sinais característicos de infecção variam de acordo com a porta de entrada do parasito. Quando é a conjuntiva ocular, ocorre edema bipalpebral unilateral, denominado sinal de Romana; quando o parasito penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão é denominada chagoma de inoculação. Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças e imunocomprometidos, a esses sinais podem estar associados quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca, o que pode levar ao óbito. É importante ressaltar que a gravidade da infecção depende também de outros fatores, como a virulência da cepa do parasito, a quantidade de formas inoculadas e a susceptibilidade do paciente afetado (RASSI et al., 2000; CÁRDENAS et al., 2004; ALMEIDA-LEITE et al., 2007).

Na fase crônica, ocorre a forma indeterminada, na qual o indivíduo não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico, nem resultados anormais dos exames complementares do coração, como ecocardiograma (ECG) e radiografia do tórax e do tubo digestório, sendo, assim, um portador assintomático da doença de Chagas. Outros indivíduos infectados evoluem com manifestações da doença, como a miocardite grave com cardiomegalia, o megaesôfago e o megacólon (RASSI JUNIOR; RASSI, 1998; RASSI JUNIOR; MARIN-NETO, 2000; MORELL et al., 2006).

2.4. Terapêutica

Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da tripanossomíase americana, após a sua descrição em 1909, foram o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio, todos ineficazes no tratamento proposto (CROFT, 1999; COURA; CASTRO, 2002).

No período de 1912 a 1962, diversos agentes quimioterápicos das mais variadas classes foram desenvolvidos e introduzidos na terapêutica. Em 1968, um médico brasileiro realizou uma avaliação meticulosa dos fármacos disponíveis para o *T. cruzi* em condições *in vitro* e *in vivo*. Com base nos resultados obtidos, 27 compostos e mais de 30 antibióticos foram considerados inativos. Evidenciou-se também que certos compostos avaliados, tais como a bisquinaldina, as aminoquinolinas (pentaquina, isopentaquina e primaquina), os arsênicos trivalentes, os aminoglicosídeos, nitrofuranos e os antibióticos, apresentaram efeito supressor da parasitemia, porém sem ações curativas (BRENER, 1968).

No final de 1960 e começo da década de 70, dois fármacos começaram a ser utilizados no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox (BOCK et al., 1969) e benzonidazol (RICHLE, 1973), comercializados, respectivamente, com os nomes Lampit®/Bayer e Rochagan®/Roche (COURA; CASTRO, 2002), e desenvolvidos com o intuito de eliminar os parasitos na fase aguda da doença, diminuindo assim o curso da infecção (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). Em 2003, o grupo farmacêutico suíço Roche anunciou a doação ao governo brasileiro do direito de patente e de uso da tecnologia do medicamento Rochagan®, a base do fármaco benzonidazol. Posteriormente, o governo brasileiro concedeu, ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), o direito de sua produção (WEBMEDICOS, 2006).

A ação desses fármacos é afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes. Os resultados mais promissores foram observados na fase aguda da doença, com o uso do medicamento durante o período de 60 a 90 dias (SCHENONE et al., 1975; COURA; CASTRO, 2002). Por outro lado, em pacientes adultos na fase crônica da infecção, os resultados mais promissores foram obtidos no Cone Sul da América do Sul (região sul de Brasil, Argentina e Chile), provavelmente devido às características da cepa do parasito predominante nessa região (SCHENONE et al., 1975).

No entanto, no Brasil, o nifurtimox foi retirado do mercado, e o benzonidazol passou a ser o único fármaco com atividade tripanocida disponível, com 80% de cura na fase aguda, mas com baixa eficácia na fase crônica da doença - cerca de 20% (LANA; TAFURI, 2000; REY, 2001; PEDROSA et al., 2001; COURA, 2009). Entre os efeitos adversos mais

frequentes do nifurtimox, observam-se anorexia, perda de peso, alterações psicológicas, excitabilidade, tremores musculares, sonolência, alucinações, além de algumas manifestações digestivas, tais como náusea, vômito, diarreia e cólicas intestinais (CASTRO; DIAS, 1988; COURA, 2009). Já para o benzonidazol, os principais efeitos colaterais são manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica, polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (CASTRO et al., 2006).

Outro composto denominado megalzol, um 5-nitroimidazol tiadiazol, foi sintetizado em 1968 e demonstrou elevada ação tripanocida, tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra *T. cruzi*, incluindo as cepas resistentes ao benzonidazol (FILARDI; BRENER, 1982; DE CASTRO; MEIRELLES, 1987; LAGES-SILVA et al., 1990). Apesar de apresentar ação satisfatória contra o parasito, o composto teve seu desenvolvimento interrompido devido a sua forte ação genotóxica e mutagênica *in vitro* (FERREIRA; FERREIRA, 1986; POLI et al., 2002; NESSLANY et al., 2004).

A necessidade de se prevenir a transmissão dessa parasitose por transfusão sanguínea levou a uma abordagem quimioprolática, ou seja, à busca de drogas que eliminem o parasito no sangue. A violeta de genciana é o único agente empregado na quimioprolaxia de sangue com esse fim (DIAS; WENDEL, 1992). No entanto, essa medida profilática ainda é insuficiente, já que apresenta restrições quanto a sua utilização por manchar e irritar pele e mucosas, causar microaglutinação, aglomeração de eritrócitos e decréscimo do

número de leucócitos, além de apresentar propriedades mutagênicas e carcinogênicas (DOCAMPO; MORENO, 1990; DIAS; WENDEL, 1992).

2.5. Atividade tripanocida de produtos de origem vegetal

Dentre as diversas substâncias obtidas da flora brasileira, algumas têm apresentado resultados promissores como tripanocidas, tais como: a naftoquinona β -lapachona (quinona), presente em várias espécies vegetais da família Bignoniaceae, que apresentou atividade contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, cujo derivado de transformação química tem sido sugerido como fármaco alternativo para o uso em bancos de sangue; o diterpeno, isolado de plantas da família Taxaceae, que interferiu na proliferação de epimastigotas e impediu a completa divisão celular; e o triterpeno tingenona, que também foi ativo sobre essa mesma forma parasitária, causando inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos de *T. cruzi* (CASTRO, 1993).

Um estudo realizado por Fairlamb, em 1994, avaliou os efeitos anti-*T. cruzi* de alcaloides, isolados de plantas da família Rutaceae, que apresentaram atividades semelhantes às das drogas de referência nifurtimox e benzonidazol contra as formas epimastigotas (FAIRLAMB, 1994). A atividade tripanocida também foi observada em flavonoides (3-metoxiflavonol e flavanona sacuranetina) de plantas da família Asteraceae, com a eliminação do parasito no sangue infectado (RIBEIRO et al., 1997).

Pesquisadores, ao avaliarem um grupo de lignanas dibenzilbutirolactônicas biologicamente ativas, isoladas das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*, família Rutaceae, demonstraram a ação tripanocida da

cubebina (17) e do metilpluviatolido (BASTOS et al., 1999). Em estudos posteriores, a atividade anti-inflamatória da cubebina foi demonstrada, e, nos estudos pré-clínicos, não se observou qualquer efeito tóxico quando administrada por via oral (BASTOS et al., 2001; RODRIGUES, 2002). Mais recentemente, demonstrou-se que a piperina é uma potente substância tripanocida sobre as formas epimastigotas e amastigotas (RIBEIRO et al., 2004).

A família Annonaceae é representada, na região Neotropical, por cerca de 40 gêneros e aproximadamente 650 espécies (RIBEIRO et al., 1999). A maioria dessas espécies está limitada aos trópicos, onde crescem em baixas altitudes, e o maior número de gêneros está nas Américas, com predominância na América do Sul. Os grandes centros de distribuição da família são a região amazônica, as Guianas e o sudeste do Brasil (MIRALHA, 1995). A atividade antiprotozoária de extratos de seis espécies da família Annonaceae foi confirmada sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e trofozoítas de *Plasmodium falciparum* (OSORIO et al., 2007). A ação antileishmanicida também foi confirmada por outros autores, nas espécies *Uvaria acuminata* e *Annona foetida* (RAYNAUD-LE et al., 2004; COSTA et al., 2006). Outros trabalhos observaram a ação tripanocida de plantas dessa família sobre o *Trypanosoma brucei* (ATINDEHOU et al., 2004; OGBADOYI et al., 2007), e Silva e colaboradores, em 2009, observaram a ação antitumoral, tripanocida e antileishmanicida de *Duguetia furfuraceae*.

Apiaceae é uma família de importância econômica, com cerca de 300 a 469 gêneros de plantas e 2.500 a 3.750 espécies (PIMENOV; LEONOV, 1993).

Cucurbitaceae é composta por cerca de 118 gêneros e 825 espécies, das quais muitas também têm importância econômica. Buainain e colaboradores (1992) descreveram, pela primeira e única vez, a ação tripanocida de plantas pertencentes a essas duas famílias.

Lauraceae é composta por aproximadamente 2500 espécies incluídas em 52 gêneros (ALVES; ISHII, 2007). Nas Américas, ocorrem cerca de 29 gêneros e 900 espécies com grande diversidade na América Central. No Brasil, é representada por 22 gêneros com alta diversidade nas florestas pluviais e também nas restingas e no cerrado (BARROSO et al., 2002). Ensaios com extratos de plantas dessa família demonstraram a atividade contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (UCHIYAMA et al., 2002; FILHO et al., 2004; ABE et al., 2005; FOURNET et al., 2007; CABRAL et al., 2010). Também foi observada atividade antiprotozoária sobre as formas promastigotas de *Leishmania donovani* e antiplasmodial sobre clones resistentes à cloroquina de *Plasmodium falciparum* (SILVA FILHO et al., 2008).

A família Moraceae inclui cerca de 50 gêneros e 1500 espécies, predominantemente tropicais e subtropicais. No Brasil, está representada por 27 gêneros e em torno de 250 espécies, incluindo árvores, arbustos e ervas (JACOMASSI et al., 2007). Muelas-Serrano e colaboradores demonstraram, em 2000, a ação de extratos brutos de *Mikania cordifolia* e *Philodendron bipinnatifidum* sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, e a atividade de flavonoides isolados de *Artocarpus styracifolius* foi observada, em outro trabalho, contra *Plasmodium falciparum* e *T. cruzi* (BOURJOT et al., 2010).

Nyctaginaceae é representada por cerca de 30 gêneros e 400 espécies, com distribuição pantropical. As espécies arbóreas dessa família recebem o

nome popular de “maria mole”, devido à baixa qualidade de sua madeira (SOUZA; LORENZI, 2005). A ação tripanocida de espécies desta família foi descrita somente por Buainain e colaboradores (1992).

A família Verbenaceae reúne cerca de 175 gêneros e 2800 espécies distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas do Hemisfério Norte (BARROSO, 1991). Habtemariam (2003) observou a atividade de diterpenos isolados de *Premna schimperi* e *P. oligotricha* sobre as formas amastigotas de *Leishmania aethiopica*. A atividade de extratos cetônicos de *Vitex trifolia*, obtidos a partir de frutas dessa família, foi comprovada sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (KIUCHI et al., 2004).

Dentre os gêneros da família Verbenaceae, destaca-se o de *Lippia*, com cerca de 200 espécies, distribuídas nas Américas do Sul e Central e na África tropical. No Brasil, a ocorrência destas espécies é de 70 a 75% (VICCINI et al., 2006). As espécies de *Lippia* são utilizadas, pela medicina tradicional, principalmente para tratar problemas respiratórios, gastrointestinais e de pele, além de apresentarem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antimaláricas e anti-giardia (PASCUAL et al., 2001; AJAIYEOBA et al., 2006; MESA et al., 2009; MACHADO et al., 2010).

A atividade tripanocida também foi demonstrada em plantas de *Lippia* sp. Extratos orgânicos de *Lippia integrifolia* inibiram o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (SÜLSEN et al., 2006). Óleos essenciais de *L. alba* apresentaram forte atividade contra as formas epimastigotas e amastigotas do parasito, e os óleos essenciais de *L. origanoides* foram ativos contra as formas amastigotas de *T. cruzi* (ESCOBAR et al., 2010). *Lippia sidoides* Cham., uma

das espécies investigadas neste estudo, mostrou atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA et al., 2009).

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- 1) Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de 92 extratos etanólicos brutos de plantas da família Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae em formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*.
- 2) Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de 15 extratos etanólicos e frações de seis espécies de *Lippia*, Verbenaceae, em formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.
- 3) Avaliar o potencial citotóxico das amostras de maior atividade tripanocida em fibroblastos da linhagem LLCMK₂.
- 4) Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* das amostras mais potentes de *Lippia* sp. sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.
- 5) Avaliar, *in vivo*, o potencial tripanocida das amostras mais potentes de *Lippia* sp. em *Mus musculus*, linhagem BALB/c, infectados com formas tripomastigotas da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasitas

Nos ensaios, foram utilizadas as cepas Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) e Bolívia (FUNAYAMA; PRADO JÚNIOR, 1974), pertencentes às linhagens I e II, respectivamente, e o clone B5 da cepa CL-Brener, que contém o gene da β -galactosidase, o qual confere alta especificidade e sensibilidade aos ensaios farmacológicos (BUCKNER et al., 1996). As cepas Y e Bolívia são mantidas em camundongos BALB/c e em meio LIT - *Liver Infusion Tryptose* (FERNANDES; CASTELLANI, 1966), em estufa BOD à temperatura de 28°C, no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP/UNESP. O clone B5 da CL-Brener é mantido no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP/USP, em meio LIT e em meio RPMI.

4.2. Material botânico e extração

4.2.1. Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae

O material vegetal foi coletado pela Dra. Maria Cláudia Marx Young em regiões de remanescentes de Mata Atlântica e Cerrado no Estado de São Paulo, sendo identificado pela Dra. Inês Cordeiro [Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo – SP (IBt-SMA)]. As exsiccatas foram depositadas no herbário “Maria Eneyda P. Kaufmann”, no IBT-SMA, e os códigos dos extratos e exsiccatas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Extratos etanólicos de plantas das famílias Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae avaliados sobre as formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*

| Annonaceae | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Extrato/ No. exsicata | Espécies | Parte da planta | Extrato/ No. exsicata | Espécies | Parte da planta |
| M723 | <i>Rollinea sericea</i> | Galhos | Rm98 | <i>Xylopia langsdorfiana</i> | Folhas |
| M1103 | <i>Xylopia aromatica</i> | Frutos | Rm99 | <i>Xylopia langsdorfiana</i> | Galhos |
| M1143 | <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> | Folhas | Am03 | <i>Guatteria elliptica</i> | Galhos |
| M1144 | <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> | Galhos | Am115 | <i>Rollinea sericea</i> | Galhos |
| R123 | <i>Annona cacans</i> | Folhas | Am145 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Folhas |
| R124 | <i>Annona cacans</i> | Galhos | Am146 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Galhos |
| R278 | <i>Guatteria australis</i> | Folhas | Am223 | <i>Annona coriacea</i> | Folhas |
| R279 | <i>Guatteria australis</i> | Galhos | Am224 | <i>Annona coriacea</i> | Galhos |
| R286 | <i>Xylopia aromatica</i> | Folhas | Am338 | <i>Guatteria nigrescens</i> | Folhas |
| R287 | <i>Xylopia aromatica</i> | Galhos | Am339 | <i>Guatteria nigrescens</i> | Galhos |
| R316 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Frutos | Am352 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Folhas |
| R404 | <i>Annona cornifolia</i> | Folhas | Am379 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Galhos |
| R405 | <i>Annona cornifolia</i> | Galhos | Am468 | <i>Guatteria elliptica</i> | Folhas |
| Rm12 | <i>Rollinea sericea</i> | Folhas | Am469 | <i>Guatteria elliptica</i> | Galhos |
| Apiaceae | | | Cucurbitaceae | | |
| M 861 | <i>Hydrocotyle banariensis</i> | Folhas | Am 109 | <i>Cayaponia tayiuya</i> | Frutos |
| | | | Am 110 | <i>Cayaponia tayiuya</i> | Galhos |
| Moraceae | | | | | |
| Am29 | <i>Dorstenia arifolia</i> | Galhos | | | |
| Lauraceae | | | | | |
| M686 | <i>Nectandra oppositifolia</i> | Folhas | R173 | <i>Ocotea velutina</i> | Galhos |
| M687 | <i>Nectandra grandiflora</i> | Folhas | R188 | <i>Ocotea silvestris</i> | Folhas |
| M698 | <i>Nectandra grandiflora</i> | Galhos | R189 | <i>Ocotea silvestris</i> | Galhos |
| M819 | <i>Nectandra membranacea</i> | Folhas | R388 | <i>Ocotea megabotamica</i> | Folhas |
| R174 | <i>Nectandra aspidata</i> | Folhas | R389 | <i>Ocotea megabotamica</i> | Galhos |
| R175 | <i>Nectandra aspidata</i> | Galhos | R429 | <i>Ocotea pulchella</i> | Folhas |
| Rm128 | <i>Nectandra membranaceae</i> | Folhas | R430 | <i>Ocotea pulchella</i> | Galhos |
| Am12 | <i>Nectandra cissiflora</i> | Galhos | Am71 | <i>Ocotea laxa</i> | Folhas |
| Am46 | <i>Nectandra membranaceae</i> | Galhos | Am72 | <i>Ocotea laxa</i> | Galhos |
| Am257 | <i>Nectandra cuspidata</i> | Folhas | Am73 | <i>Ocotea elegans</i> | Folhas |
| Am258 | <i>Nectandra cuspidata</i> | Galhos | Am74 | <i>Ocotea elegans</i> | Galhos |
| M614 | <i>Ocotea aciphylla</i> | Galhos | Am92 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Folhas |
| M809 | <i>Ocotea odorifera</i> | Galhos | Am93 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Frutos |
| M823 | <i>Ocotea velloziana</i> | Folhas | Am94 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Galhos |
| M849 | <i>Ocotea odorifera</i> | Folhas | Am245 | <i>Ocotea corymbosa</i> | Folhas |
| R59 | <i>Ocotea indecora</i> | Folhas | Am246 | <i>Ocotea corymbosa</i> | Galhos |
| R60 | <i>Ocotea indecora</i> | Galhos | Am447 | <i>Ocotea teleiandra</i> | Folhas |
| R172 | <i>Ocotea velutina</i> | Folhas | Am448 | <i>Ocotea teleiandra</i> | Galhos |
| Nyctaginaceae | | | | | |
| R17 | <i>Bougainvillea sp.</i> | Folhas | Am116 | <i>Guapira opposita</i> | Folhas |
| R18 | <i>Bougainvillea sp.</i> | Galhos | Am117 | <i>Guapira opposita</i> | Galhos |
| R148 | <i>Pisonia ambigua</i> | Folhas | Am202 | <i>Guapira noxia</i> | Folhas |
| R149 | <i>Pisonia ambigua</i> | Galhos | Am203 | <i>Guapira noxia</i> | Galhos |
| Verbenaceae | | | | | |
| M872 | <i>Lantana undulata</i> | Folhas | Am158 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Folhas |
| M873 | <i>Lantana undulata</i> | Galhos | Am159 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Galhos |
| M943 | <i>Starchytarpheta cayenensis</i> | Folhas | Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Frutos |
| M944 | <i>Starchytarpheta cayenensis</i> | Galhos | Am270 | <i>Lippia velutina</i> | Folhas |
| R184 | <i>Aegiphilla sellowiana</i> | Folhas | Am271 | <i>Lippia velutina</i> | Galhos |
| R185 | <i>Aegiphilla sellowiana</i> | Galhos | Am371 | <i>Lippia lupulina</i> | Folhas |
| R297 | <i>Lippia salviaefolia</i> | Folhas | Am372 | <i>Lippia lupulina</i> | Galhos |
| R298 | <i>Lippia salviaefolia</i> | Galhos | Am373 | <i>Lippia lupulina</i> | Flores |

Após coleta, o material botânico foi seco ao abrigo da luz, sendo pulverizado em moinho de facas. Uma alíquota de 30,0 g do pó foi extraído com etanol (5 x 100 mL), durante três semanas, em temperatura ambiente. Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, produzindo os extratos brutos.

Dos 92 extratos etanólicos avaliados, 28 pertenciam aos gêneros *Rollinia*, *Xylopi*a, *Anaxagorea*, *Annona*, *Guatteria*, *Duguetia*, da família Annonaceae; 01, ao *Hydrocotyle*, Apiaceae; 02, ao *Cayaponia*, Cucurbitaceae; 36, ao *Nectandra* e *Ocotea*, Lauraceae; 01, ao *Dorstenia*, pertencente à Moraceae; 08, ao *Bougainvilleae*; *Pisonia* e *Guapira*, da família Nyctaginaceae; e 16, ao *Lantana*, *Starchytarpheta*, *Aegiphilla* e *Lippia*, Verbenaceae (Tabela 1).

4.2.2. *Lippia* sp., Verbenaceae

As partes aéreas de *L. salviaefolia* Cham. e de *L. velutina* foram coletadas em Mogi-Guaçu (São Paulo) em 2006 (voucher n° Lima 90 e n° Brumati TI73, respectivamente) e identificadas pela Dra. Inês Cordeiro (“Herbarium Maria Eneida P. Kaufmann” - Instituto Botânico de São Paulo, São Paulo, Brasil). As partes aéreas de *L. balansae* Briq. e de *L. lasiocalycina* Cham. foram coletadas, em 2008, respectivamente em Santa Cruz do Rio Pardo e Pratânia (São Paulo) (voucher n° FEA 402 e n° FEA 3556, respectivamente), e identificadas pela Dra. Giselda Durigan (Herbarium Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis, São Paulo, Brasil). As partes aéreas e as raízes de *L. lupulina* Cham. e de *L. sidoides* Cham. foram coletadas em Iaras (São Paulo) em 2009 (voucher n° FEA 3638 e n° FEA 3639,

respectivamente) e identificadas pela Dra. Giselda Durigan (Herbarium Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis, São Paulo, Brasil).

O material foi seco em estufa a 45°C e pulverizado em moinho de facas, e a extração foi realizada com etanol (3,5 ml/g, três etapas de 24 h) à temperatura ambiente. Os extratos etanólicos de folhas (EELLSal) e ramos (EESLSal) de *L. salviaefolia* Cham.; de flores (EEFLb), folhas (EELLb) e ramos (EESLb) de *L. balansae* Briq.; de folhas e ramos associados (EELSLas) de *L. lasiocalycina* Cham.; de folhas (EELLSid), ramos (EESLSid) e raízes (EERLSid) de *L. sidoides* Cham.; de flores (EEFLlup), folhas (EELLlup), raízes (EERLlup) e ramos (EESLlup) de *L. lupulina* Cham.; de folhas (EELLv) e ramos (EESLv) de *L. velutina* foram concentrados em rotaevaporador a 40°C (Tabela 2).

O extrato EELLSal (40,0 g) foi diluído em MeOH-H₂O 8:2 (v/v) (650 ml) e extraído com Hexano (5 x 300 ml) a fim de obter a fração FHex1 (3,2 g), após a evaporação do solvente sob pressão reduzida. Água foi adicionada à fase hidrometanólica 45:55 (v/v), seguido de extração com EtOAc (3 x 300 ml) para obter a fração FAc1 (25,6 g). A fase hidrometanólica foi concentrada, diluída em água (800 ml) e extraída com *n*-BuOH (3 x 270 ml), obtendo as frações FBU1 (2,1 g) e FAq1 (1,6 g). Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador a 40°C. Os mesmos procedimentos foram realizados com os outros extratos de *Lippia* sp., mantendo-se sempre a proporção entre extrato seco e MeOH-H₂O 8:2 (v/v) e entre solventes.

Tabela 2. Amostras de *Lippia* sp. avaliadas sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi*

| Espécies | Parte da Planta | Extrato bruto (EE) ¹ / Fração (F) ² | Espécies | Parte da Planta | Extrato bruto (EE) ¹ / Fração (F) ² |
|-------------------------|-----------------|--|--------------------|-----------------|--|
| <i>L. salviaefolia</i> | Folhas | EELLSal1 | <i>L. sidoides</i> | Ramos | FAc8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Folhas | FHex1 | <i>L. sidoides</i> | Ramos | FBu8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Folhas | FAc1 | <i>L. sidoides</i> | Ramos | FAq8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Folhas | FBu1 | <i>L. sidoides</i> | Raízes | EERLsid9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Folhas | FAq1 | <i>L. sidoides</i> | Raízes | FHex9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Ramos | EESLSal2 | <i>L. sidoides</i> | Raízes | Fact9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Ramos | FHex2 | <i>L. sidoides</i> | Raízes | FBu9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Ramos | FAc2 | <i>L. sidoides</i> | Raízes | FAq9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Ramos | FBu2 | <i>L. lupulina</i> | Flores | EEFLlup10 |
| <i>L. salviaefolia</i> | Ramos | FAq2 | <i>L. lupulina</i> | Flores | FAc10 |
| <i>L. balansae</i> | Flores | EEFLb3 | <i>L. lupulina</i> | Flores | FBu10 |
| <i>L. balansae</i> | Flores | FHex3 | <i>L. lupulina</i> | Flores | FAq10 |
| <i>L. balansae</i> | Flores | FAc3 | <i>L. lupulina</i> | Folhas | EELLlup11 |
| <i>L. balansae</i> | Flores | FBu3 | <i>L. lupulina</i> | Folhas | FHex11 |
| <i>L. balansae</i> | Folhas | EELLb4 | <i>L. lupulina</i> | Folhas | FAc11 |
| <i>L. balansae</i> | Folhas | FHex4 | <i>L. lupulina</i> | Folhas | FBu11 |
| <i>L. balansae</i> | Folhas | FAc4 | <i>L. lupulina</i> | Ramos | EESLlup12 |
| <i>L. balansae</i> | Folhas | FBu4 | <i>L. lupulina</i> | Ramos | FHex12 |
| <i>L. balansae</i> | Ramos | EESLb5 | <i>L. lupulina</i> | Ramos | FAc12 |
| <i>L. balansae</i> | Ramos | FHex5 | <i>L. lupulina</i> | Ramos | FBu12 |
| <i>L. balansae</i> | Ramos | FAc5 | <i>L. lupulina</i> | Raízes | EERLlup13 |
| <i>L. balansae</i> | Ramos | FBu5 | <i>L. lupulina</i> | Raízes | FAc13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | Folhas e Ramos | EELSLias6 | <i>L. lupulina</i> | Raízes | FBu13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | Folhas e Ramos | FHex6 | <i>L. lupulina</i> | Raízes | FAq13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | Folhas e Ramos | FAc6 | <i>L. velutina</i> | Folhas | EELLv14 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | Folhas e Ramos | FBu6 | <i>L. velutina</i> | Folhas | FHex14 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | Folhas e Ramos | FAq6 | <i>L. velutina</i> | Folhas | FAc14 |
| <i>L. sidoides</i> | Folhas | EELLSid7 | <i>L. velutina</i> | Folhas | FBu14 |
| <i>L. sidoides</i> | Folhas | FHex7 | <i>L. velutina</i> | Ramos | EESLv15 |
| <i>L. sidoides</i> | Folhas | FAc7 | <i>L. velutina</i> | Ramos | FHex15 |
| <i>L. sidoides</i> | Folhas | FBu7 | <i>L. velutina</i> | Ramos | FAc15 |
| <i>L. sidoides</i> | Ramos | EESLsid8 | <i>L. velutina</i> | Ramos | FBu15 |
| <i>L. sidoides</i> | Ramos | FHex8 | | | |

¹EE: extrato etanólico de dada espécie; ²FHex: fração hexânica; FAc: fração de acetato de etila; FBu: fração de n-butanol; FAq: fração aquosa

4.3. Ensaio *in vitro* da atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*

A atividade tripanocida dos 92 extratos etanólicos brutos de plantas da família Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae foi avaliada por meio do método de MTT, com modificações (MUELAS-SERRANO et al., 2000). Tal metodologia é baseada na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] a formazam, que, por sua vez, avalia a atividade metabólica ou a viabilidade de células de cultura (SIEUWERTS et al., 1995).

As formas epimastigotas (1.10^7 parasitos/ml), obtidas do cultivo em fase estacionária, foram cultivadas em placas de 96 poços em estufa BOD a 28°C, por 72 horas, com os extratos etanólicos nas concentrações de 500, 350, 250 e 100 µg/ml. Após esse período, as soluções de MTT (2,5 mg/ml) e de PMS (0,22 mg/ml) foram adicionadas em cada poço, e a placa foi incubada por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100 µl de HCl (1M) e SDS (10%). A placa foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Como controle positivo, foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações e, como controle negativo, meio de cultura LIT.

A porcentagem de atividade (%AE) foi expressa de acordo com a fórmula: $\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \times 100$, em que:

AE = absorvância dos poços tratados;

AEB = absorvância dos poços contendo os extratos;

AC = absorvância dos poços contendo o controle negativo (somente as formas epimastigotas);

ACB = absorvância dos poços contendo o controle positivo (somente meio de cultura LIT).

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados, expressos como IC₅₀, calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do *software GraphPad prisma 4.0*.

4.4. Ensaio *in vitro* da atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*

A atividade tripanocida dos 15 extratos etanólicos e frações de seis espécies de *Lippia*, Verbenaceae foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando CPRG (*Chlorophenol red b-D-galactopyranoside*) (BUCKNER et al., 1996).

As formas epimastigotas (1.10⁵ parasitos/ml), obtidas do cultivo em fase estacionária, foram cultivadas em placas de 96 poços em estufa BOD a 28°C, por 24 horas, com os extratos etanólicos e frações nas concentrações de 32, 8, 2 e 0,5 µg/ml. Após esse período, a solução de CPRG (*Chlorophenol red β-D-galactopyranoside*, 400 µM em 0,3% Triton X-100, pH 7.4) (50µl) foi adicionada em cada poço, e as placas foram incubadas a 28°C, em estufa BOD, por 6 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Como controle positivo, foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações e, como controle negativo, meio de cultura LIT.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \times 100, \text{ em que:}$$

AE = absorvância dos poços tratados;

AEB = absorbância dos poços contendo meio e os extratos/frações;

AC = absorbância dos poços contendo somente as formas epimastigotas;

ACB = absorbância dos poços contendo somente meio de cultura LIT.

Os resultados expressos como IC₅₀ foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoideal, por meio do *software GraphPad prisma 4.0*.

4.5. Ensaio de citotoxicidade

As amostras que apresentaram atividade tripanocida acima de 50% sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade em fibroblastos da linhagem LLCMK₂, por meio do método de MTT, com modificações (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

As células LLCMK₂ (1.10⁶ /ml) foram cultivadas em placas de 96 poços com os extratos etanólicos nas concentrações de 500, 350, 250 e 100 µg/ml, para as amostras avaliadas sobre as cepas Y e Bolívia, e com os extratos e frações nas concentrações de 32, 8, 2 e 0,5 µg/ml, para as amostras avaliadas sobre o clone B5 da cepa CL-Brener. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 24 horas. Após esse período, foram adicionados, em cada poço, 10 µL da solução de MTT (5mg/ml), e as placas foram incubadas por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 100 µl de isopropanol-ácido, e a placa foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura RPMI e, como positivo, células LLCMK₂.

A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela seguinte fórmula:

% citotoxicidade = $1 - [(Y-N)/(N-P)] * 100$, em que:

Y = absorvância dos poços com células LLCMK₂ e diferentes concentrações das amostras;

N = absorvância dos poços com células LLCMK₂;

P = absorvância dos poços com meio de cultura RPMI incolor.

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados, expressos como CC₅₀, calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do *software GraphPad prisma 4.0*.

A atividade citotóxica (CC₅₀) foi relacionada com a atividade tripanocida (IC₅₀) para a determinação do Índice de Seletividade correspondente (IS=CC₅₀/IC₅₀).

4.6. Ensaio sobre as formas tripomastigotas

O ensaio foi realizado pelo método colorimétrico utilizando CPRG (BUCKNER et al., 1996) nas amostras de *Lippia* sp. que apresentaram atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e baixa toxicidade para as células LLCMK₂.

Inicialmente, células da linhagem LLCMK₂ foram infectadas com, aproximadamente, 1.10⁶ formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener. Após um período de, aproximadamente, 15 dias, grandes quantidades de formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante dessas culturas em consequência da lise das células repletas de parasitos.

O sobrenadante obtido desses cultivos, contendo as formas tripomastigotas juntamente com algumas células, foi submetido à centrifugação (115 g por 8 minutos, a 10°C), o sedimento, contendo principalmente células, foi desprezado e o sobrenadante foi novamente

centrifugado (1.620 g por 30 minutos, a 10°C). Após essa etapa, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI incolor, e as formas tripomastigotas submetidas à contagem, para ajustar as quantidades de parasitos utilizadas nos procedimentos experimentais.

As formas parasitárias (1.10⁶ parasitos/ml), obtidas do cultivo acima descrito, foram cultivadas em placas de 96 poços em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 24 horas, às várias concentrações (32, 8, 2, 0,5 µg/ml). Após esse período, 50µl da solução de CPRG (*Chlorophenol red b-D-galactopyranoside*, 400 µM em 0,3% Triton X-100, pH 7.4) foram adicionados, e a placa, incubada a 28°C, em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 6 horas. A absorbância obtida foi lida em 570 nm. Como controle positivo, foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações e, como controle negativo, meio de cultura RPMI incolor.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \times 100, \text{ em que:}$$

AE = absorbância dos poços tratados;

AEB = absorbância dos poços contendo meio de cultura e o material analisado;

AC = absorbância dos poços contendo somente as formas tripomastigotas;

ACB = absorbância dos poços contendo somente meio de cultura RPMI incolor.

Os resultados expressos como IC₅₀ foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do *software GraphPad prisma 4.0*.

4.7. Ensaio sobre as formas amastigotas

Este ensaio foi conduzido por meio do método colorimétrico utilizando CPRG (BUCKNER et al., 1996 – com modificações) nas amostras de *Lippia* sp. que apresentaram atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e baixa toxicidade para as células LLCMK₂.

Inicialmente, 100 µL de células LLCMK₂ ($2,5 \cdot 10^3$ células/ml) foram adicionados em placas de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 12 horas. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionaram-se 100 µL de formas tripomastigotas ($2,5 \cdot 10^4$ parasitas/ml), obtidas de cultivo celular. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS, a fim de remover as formas parasitárias que não penetraram nas células.

Após tais procedimentos, as amostras foram adicionadas nas concentrações de 32, 8, 2, 0,5 µg/ml, e a placa incubada em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, por 24 horas. Em seguida, 50µl da solução de CPRG (*Chlorophenol red b-D-galactopyranoside*, 400 µM em 0,3% Triton X-100, pH 7.4) foram adicionados, e a placa, incubada a 28°C, em estufa BOD, por 6 horas. A absorbância obtida foi lida em 570 nm. Como controle positivo, foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações e, como negativo, meio de cultura RPMI incolor.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \times 100, \text{ em que:}$$

AE = absorbância dos poços tratados;

AEB = absorbância dos poços contendo meio de cultura e o material analisado;

AC = absorbância dos poços contendo somente as formas tripomastigotas;

ACB = absorbância dos poços contendo somente meio de cultura RPMI incolor.

Os resultados expressos como CC_{50} foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoïdal, por meio do *software GraphPad prisma 4.0*.

4.8. Avaliação da atividade tripanocida *in vivo* em camundongos BALB/c

O ensaio foi realizado com as amostras de *Lippia* sp. que apresentaram atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e baixa toxicidade para as células LLCMK₂. A atividade tripanocida, na fase aguda da doença, foi avaliada por meio dos parâmetros: tempo de sobrevivência e parasitemia.

Neste ensaio, foram utilizados camundongos BALB/c machos, pesando aproximadamente 20 mg, divididos randomicamente em cinco grupos, no qual foi efetuada a análise da atividade de cada amostra, como segue:

Grupo I – controle negativo sem infecção – 5 animais;

Grupo II – controle negativo infectado – 5 animais inoculados intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/ml, no qual foi avaliado o comportamento parasitêmico da cepa, em face dos animais utilizados;

Grupo III – controle negativo do solvente – 5 animais inoculados intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/ml e tratados, durante 15 dias, apenas com o solvente DMSO, utilizado na dissolução dos extratos e frações,

após 48h da inoculação, no qual foi avaliada a possibilidade de atividade do solvente;

Grupo IV – grupo tratado – após 48h da inoculação intraperitoneal dos parasitos (4×10^4 tripomastigotas/ml), 5 animais foram tratados com as amostras de *Lippia* sp. mais ativas sobre as formas epimastigotas do parasito, na dosagem correspondente a 8mg/Kg de peso corpóreo, por via oral, durante 15 dias;

Grupo V – controle positivo – 5 animais inoculados intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/ml, que foram tratados com benzonizadol na dosagem correspondente a 8mg/Kg de peso corpóreo, durante 15 dias, após 48h da inoculação.

As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de 5 µl de sangue da cauda de cada animal em experimentação, a cada 48h, sendo o número de parasitos quantificados de acordo com Brener (1962).

Os ensaios foram realizados em paralelo e a análise estatística efetuada por meio do *software GraphPad prisma 4.0*. Os grupos foram comparados por meio do teste One-Way ANOVA, com análise de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade tripanocida das amostras foi classificada de acordo com os critérios estabelecidos por Osorio et al. (2007). Os extratos/frações foram classificados como altamente ativos ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), ativos ($10 < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$), moderadamente ativos ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$) e inativos ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). Em relação à citotoxicidade, as amostras foram classificadas como altamente tóxicas ($CC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), tóxicas ($10 < CC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$), moderadamente tóxicas ($100 < CC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$) e potencialmente não tóxicas ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$).

5.1. Atividade tripanocida e citotoxicidade dos extratos etanólicos de Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae

Todos os 92 extratos etanólicos testados sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram considerados inativos, segundo a classificação de Osorio et al., (2007) (Tabela 3).

Em relação à cepa Bolívia, o extrato de frutos de *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) (Am93) foi considerado ativo, com IC_{50} de 26,93, enquanto o extrato de frutos de *Aegiphilla lhotzkyana* (Verbenaceae) (Am160), IC_{50} de 90,89, foi moderadamente ativo sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 4). As outras amostras avaliadas sobre esta cepa foram inativas sobre as mesmas formas parasitárias. As curvas de dose-resposta sigmoideal dos extratos de *Ocotea paranapiacabensis*, Lauraceae (Am93) e de *Aegiphilla lhotzkyana*, Verbenaceae (Am160) estão ilustradas na figura 1.

Tabela 3. Atividade tripanocida e citotóxica sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e de fibroblastos da linhagem LLCMK₂, respectivamente

| Nº Extrato | Espécie | Família/ Parte da planta | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | IS | Atividade tripanocida | Citotoxicidade |
|------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|------|-----------------------|----------------------|
| Am93 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Lauraceae Frutos | 179,8 | 392,2 | 2,18 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| R60 | <i>Ocotea indecora</i> | Lauraceae Galhos | 214,8 | 498,2 | 2,32 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Verbenaceae Frutos | 126,0 | 104,1 | 0,83 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| Am116 | <i>Guapira opposita</i> | Nyctaginacea Folhas | 386,4 | 115,9 | 0,30 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| Am379 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Annonaceae Galhos | 250,2 | 52,23 | 0,21 | Inativos | Tóxico |
| Am03 | <i>Guatteria elliptica</i> | Annonaceae Galhos | 345,1 | 103,3 | 0,30 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| Am352 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Annonaceae Folhas | 157,9 | 332,4 | 2,11 | Inativos | Moderadamente tóxico |
| M1103 | <i>Xylopia aromatica</i> | Annonaceae | 253,1 | 98,40 | 0,39 | Inativos | Tóxico |

Benzonidazol - IC₅₀ = 11,77 µg/ml

IC₅₀ - Dose tripanocida efetiva para 50% das formas parasitárias

CC₅₀ - Dose citotóxica para 50% das células LLCMK₂

IS – Índice de Seletividade

Tabela 4 Atividade tripanocida e citotóxica sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi* e de fibroblastos da linhagem LLCMK₂, respectivamente

| Nº Extrato | Espécie | Família/ Parte da planta | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | IS | Atividade tripanocida | Citotoxicidade |
|------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|-----------------------|----------------------|
| Am93 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Lauraceae Frutos | 26,93 | 392,2 | 14,56 | Ativo | Moderadamente tóxico |
| Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Verbenaceae Frutos | 90,89 | 104,1 | 1,150 | Moderadamente ativo | Moderadamente tóxico |

Benzonidazol - IC₅₀ = 0,99 µg/ml

IC₅₀ - Dose tripanocida efetiva para 50% das formas parasitárias

CC₅₀ - Dose citotóxica para 50% das células LLCMK₂

IS – Índice de Seletividade

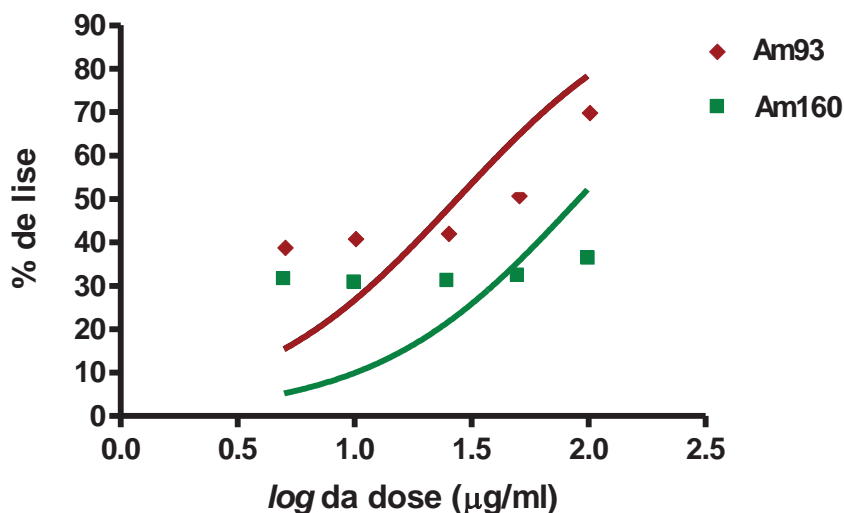


Figura 1. Curva de dose-resposta sigmoidal dos extratos de frutos de *Ocotea paranapiacabensis*, Lauraceae (Am93) e de frutos de *Aegiphilla lhotzkyana*, Verbenaceae (Am160), avaliados sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi*.

Os valores de IC₅₀ do benzonidazol sobre as formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia foram de 0,99 e 11,77, respectivamente (Tabelas 3 e 4).

Para a análise de citotoxicidade, o extrato de *Duguetia lanceolata* (Am379) e o de *Xylopia aromatica* (M1103) foram classificados como tóxicos para as células LLCMK₂; já os extratos de *Ocotea paranapiacabensis* (Am93), de *Ocotea elegans* (Am73), de *Ocotea indecora* (R60), de *Aegiphilla lhotzkyana* (Am160), de *Guapira opposita* (Am116), de *Guatteria elliptica* (Am03) e o de *Duguetia lanceolata* (Am352) foram moderadamente tóxicos (Tabelas 3 e 4).

Caracterizaram-se como amostras mais promissoras aquelas que se mostraram ativas contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* e menos tóxicas para a linhagem celular LLCMK₂.

De acordo com essa classificação, os extratos mais promissores para investimento químico-farmacológico foram: 1) o de frutos de *Ocotea*

paranapiacabensis, Lauraceae (Am93), por se mostrar ativo sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia e moderadamente tóxico para as células LLCMK₂, com IS de 14,56; e 2) o de frutos de *Aegiphilla lhotzkyana*, Verbenaceae (Am160), com atividade moderada contra os parasitos e as células LLCMK₂ e IS de 1,15, também testados sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia.

Ao comparar a atividade tripanocida dos extratos sobre a cepa Y e a cepa Bolívia, observou-se diferença de ação entre essas duas cepas. O material testado sobre a cepa Y não apresentou atividade satisfatória. Em contrapartida, dois extratos, o de *Ocotea paranapiacabensis* (Am93) e o de *Aegiphilla lhotzkyana* (Am160), avaliados sobre a cepa Bolívia, mostraram-se, respectivamente, ativos e moderadamente ativos sobre essas formas parasitárias.

Essa diferença na sensibilidade entre as cepas pode ser explicada pelo fato de que as populações de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade intraespecífica, evidenciada por diferenças na morfologia, virulência, patogenicidade, habilidade de evasão à resposta imune do hospedeiro, constituição antigênica e propriedades bioquímicas (FERNANDES et al., 1998; TIBAYRENC; AYALA, 2002).

A atividade tripanocida do extrato etanólico de *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) sobre as formas epimastigotas da cepa Bolívia é relatada pela primeira vez neste trabalho. Dados da literatura demonstram a atividade de alcaloides isolados de *Ocotea odorifera* contra as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *L. donovani* e *L. amazonensis* e tripomastigotas do *T. cruzi* (FOURNET et al., 2007). Os extratos de galhos e

raízes dessa mesma espécie foram ativos contra *Plasmodium falciparum*. A medicina popular indica a utilização dessas plantas no tratamento de dermatoses, reumatismo, febre e sífilis (BOTSARIS, 2007).

A *Aegiphilla lhotzkyana* (Verbenaceae), que apresentou atividade tripanocida contra a cepa Bolívia, é amplamente distribuída no nordeste do Brasil, onde é conhecida como “pau-de-sebo”. O óleo obtido de suas frutas é empregado pela medicina popular no combate à pediculose e à escabiose, e o extrato é utilizado como antídoto para picada de cobra (COSTA-LOTUFO, 2004). A ação desse extrato bruto era inédita até a realização deste trabalho, pois não se encontram na literatura relatos sobre a ação tripanocida dessa espécie, tampouco sobre o gênero ao qual ela pertence.

5.2. Atividade tripanocida das amostras de *Lippia* sp, Verbenaceae

5.2.1. Sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e citotoxicidade em células LLCMK₂

Dentre os 15 extratos etanólicos avaliados, o de folhas de *L. velutina* (EELLv14) foi moderadamente ativo ($IC_{50} = 52,1 \mu\text{g/ml}$) sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Em relação às suas frações, a de acetato de etila (FAC14) foi altamente ativa para as mesmas formas parasitárias de *T. cruzi* ($IC_{50} = 0,7 \mu\text{g/ml}$), com atividade tripanocida 42x maior do que a do benzonidazol ($IC_{50} = 30,8 \mu\text{g/ml}$) e a de hexano (FHex14) ativa contra o parasito, $IC_{50} = 36,0 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 5). O parâmetro que balizou essas observações foi a classificação de Osorio et al. (2007).

Tabela 5. Atividade tripanocida e citotóxica de espécies de *Lippia* sp. sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e de fibroblastos da linhagem LLCMK₂, respectivamente

| Espécies | Parte da planta | Extrato bruto (EE)/ Fração (F) | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | IS | Atividade tripanocida | Citotoxicidade |
|--|-----------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|-------|-----------------------|----------------------|
| <i>L. velutina</i> | folhas | EELLv14 | 52,1 | 150,9 | 2,8 | Moderadamente ativo | Moderadamente tóxico |
| <i>L. velutina</i> | folhas | FHex14 | 36,0 | 67,6 | 1,8 | Ativo | Tóxico |
| <i>L. velutina</i> | folhas | FAc14 | 0,7 | 274,6 | 371,0 | Altamente ativo | Moderadamente tóxico |
| <i>L. lupulina</i> | folhas | FHex11 | 85,7 | 60,1 | 0,7 | Moderadamente ativo | Tóxico |
| <i>L. lupulina</i> | Ramos | EESLlup12 | 60,9 | 36,6 | 0,6 | Moderadamente ativo | Tóxico |
| Benzonidazol - IC₅₀ = 30,8 µg/ml | | | | | | | |

Em relação à citotoxicidade destas amostras, o extrato etanólico (EELLv14) e sua fração de acetato de etila (FAc14) de folhas de *L. velutina* apresentaram toxicidade moderada (CC₅₀ = 150,9 e 274,6 µg/ml, respectivamente) para as células LLCMK₂, ao passo que a fração de hexano (FHex14) foi tóxica para a mesma linhagem celular (CC₅₀ = 67,6 µg/ml). Embora a fração de acetato de etila (FAc14) tenha apresentado toxicidade moderada, foi a amostra mais seletiva contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, com IS (Índice de Seletividade) de 371,0 (Tabela 5).

O extrato etanólico de ramos de *L. lupulina* (EESLlup12) apresentou atividade moderada contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 60,9 µg/ml), mas foi tóxico contra as células LLCMK₂, com IS de 0,6. Nenhuma atividade foi observada em suas frações, o que pode ser explicado pelo sinergismo entre os compostos presentes no extrato.

A fração de hexano (FHex11) de folhas de *L. lupulina* apresentou atividade moderada contra as formas epimastigotas, com $IC_{50} = 85.7 \mu\text{g/ml}$, mas foi tóxica para as células LLCMK₂, com IS de 0,7 (Tabela 5).

As curvas de dose-resposta sigmoideal dos extratos etanólicos de folhas de *Lippia velutina* (EELLv14) e de ramos de *Lippia lupulina* (EESLlup12) são demonstradas na figura 2. Já as curvas da fração hexânica (FHex14) e de acetato de etila (FAc14) de folhas de *Lippia velutina* e da fração hexânica (FHex11) de folhas de *Lippia lupulina* ilustram-se na figura 3.

Em outros trabalhos, a atividade tripanocida sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* também foi demonstrada em extratos orgânicos de *Lippia integrifolia* e em óleos essenciais de *Lippia alba* (SÜLSEN et al., 2006; ESCOBAR et al., 2010).

Os demais extratos etanólicos e suas frações foram inativos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, segundo a classificação de Osorio et al., (2007), embora outros autores tenham demonstrado a atividade do extrato de *L. sidoides* em *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA et al., 2009).

A atividade tripanocida, *in vitro*, sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e, *in vivo*, em camundongos da linhagem BALB/c foi avaliada com o extrato etanólico (EELLv14) e com a fração de acetato de etila (FAc14) de folhas de *L. velutina*, por serem os únicos a apresentarem atividade sobre as formas epimastigotas do parasito e toxicidade moderada para as células LLCMK₂.

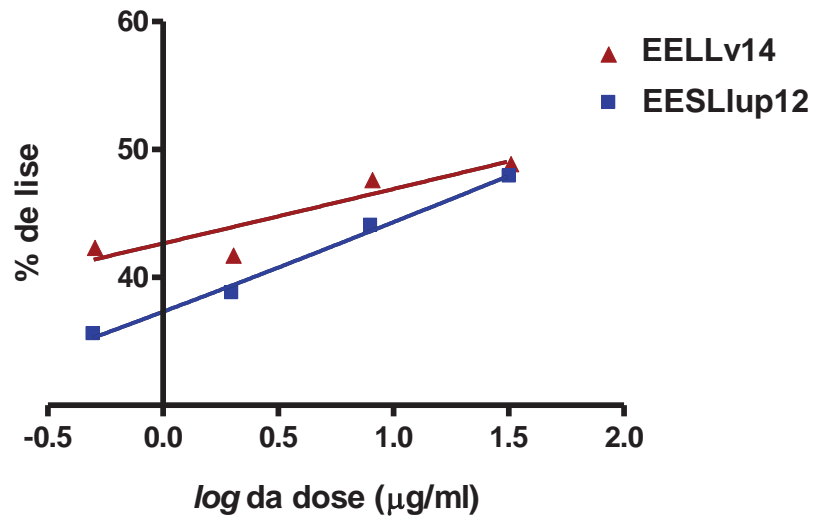


Figura 2. Curva de dose-resposta sigmoidal dos extratos etanólicos de folhas de *Lippia velutina* (EELLv14) e de ramos de *Lippia lupulina* (EESLlup12) avaliados sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

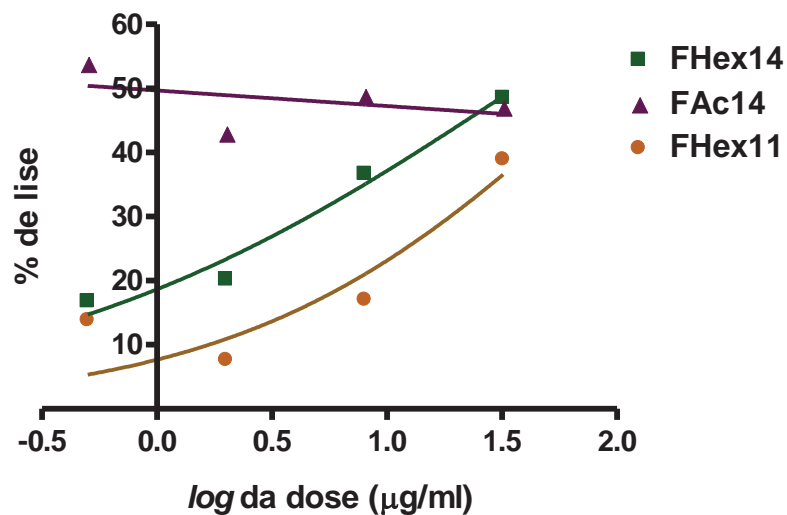


Figura 3. Curva de dose-resposta sigmoidal da fração hexânica (FHex14) e de acetato de etila (FAc14) de folhas de *Lippia velutina* e da fração hexânica (FHex11) de folhas de *Lippia lupulina*, avaliados sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

5.2.2. Sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*

O extrato etanólico (EELLv14) de folhas de *L. velutina* foi inativo contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com IC₅₀ de 172,0 e IS de 0,8. Já a fração de acetato de etila (FAc14) foi moderadamente ativa nessas formas parasitárias (IC₅₀ = 92,3 µg/ml), com IS de 2,9. O IC₅₀ do benzonidazol foi de 20,3 µg/ml (Tabela 6).

A ausência de trabalhos sobre a ação tripanocida de *Lippia velutina* em formas tripomastigotas de *T. cruzi* torna inéditos esses resultados.

Em relação ao ensaio com as formas amastigotas, as duas amostras foram inativas. Embora alguns trabalhos tenham demonstrado a atividade tripanocida de óleos essenciais de *L. alba* e de *L. origanoides* sobre essas formas parasitárias, o resultado obtido neste trabalho pode ser explicado pelo fato de que compostos ativos sobre as formas amastigotas são, geralmente, ativos sobre as formas epimastigotas, mas, devido à alta especificidade dos ensaios com amastigotas, nem sempre o contrário é verdadeiro (OCHOA et al., 1999; MARTINEZ-DIAZ et al., 2001, COURA, CASTRO, 2002).

Tabela 6. Atividade tripanocida e citotóxica de *Lippia* sp. sobre as formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e de fibroblastos da linhagem LLCMK₂, respectivamente

| Espécies | Parte da planta | Extrato bruto (EE)/ Fração (F) | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | IS | Atividade tripanocida | Citotoxicidade |
|--|-----------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----|-----------------------|----------------------|
| <i>L. velutina</i> | folhas | EELLv14 | 172,0 | 150,9 | 0,8 | Inativo | Moderadamente tóxico |
| <i>L. velutina</i> | folhas | FAC14 | 92,3 | 274,6 | 2,9 | Moderadamente ativo | Moderadamente tóxico |
| Benzonidazol - IC₅₀ = 20,3 µg/ml | | | | | | | |

5.2.3. Avaliação da atividade tripanocida, *in vivo*, em camundongos BALB/c

Em vista dos resultados obtidos no ensaio com as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*, a atividade tripanocida do extrato etanólico (EELLv14) de folhas de *L. velutina* e da fração de acetato de etila (FAC14) foi avaliada, *in vivo*, em camundongos BALB/c. Os parâmetros adotados para esta avaliação foram o tempo de sobrevivência dos camundongos e a parasitemia.

A parasitemia sanguínea é um parâmetro importante para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, além de contribuir para o estabelecimento da correlação anatomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993).

De acordo com a curva parasitêmica demonstrada na figura 4, os grupos tratados com o extrato etanólico (EELLv14) de folhas de *L. velutina* e com a fração de acetato de etila (FAC14) não demonstraram atividade biológica, na

concentração de 8 mg/Kg, em relação ao controle negativo infectado e sem tratamento e ao positivo infectado e tratado com benzonidazol.

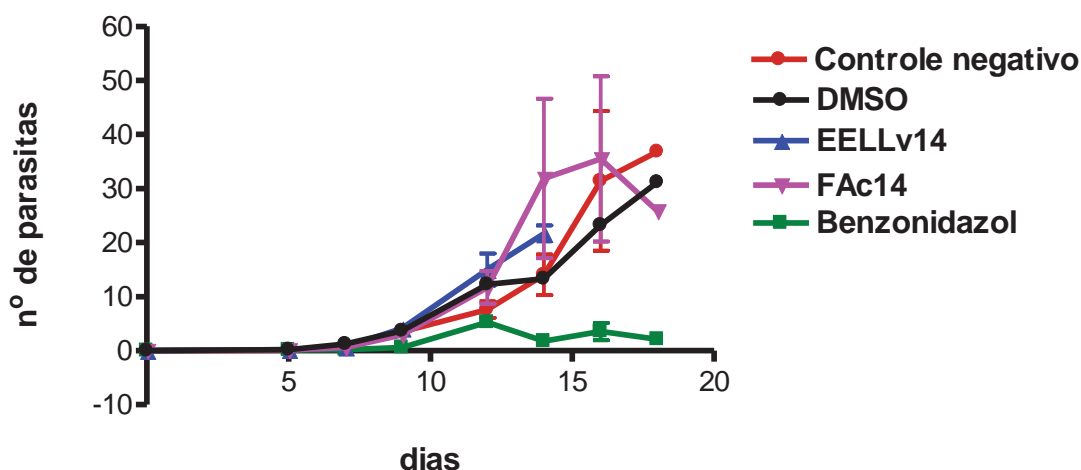


Figura 4. Curva parasitária de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com 4×10^4 tripomastigotas/ml do clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi* e tratados com DMSO, extrato etanólico (EELLv14) e fração de acetato de etila (FAc14) de folhas de *L. velutina* e benzonidazol, na dosagem de 8mg/Kg.

Em relação à sobrevivência dos animais, não houve diferença entre o grupo de animais tratados com as duas amostras de *Lippia* sp. e o controle negativo infectado, pois ambos morreram 15 dias após a infecção.

Já no grupo controle positivo tratado com benzonidazol, os animais tiveram maior sobrevivência do que os do grupo controle negativo infectado, com pico parasitário no 12º dia após a infecção, resultado que é esperado, uma vez que o benzonidazol é eficaz na fase aguda da doença (DOCAMPO, 2001; COURA, 2009).

Embora a fração de acetato de etila (FAC) tenha apresentado atividade moderada, *in vitro*, nas formas tripomastigotas do parasito, ela não diminuiu a parasitemia, *in vivo*, na fase aguda da doença. A ausência de atividade desta amostra pode ser explicada, entre outros, pelos seguintes fatores: 1) a alta capacidade de o *T. cruzi* evadir-se da resposta imune do hospedeiro, o que altera os eventos bioquímicos da célula, interferindo na sua fisiologia, bem como no alvo de ação de drogas; 2) a metabolização de compostos ativos pelo hospedeiro (LIMA-MARTINS et al., 1985).

Até o momento, nenhum trabalho avaliou a atividade tripanocida, *in vivo*, de amostras de *Lippia velutina*, em camundongos BALB/c.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Noventa e dois extratos etanólicos obtidos de plantas das famílias Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae e Verbenaceae foram considerados inativos sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

- Em relação à cepa Bolívia, o extrato de frutos de *Ocotea paranapiacabensis* foi ativo, enquanto o extrato de frutos de *Aegiphilla lhotzkyana* foi moderadamente ativo sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. As duas amostras foram moderadamente tóxicas para as células LLCMK₂.

- Os extratos etanólicos e frações de folhas e ramos de *L. salviaefolia* Cham.; de flores, folhas e ramos de *L. balansae* Briq.; de folhas e ramos associados de *L. lasiocalycina* Cham.; de folhas, ramos e raízes de *L. sidoides* Cham.; de flores e raízes de *L. lupulina* Cham. e de ramos de *L. velutina* foram inativos sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

- O extrato etanólico de ramos de *L. lupulina* apresentou atividade moderada sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*, mas foi tóxico para as células LLCMK₂.

- A fração hexânica de folhas de *L. lupulina* apresentou atividade moderada sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*, mas foi tóxica para as células LLCMK₂.

- O extrato etanólico de folhas de *L. velutina* foi moderadamente ativo sobre as formas epimastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*, e sua fração de acetato de etila foi 42 vezes mais ativa do que o benzonidazol. As duas amostras foram moderadamente tóxicas para as células LLCMK₂.

- A fração de acetato de etila de folhas de *L. velutina* foi moderadamente ativa sobre as formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

- O extrato etanólico de folhas de *L. velutina* e sua fração de acetato de etila foram inativos sobre as formas amastigotas do clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*.

- O extrato etanólico de folhas de *L. velutina* e sua fração de acetato de etila não diminuíram a parasitemia nos camundongos BALB/c, infectados com o clone B5 da cepa CL-Brener de *T. cruzi*, nem aumentaram o tempo de sobrevivência dos animais.

Tais dados corroboram a importância dos esforços para promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira, especialmente focada na busca de novos agentes terapêuticos para o tratamento atual da doença de Chagas, que afeta milhões de pessoas no Brasil, entre outros países.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AKAHANE, H.; OGURA, T.; MARTINEZ-ALFARO, M. A.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants: evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. **Bioll. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 7, p. 1314-1317, 2005.

AJAIYEGBA, E.O.; ABIODUN, O. O.; FALADE, M. O.; OGBOLE, N. O.; ASHIDI, J. S.; HAPPI, C. T.; AKINBOYE, D.O. *In vitro* cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v. 13, p. 295-298, 2006.

ALMEIDA-LEITE, C. M.; GALVÃO, L. M.; AFONSO, L. C.; CUNHA, F. Q.; ARANTES, R. M. Interferon- γ induced nitric oxide mediates *in vitro* neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Neurobiol. Dis.**, n. 25, p. 170-178, 2007.

ALVES, F. M.; ISHII, I. H. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 179-192, 2007.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some types. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 18, n. 2, p. 140-141, 1976.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Supl. I, p. 429-432, 1999.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M.; MELO, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2003.

ATINDEHOU, K. K.; SCHMID, C.; BRUN, R.; KONÉ, M. W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 221-227, 2004.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 1, 2ª. Ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 225p., 2002.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1991.

BASTOS, J. K.; CARVALHO, J.C.; DE SOUZA, G. H.; PEDRAZZI, A. H.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 279-282, 2001.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 65, n. 1, p. 1-4, 1999.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 65, n. 1, p. 1-4, 1999.

BATISTA, JR., J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D.L.; REGASINI, L.O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S.; CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. Natural Chromenes and Chromene Derivatives as Potencial Anti-trypanosomal Agents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 538-540, 2008.

BOCK, M.; GONERT, R.; HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. **Boletín Chileno de Parasitología**, n. 24, p. 13-19, 1969.

BOTSARIS, A. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 1, 2007.

BOURJOT, M.; APEL, C.; MARTIN, M. T.; GRELLIER, P.; NGUYEN, V. H.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Antiplasmodial, antitrypanosomal, and cytotoxic

activities of prenylated flavonoids isolated from the stem bark of *Artocarpus styracifolius*. **Planta Med.**, 2010.

BOZELLI, C. E.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L. Clinical and epidemiological profile of patients with Chagas disease at the University Hospital in Maringá, Paraná, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 1027-1034, 2006.

BRENER, Z. Therapeutic activity a criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: Cançado Jr. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, p. 510-16, 1968.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas'disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 205-212, 1987.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 5, p. 220-224, 1963.

BUAINAIN, A. et al. Estudo da atividade de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* em meio líquido de Warren. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 14, p. 93-102, 1992.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L.; CHAVES, M. C.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. Neolignans from plants in

northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 124, p. 319-324, 2010.

CÁRDENAS, R. C.; ESPINOZA-GÓMEZ, F.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, A.; REYES-LÓPEZ, P. A.; HUERTA-VIERA, M.; ROJAS-LARIOS, F. Active Transmission of Human Chagas Disease in Colima, México. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 9, p. 363-368, 2004.

CASTRO, J. A.; DIAS, E. G. T. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed. Environ. Sci.**, v. 1, p. 19-33, 1988.

CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 53, p. 83-98, 1993.

CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum. Exp. Toxicol.**, v.25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **1**, p. 159-218, 1909.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R.; AMARAL, A. C.; SOUZA, A. D.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M.; LEON, L. L. A pyrimidine- β -carnoline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **J. Nat. Prod.**, v.69, p. 292-294, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V.; SILVEIRA, E. R.; BARROS, M. C.; LIMA, M. A.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M.O.; PESSOA, C. Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphilla lhotzkyana*. **Planta Med.**, v. 70, p. 180-182, 2004.

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

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.

CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 215-220, 1999.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell *in vitro*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 209-218, 1987.

DIAS, J. C. P.; WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas' Disease. In S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo and A. Rassi (ed), **Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine**, v. 92, 1992.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Neto, M., **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2^a. ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 431, 2000.

DIAS, L. C.; DESSOYII, M. A.; SILVAII, J. J. N.; THIEMANNII, O. H.; OLIVAI, G.; ANDRICOPULOII, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 1157-1164, 2001.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The metabolism and mode of action of gentian violet. **Drug metabolism reviews**, New York, v. 22, n. 2-3, p. 161-178, 1990.

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

FAIRLAMB, A. H. Trypanotone metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 89, Suppl. I, p. 37, 1994.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 6, p. 807-811, 1998.

FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Mutagenicity of CL64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug. **Mut. Res.**, v. 171, p. 11-15, 1986.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. Trop. Med.**, v. 76, p. 293-297, 1982.

FILHO, A. A. S.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; BASTOS, J. K. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 42-45, 2004.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO JÚNIOR, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. S. Paulo**, v. 8, n.2, p. 75-81, 1974.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HEATH, S.; HIENY, S.; SHER, A. A cyclic AMP inducible gene expressed during development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 43, p. 133-142, 1990.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2007.

KIUCHI, F.; MATSUO, K.; ITO, M.; QUI, T. K.; HONDA, G. New norditerpenoids with trypanocidal activity from *Vitex trifolia*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 12, p. 1492-1494, 2004.

LAGES-SILVA, E.; FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 401-405, 1990.

LANA, M.; TAFURI, W. L. Em NEVES D. P. **Parasitologia Humana**, 10^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 73-96, 2000.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all know lineages. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 6, p. 1041-1049, 2009.

LIMA-MARTINS, M. V. C.; SANCHEZ, G. A.; KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by proctective antibodies. **Parasite Immunol.**, v. 7, p. 367-376, 1985.

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. I.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S. D.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, n. 96, p. 407-413, 2001.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Rev. Mol. Med.**, Cambridge, v. 4, n.5, p.1-16, 2002.

MACHADO, M.; DINIS, A. M.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; CUSTÓDIO, J. B.; SOUSA, M. C. Anti-giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 1205-1215, 2010.

MARIM, R. G. Definição de parâmetros epidemiológicos e parasitológicos da doença de Chagas em Santander – Colômbia, e características de seu agente etiológico. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 154 f., 2003.

MARTINÉZ-DIAZ, A. A.; ESCÁRIO, J. A., NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, 2001.

MESA, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878-884, 2009.

MIRALHA, J. M. S. As Annonaceae da reserva florestal Ducke, Manaus, AM, Manaus. 1995, 165f. **Tese (Doutorado)**. INPA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1995.

MORELL, M.; THOMAS, M. C.; CABALLERO, T.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M. C. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. **Vaccine**, n. 24, p. 7046-7055, 2006.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 101-107, 2000.

NESSLANY, F. S.; BRUGIER, S.; MOURIÈS, M. A.; LE CURIEUX, F.; MARZIN, D. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalozol. **Mut. Res.**, v. 560, p. 147-158, 2004.

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 919-928, 2003.

OCHOA, C.; PÉREZ, E.; PÉREZ, R.; SUÁREZ, M.; OCHOA, E.; RODRÍGUEZ, H.; GÓMEZ BARRIO, A.; MUELAS, S.; NOGAL, J. J.; MARTÍNEZ, R. A. Synthesis and antiprotozoan properties of new 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5- thiadiazine-2-thione derivatives. **Arzneim-Forsch**, v. 49, p. 764–769, 1999.

OGBADOYI, E. O.; ABDULGANIY, A. O.; ADAMA, T. Z.; OKOGUN, J. I. *In vivo* trypanocidal activity of *Annona senegalensis* Pers. leaf extract against *Trypanosoma brucei brucei*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 85-89, 2007.

OLIVEIRA, V. C.; MOURA, D. M.; LOPES, J. A.; DE ANDRADE, P. P.; DA SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. C. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 630-635, 2007.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PEDROSA, R. C.; DE BEM, A. F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R. C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazol. **Redox Rep.**, Edinburgh, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biológica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 191-208, 1953.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmaceutically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 57–60, 2005.

PIMENOV, M. G.; LEONOV, M. V. The genera of Umbelliferae: a nomenclator. **Royal Botanic Gardens**, 1993.

POLI, P.; MELLO, A. M.; BUSCHINI, A.; MORTARA, R. A.; NORTHFLEET DE ALBUQUERQUE, C.; DA SILVA, S.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. M. Cytotoxic and genotoxic effects of megalzol, an anti-Chagas disease drug, assessed by different short-term tests. **Pharmacol.**, v. 64, 1617-1627, 2002.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A. Cardiopatia Chagásica Crônica. In: Porto CC (Org.). **Doenças do Coração. Prevenção e Tratamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., v. 1, p. 798-807, 1998.

RASSI JUNIOR, A.; MARIN-NETO, J. A. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. **Rev. Soc. Cardiologia de São Paulo**, n. 10: VI-XXXII, 2000.

RASSI, A., RASSI JUNIOR, A.; RASSI, G. G. Fase Aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Org.). ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2ª. ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., p 231-245, 2000.

RAYNAUD-LE, G.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomed. Pharmacother.**, v. 58, p.388-392, 2004.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3 ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, R. D.; FERRIOLI FILHO, F.; BELDA NETO, F. M. Comportamento de subamostras de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 51-54, 1982.

RIBEIRO, A.; PILÓ-VELOSO, D.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 836-838, 1997.

RIBEIRO, J. E. L. et al. Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. **INPA**, P. 816, 1999.

RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosome cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 3555-3558, 2004.

RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progrés Médical**, Paris, v. 101, p. 282, 1973.

RODRIGUES, E. R. Estudos pré-clínicos de possíveis efeitos adversos da Cubebina. 2002. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2002.

SARAIVA, J.; VEJA, C.; ROLON, M.; DA SILVA, R.; SILVA, M. L.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; GOMEZ-BARRIO, A.; DE ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 100, p. 791-795, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p.455-465, 2007.

SCHENONE, H.; CONCHA, L.; ARANDA, R.; ROJAS, A.; ALFARO, E.; KNIERIM, F. Chemotherapeutic activity of a nitroimidazolacetamide compound in chronic chagasic infection. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 30, n. 3-4, p. 91-94, 1975.

SCHENONE, H.; CONCHA, L.; ARANDA, R.; ROJAS, A.; KNIERIM, F.; ROJO, M. Treatment of chronic Chagas' infection with Lampit. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 27, n. 1, p.11-14, 1972.

SCHMUÑIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. **Transfusion**, n. 31, p. 547-557, 1991.

SCHMUÑIS, G.A., DIAS, J.C.P. La reforma del sector salud, descentralización prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. **Cad. Saúde Pública**, n. 16, suppl. 2, p. 117-123, 2000.

SEPULVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B. K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 62, n. 2, p. 98-105, 1996.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth

characteristics, IC-50-values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytother. Res.**, v. 22, p. 1307-1310, 2008.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, Supl. III, p. 5-28, 1994.

SILVEIRA, J. F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas***. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 127-152, 2000

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. Acritical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas disease. **Rev. Instit. Med. Trop. S. Paulo**, v. 35, p. 395-398, 1993.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, J.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitol. Res.**, v. 98, p. 370-374, 2006.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 405-410, 2002.

UCHIYAMA, N.; MATSUNAGA, K.; KIUCHI, F.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 11, p. 1514-1516, 2002.

VAN MIERT, S.; HOSTYN, S.; MAES, B. U.; CIMANGA, K.; BRUN, R.; KAISER, M.; MÁTYUS, P.; DOMMISSE, R.; LEMIÈRE, G.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Isonocryptolepine, a synthetic indoloquinoline alkaloid, as an antiplasmodial lead compound. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 674–677, 2005.

VICCINI, L.F. et al. Chromosome numbers in genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p. 171-178, 2006.

VINHAES, M.C., DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, n. 16, suppl. 2, p. 7-12, 2000.

WEBMEDICOS. Disponível em: www.webmedicos.com.br, 2006. Acesso em: 15 de março de 2010.

WHO – World Health Organization (1991). Control of Chagas' disease. WHO Tech Rep Ser 811.

WHO – World Health Organization (2010). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, access in august 2010.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; NEHME, N. S.; OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A.; SOUTO, R. P. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 811-8114, 1997.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American tripanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 105-112, 1998.

CAPÍTULO 2 – Artigos Científicos

1) Screening for trypanocidal activity of six species of *Lippia* (Verbenaceae) native in Brazil

Renata Tomé Alves^{a*}, Cristiano Soleo Funari^b, Luis Octávio Regasini^b, Thais Gaban Passalacqua^b, Aline Rimoldi^c, Vanderlan da Silva Bolzani^b, Dulce Helena Siqueira Silva^b, Sérgio de Albuquerque^d, João Aristeu da Rosa^a

^aUniversidade Estadual Paulista, Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara/Jau, Km1, CEP 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

^bUniversidade Estadual Paulista, Instituto de Química, CP 355, CEP 14801-970, Araraquara, SP, Brasil

^cUniversidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Rua Monteiro Lobato, 255, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

^dUniversidade de São Paulo, Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Avenida do Café s/n, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil

*Corresponding author. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Parasitologia

Rodovia Araraquara/Jau, Km1, CEP: 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

Tel.: +55 16 33016943, Fax: +55 16 33016940, e-mail address: rosaja@fctar.unesp.br

RESUMO: A atividade tripanocida de 15 extratos de seis espécies de *Lippia*, nativas do Cerrado do Estado de São Paulo (Brasil), e respectivas frações de extração líquido-líquido (hexano, acetato de etila, n-butanol e água) foram avaliados utilizando as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 32, 8, 2, 0,5 mg/ml. Além disso, a atividade citotóxica foi avaliada em fibroblastos da linhagem LLCMK₂. Benzonidazol foi usado como controle positivo. Entre os 15 extratos etanólicos testados, o de folhas de *L. velutina* mostrou a maior atividade tripanocida e toxicidade moderada. Os melhores resultados foram obtidos para sua fração de acetato de etila (IC₅₀ = 0,7 mg

/ ml), que foi 42 vezes mais ativa do que o benzonidazol ($IC_{50} = 30,9$ mg / ml), com índice de seletividade (SI) de 371,0. Devido à sua alta atividade tripanocida, o perfil químico do extrato etanólico das folhas de *L. velutina* foi investigado e flavonóides naringenina, asebogenin sakuranetina, 6-hydroxyluteolin-7-O- β -glicosídeo, aromadendrina, floretina e eriodictiol-7 -O- β -glicopiranosídeo foram identificados por HPLC-DAD. Nossa seleção quanto à atividade tripanocida de seis espécies de *Lippia* indica o potencial efeito anti-chagásico de *L. velutina*, especialmente da sua fração de acetato de etila, que apresentou maior atividade do que o benzonidazol.

Unitermos: *Lippia*, *Trypanosoma cruzi*, atividade tripanocida, citotoxicidade.

ABSTRACT: *In vitro* trypanocidal activity of 15 extracts of 6 *Lippia* species native in the Cerrado bioma of São Paulo State (Brazil), their liquid-liquid extraction fractions (hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water) were evaluated using the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* at a concentration of 32, 8, 2, 0.5 μ g/ml. Additionally, the cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts of lineage LLCMK₂. Benznidazole was used as positive control. Among the 15 ethanol extracts assayed, the one from of leaves of *L. velutina* showed the highest trypanocidal activity and moderate toxicity. Best results were obtained for its ethyl acetate fraction ($IC_{50} = 0.7$ μ g/ml), which was 42 times more active than benznidazole ($IC_{50} = 30.9$ μ g/ml), with Selectivity Index (SI) of 371.0. Due to its high trypanocidal activity, the chemical profile of the ethanol extract of leaves of *L. velutina* was investigated and flavonoids naringenin, asebogenin, sakuranetin, 6-hydroxyluteolin-7-O- β -glucoside, aromadendrin, phloretin, and eriodictyol-7-O- β -glucopyranoside were identified by HPLC-DAD analysis. Our screening for trypanocidal activity of six *Lippia* species indicates the potential anti-

chagasic effect of *L. velutina*, especially its ethyl acetate fraction, which showed higher activity than benznidazole.

Keywords: *Lippia*, *Trypanosoma cruzi*, trypanocidal activity, cytotoxicity.

INTRODUCTION

In Latin America, the Chagas disease is an important morbidity that affects approximately 10 million people and represents a risk for 25 million people widespread from the southern United States to the south Argentina (Who, 2010).

Since Chagas disease affects mainly poor people, the development of new therapies for this disease it is not attractive for the pharmaceutical companies and it is still considered a neglected disease (Nwaka & Ridley, 2003; Dias et al., 2009). The two available drugs for treatment of Chagas disease nifurtimox and benznidazole have potential toxic side effects and variable efficacy, being unable to eradicate the infection during the chronic phase when most patients are diagnosed and consequently contributing to their low rate of use (Coura, 2009). For this reason the screening of potential new drugs and compound libraries are essential (Coura & Castro, 2002).

The genus *Lippia*, with ca. 200 species, is distributed in South and Central Americas and in tropical Africa and 70 to 75% of the *Lippia* species occurring in Brazil (Judd et al., 1999; Viccini et al., 2006). *Lippia* species are used worldwide in traditional medicine mainly to treat respiratory, gastrointestinal and skin disorders, in addition for their analgesic, anti-inflammatory, antifungal, antimalarial and anti-giardial, properties (Pascual et al., 2001; Ajaiyeoba et al., 2006; Mesa et al., 2009; Machado et al., 2010).

Lippia species have also shown trypanocidal activity as the organic extracts *Lippia integrifolia* inhibited epimastigote forms of *T. cruzi* (Sülßen et al., 2006). Essential oils of *L. alba* showed strong activity against epimastigote and amastigote

forms of *T. cruzi*. Essential oils from *L. origanoides* showed trypanocidal activity against amastigote forms of *T. cruzi* (Escobar et al., 2010). *Lippia sidoides* Cham., one of the species investigated in this work, showed activity against promastigote forms of *Leishmania chagasi* among others (Oliveira et al., 2009).

Due to the biological importance of *Lippia* species, *in vitro* anti-trypanosomal potential activity of 15 extracts of 6 *Lippia* species native in the Cerrado bioma of São Paulo State (Brazil) and their liquid-liquid extraction fractions were evaluated through *in vitro* assays using the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Complementarily, the cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts of lineage LLCMK₂.

MATERIAL AND METHODS

Plants

Aerial parts of *L. salviaefolia* Cham. and *L. velutina* were collected in Mogi-Guaçu (State of São Paulo-Brazil) in 2006 (voucher specimens n° Lima 90 and n° Brumati TI73, respectively) and identified by Dra. Inês Cordeiro (“Herbarium Maria Eneida P. Kaufmann” - Instituto Botânico de São Paulo, São Paulo, Brazil). Aerial parts of *L. balansae* Briq. and *L. lasiocalycina* Cham. were collected in Santa Cruz do Rio Pardo and Pratânia (State of São Paulo), respectively in 2008 (voucher specimens n° FEA 402 and n° FEA 3556, respectively) and identified by Dra. Giselda Durigan (Herbarium Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis, São Paulo, Brazil). Aerial parts and roots of *L. lupulina* Cham. and *L. sidoides* Cham. were collected in Iaras (State of São Paulo) in 2009 (voucher specimens n° FEA 3638 and n° FEA 3639, respectively) and identified by Dra. Giselda Durigan (Herbarium Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis, São Paulo, Brazil).

Plant extraction

Plant materials were dried in oven with air circulation at 45 °C and grounded in knife mill. Each extraction was performed in ethanol (3.5 ml/g, three steps of 24 h) at room temperature. The fluid extracts were concentrated in rotaevaporator at 40°C to give the following 15 ethanol extracts: of leaves (EELLSal) and stems (EESLSal) of *L. salviaefolia* Cham.; of flowers (EEFLb), leaves (EELLb) and stems (EESLb) of *L. balansae* Briq.; of leaves and stems combined (EELSLas) of *L. lasiocalycina* Cham.; of leaves (EELLSid), stems (EESLSid) and roots (EERLSid) of *L. sidoides* Cham.; of flowers (EEFLlup), leaves (EELLlup), roots (EERLlup) and stems (EESLlup) of *L. lupulina* Cham.; of leaves (EELLv) and stems (EESLv) of *L. velutina*.

Liquid-liquid extraction

EELLSal (40.0 g) was diluted in MeOH-H₂O 8:2 (v/v) (650 ml) and extracted with Hexane (5 x 300 ml) to give fraction FHex1 (3.2 g) after solvent evaporation under reduced pressure. Water was added to hydromethanolic phase up to 45:55 (v/v), followed by extraction with EtOAc (3 x 300 ml) to give fraction FAc1 (25.6 g). The hydromethanolic phase was concentrated, diluted in H₂O (800 ml) and extracted with *n*-BuOH (3 x 270 ml) to give fraction FBu1 (2.1 g) and FAq1 (1.6 g). All fractions were concentrated in rotaevaporator at 40 °C. The same procedure was carried out with the other *Lippia* extracts, maintaining the ratio between dry extract and MeOH-H₂O 8:2 (v/v) and among solvents.

High-performance liquid chromatography

Each extract (10 mg) was dissolved methanol (1 ml) and filtered through PTFE membrane (0.20 µm, Sartorius AG, Germany). These solutions (15 µl) were analysed in

a Shimadzu HPLC apparatus, equipped with a degasser (DGU-20A₃), two pumps (LC 20AT), auto-sampler (SIL-20A), photodiode array detector (SPD-M20A) and oven (CTO-20A). Separation was achieved on two C-18 coupled columns (Phenomenex Onyx Monolithic, 100 mm x 4.6 mm coupled to a Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 4.6 mm, 4 µm particle size) using water (solvent A) and methanol (solvent B). The elution was carried out at 1 ml/min, using the following gradient: 30–50% B (0–25 min), 50–100% B (25–70 min). Detection was monitored at 254 nm, and the compounds were identified by comparison of their retention time and UV spectra with reference compounds isolated previously.

Parasite culture

The epimastigote forms of *T. cruzi* (B5 clone of CL Brener strain) were maintained in BALB/c mice and LIT medium - *Liver Infusion Tryptose*, in BOD oven at 28°C (Fernandes & Castellani, 1966). Parasites were kept by serial passages in mice and medium culture in the Laboratory of Parasitology of the Pharmaceutical Sciences Faculty of Ribeirão Preto-SP/USP.

In vitro assay for antitrypanosomal activity

The antitrypanosomal activity was evaluated by modified colorimetric method using CPRG (*Chlorophenol red b-D-galactopyranoside*) (Buckner et al., 1996).

The epimastigote forms (1.10^5 parasites/ml) were seeded in 96 well plates in oven BOD at 28 °C for 24 hours with several concentrations of the test samples (32, 8, 2, 0.5 µg/ml). After this period, CPRG (*Chlorophenol red β-D-galactopyranoside*, 400 µM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) (50µl) solution was added to each well and the plate was incubated at 28°C in BOD oven for 6 hours. Absorbance was 570 nm. The

result of each sample was compared with benznidazole (reference drug for *Trypanosoma cruzi*).

Assays were carried out in triplicate and results were expressed as IC₅₀ calculated by a statistical method of dose-response sigmoidal curve using *software GraphPad Prisma 4.0*.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity evaluation of the samples with strong antitrypanosomal activity against epimastigote forms was carried out with fibroblasts of lineage LLCMK₂ using the MTT method (Muelas-Serrano et al., 2000 – with changes].

LLCMK₂ cells (1.10⁶ cells/ml) were seeded in 96 well plates at several concentrations of test samples (32, 8, 2, 0.5 µg/ml). The plates were then incubated in oven with 5% of CO₂ at 37°C, for 24 hours. After that, 10 µL of MTT solution (5mg/ml) were added in each well and the plates were incubated for further 4 hours. Then, isopropanol-acid (100 µl) was added and the plates were kept at room temperature for 1 hour in order to dissolve the formazan formed crystals. The quantification was performed in spectrophotometer at 570 nm.

Assays were carried out in triplicate and results were expressed as the cytotoxic concentration (CC₅₀) calculated by a statistical method of dose-response sigmoidal curve using *software GraphPad Prisma 4.0*.

Cytotoxic activity (CC₅₀) was correlated to trypanocidal activity (IC₅₀) for determination of the corresponding selectivity index (SI=CC₅₀/IC₅₀).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro tests with epimastigote forms of *T. cruzi* have been used to screen new potential anti-chagasic drugs (Sepúlveda-Boza & Cassels, 1996; Ochoa et al., 1999). Using such strategy, the trypanocidal action of crude extracts of *L. balansae*, *L. laciocalycina*, *L. salviaefolia*, *L. sidoides*, *L. lupulina*, and *L. velutina*, and their liquid-liquid fractions extracted with hexane, EtOAc, *n*-BuOH and H₂O were tested towards epimastigote forms of *T. cruzi* (Table 1).

The trypanocidal activity observed was classified according to the standards established by Osorio et al. (2007). The samples were classified as highly active ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), active ($10 < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$), moderately active ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$) and non-active ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). Regarding the cytotoxicity, samples were classified as highly toxic ($CC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), toxic ($10 < CC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$), moderately toxic ($100 < CC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$) and potentially non-toxic ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$).

Among the 15 EtOH crude extracts assayed, the one from leaves of *L. velutina* (EELLv14) showed the highest activity against epimastigote forms of *T. cruzi* ($IC_{50} = 52.1 \mu\text{g/ml}$) and a slightly higher activity was observed for its FHex14 ($IC_{50} = 36.0 \mu\text{g/ml}$). Interestingly, a marked increase in activity was observed for its ethyl acetate fraction (FAc14; $IC_{50} = 0.7 \mu\text{g/ml}$) (Table 2) when compared to the benznidazole ($IC_{50} = 30.8 \mu\text{g/ml}$) evidencing a trypanocidal activity for FAc14 42x higher than benznidazole.

Regarding the cytotoxic activity, EELLv14 and fraction FAc14 showed moderate toxicity ($CC_{50} = 150.9$ and $274.6 \mu\text{g/ml}$, respectively) to LLCMK₂ cell line, whereas fraction FHex14 was toxic to such cells ($CC_{50} = 67.6 \mu\text{g/ml}$) (Table 2). Although fraction FAc14 was moderately toxic to LLCMK₂ cells, it was found to be the most selective sample against epimastigote forms of *T. cruzi*, with SI (selective index) of 371.0.

The extract of stems of *L. lupulina* (EESLlup12) showed moderate anti-trypanosomal activity towards epimastigote forms ($IC_{50} = 60.9 \mu\text{g/ml}$), but it was toxic against LLCMK₂ cells, with a SI of 0.6 (Table 2). No increase in activity was observed for its liquid-liquid fractions which might not be related to synergism among compounds present in the crude extract.

The remaining extracts assayed towards epimastigote forms of *T. cruzi*, showed weak activity, although the extract of *L. sidoides* had been previously reported as active against other parasites, as *L. chagasi* (Oliveira et al., 2009).

Regarding the remaining partition fractions assayed, only the hexane fraction (FHex11) from leaves of *L. lupulina* showed moderate anti-trypanosomal activity against epimastigote forms with $IC_{50} = 85.7 \mu\text{g/ml}$, although the crude extract itself was not active. On the other hand, it was toxic to the LLCMK₂ cells, with SI of 0.7 (Table 2).

Previous work on the chemical profile of the ethanol extract of *L. velutina* leaves (EELLv14) evidenced the presence of flavonoids naringenin (**1**), asebogenin (**2**), sakuranetin (**3**), 6-hydroxyluteolin-7-*O*- β -glucoside (**4**), eriodictyol-7-*O*- β -glucopyranoside (**5**), aromadendrin (**6**) and phloretin (**7**) whereas the phenylpropanoid glucosides forsythoside B (**8**) and verbascoside (**9**) were detected on the ethanol extract of *L. lupulina* stems (EESLlup12) (Fig. 1).

The antiprotozoal activity of several flavonoids has been previously reported as the antitrypanosomal activities of the flavonoids 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone (sakuranetin) and 5,4'-dihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone of *Trixis vauthieri* (Asteraceae) (Ribeiro et al., 1997), and iso-sakuranetin and aromadendrin-4'-methylether of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (da Silva-Filho et al., 2004) towards trypomastigote forms of *T. cruzi*, whereas dihydrochalcone phloretin proved to

be an efficient inhibitor of epimastigote forms of *T. cruzi* growth factor (Einicker-Lamas et al., 2000). In addition, the flavone hispidulin, from *Ambrosia tenuifolia*, and santin, from *Eupatorium buniifolium* inhibited epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* and promastigote forms of *L. mexicana* (Sülßen et al., 2007). Such results suggest the activity observed for the EELLv14 might be related to its flavonoid content, especially of sakuranetin and phloretin which had been previously reported as active against *T. cruzi* (Ribeiro et al., 1997; Einicker-Lamas et al., 2000).

According to Sairafianpour et al. (2002), the phenylpropanoid 2,3,5-trimethoxy-6-(1-propenyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione inhibited promastigote and amastigote forms of several *Leishmania* species, but no reports of antiparasite activities were found for forsythoside B (**8**) and verbascoside (**9**), both present in the moderately active crude extract EESLlup12 (Figure 1).

Efficient strategies to tackle with neglected diseases, including Chagas disease, are urgently needed and include the discovery of new therapeutic agents for prevention and control (Osorio et al., 2007).

Our results indicate that addressing this issue through the rational exploration of biodiversity might be an attractive alternative, as the screening for trypanocidal activity using six *Lippia* species indicated the potential anti-chagasic effect of *L. velutina*, especially of its EtOAc fraction, which was approximately 42 times more active than benznidazole.

Such data corroborate the importance of efforts to promote the sustainable use of Brazilian biodiversity especially focused in the search of new therapeutic agents to treat current neglected diseases, which affect millions of people in Brazil, among other countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Miriam P. A. Toldo, Mariana Rosa and Mariana Bryan Augusto for help in laboratory work. Financial support was provided by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento, Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil). The undertaken experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Renata Tomé Alves is a PhD student from the Bioscience and Biotechnology Program Pos Graduation of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP/UNESP and has received research studentship from CNPq.

REFERENCES

- Ajaiyeoba EO, Abiodunb OO, Faladec MO, Ogbolea NO, Ashidia JS, Happid CT, Akinboye DO 2006. *In vitro* cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine* 13: 295-298.
- Buckner FS, [Verlinde CL](#), [La Flamme AC](#), [Van Voorhis WC](#) 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2592-2597.
- Coura JR, Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Coura JR 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 549-554.
- da Silva Filho AA, Pires Bueno PC, Gregório LE, Andrade e Silva ML, Albuquerque S, Bastos JK 2004. *In-vitro* trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *J Pharm Pharmacol* 56: 1195-1199.
- Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD 2009. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Química Nova* 32: 2444-2457.
- Einicker-Lamas M, Almeida AC, Todorov AG, de Castro SL, Caruso-Neves C, Oliveira MM 2000. Characterization of the myo-inositol transport system in *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 267: 2533-2537.

- Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 184-190.
- Fernandes JF, Castellani O 1966. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 18: 195-202.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg PF 1999. Plant systematics – a phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Cavaleiro C, Custódio JB, Sousa MC 2010. Anti-giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitol Res* 106: 1205-1215.
- Mesa AC, Montiel J, Zapata B, Duran C, Betancur L, Stashenko E 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 878-884.
- Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 86: 999-1002.
- Nwaka S, Ridley RG 2003. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nat Rev Drug Discov* 2: 919-928.
- Ochoa C, Perez E, Perez R, Suarez M, Ochoa E, Rodriguez H, Gomez Barrio A, Muelas S, Nogal JJ, Martinez RA 1999. Synthesis and antiprotozoan properties of new 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5- thiadiazine-2-thione derivatives. *Arzneim-Forsch* 49: 764–769.
- Oliveira VC, Moura DM, Lopes JA, de Andrade PP, da Silva NH, Figueiredo RC 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitol Res* 104: 1053-1059.
- Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Giménez A, Robledo S 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 111: 630-635.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata D, Villar A 2001. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 76: 201-214.
- Ribeiro A, Piló-Veloso D, Romanha AJ, Zani CL 1997. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J Nat Prod* 60: 836-41.
- Sairafianpour M, Kayser O, Christensen J, Asfa M, Witt M, Staerk D, Jaroszewski JW 2002. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. *J Nat Prod* 65: 1754-1758.

Sepúlveda-Boza S, Cassels BK 1996. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 62: 98-105.

Sülsen V, Güida C, Coussio J, Paveto C, Muschietti L, Martino V 2006. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Res* 98: 370-374.

Sülsen VP, Cazorla SI, Frank FM, Redko FC, Anesini CA, Coussio JD, Malchiodi EL, Martino VS, Muschietti LV 2007. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *Am J Trop Med Hyg* 77: 654-659.

Viccini LF, Pierre PMO, Praça MM, Souza da Costa DC, da Costa Romanel E, de Souza SM, Pereira Peixoto PH, Gonçalves Salimena FR 2006. Chromosome numbers in genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Syst Evol* 256: 171-178.

WHO – World Health Organization (2010). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, access in august 2010.

Table 1. List of the samples assayed against epimastigote forms of *T. cruzi*

| Species | Part of the plant | Crude extract (EE) ^{1/} Fraction (F) ² | Species | Part of the plant | Crudes extracts (EE) ^{1/} Fractions (F) ² |
|-------------------------|-------------------|---|--------------------|-------------------|--|
| <i>L. salviaefolia</i> | leaf | EELLSa1 | <i>L. sidoides</i> | stem | FAc8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | leaf | FHex1 | <i>L. sidoides</i> | stem | FBu8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | leaf | FAc1 | <i>L. sidoides</i> | stem | FAq8 |
| <i>L. salviaefolia</i> | leaf | FBu1 | <i>L. sidoides</i> | root | EERLSid9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | leaf | FAq1 | <i>L. sidoides</i> | root | FHex9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | stem | EESLSa2 | <i>L. sidoides</i> | root | Fact9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | stem | FHex2 | <i>L. sidoides</i> | root | FBu9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | stem | FAc2 | <i>L. sidoides</i> | root | FAq9 |
| <i>L. salviaefolia</i> | stem | FBu2 | <i>L. lupulina</i> | flower | EEFLlup10 |
| <i>L. salviaefolia</i> | stem | FAq2 | <i>L. lupulina</i> | flower | FAc10 |
| <i>L. balansae</i> | flower | EEFLb3 | <i>L. lupulina</i> | flower | FBu10 |
| <i>L. balansae</i> | flower | FHex3 | <i>L. lupulina</i> | flower | FAq10 |
| <i>L. balansae</i> | flower | FAc3 | <i>L. lupulina</i> | leaf | EELLlup11 |
| <i>L. balansae</i> | flower | FBu3 | <i>L. lupulina</i> | leaf | FHex11 |
| <i>L. balansae</i> | leaf | EELLb4 | <i>L. lupulina</i> | leaf | FAc11 |
| <i>L. balansae</i> | leaf | FHex4 | <i>L. lupulina</i> | leaf | FBu11 |
| <i>L. balansae</i> | leaf | FAc4 | <i>L. lupulina</i> | stem | EESLlup12 |
| <i>L. balansae</i> | leaf | FBu4 | <i>L. lupulina</i> | stem | FHex12 |
| <i>L. balansae</i> | stem | EESLb5 | <i>L. lupulina</i> | stem | FAc12 |
| <i>L. balansae</i> | stem | FHex5 | <i>L. lupulina</i> | stem | FBu12 |
| <i>L. balansae</i> | stem | FAc5 | <i>L. lupulina</i> | root | EERLlup13 |
| <i>L. balansae</i> | stem | FBu5 | <i>L. lupulina</i> | root | FAc13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | leaf and stem | EESLlas6 | <i>L. lupulina</i> | root | FBu13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | leaf and stem | FHex6 | <i>L. lupulina</i> | root | FAq13 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | leaf and stem | FAc6 | <i>L. velutina</i> | leaf | EELLv14 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | leaf and stem | FBu6 | <i>L. velutina</i> | leaf | FHex14 |
| <i>L. lasiocalycina</i> | leaf and stem | FAq6 | <i>L. velutina</i> | leaf | FAc14 |
| <i>L. sidoides</i> | leaf | EELLSid7 | <i>L. velutina</i> | leaf | FBu14 |
| <i>L. sidoides</i> | leaf | FHex7 | <i>L. velutina</i> | stem | EESLv15 |
| <i>L. sidoides</i> | leaf | FAc7 | <i>L. velutina</i> | stem | FHex15 |
| <i>L. sidoides</i> | leaf | FBu7 | <i>L. velutina</i> | stem | FAc15 |
| <i>L. sidoides</i> | stem | EESLsid8 | <i>L. velutina</i> | stem | FBu15 |
| <i>L. sidoides</i> | stem | FHex8 | | | |

¹EE followed by complementary letters: ethanolic extract of a give specie; ²FHex: fraction of hexane; FAc: fraction of ethyl acetate; FBu: fraction of n-butanol; FAq: aqueous fraction

Table 2. Trypanocidal and cytotoxic potential of *Lippia* species against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and fibroblasts of lineage LLCMK₂, respectively

| Species | Part of the plant | Crude extracts (EE)/ Fractions (F) | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | SI | Trypanocidal activity | Cytotoxicity |
|--------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|-------|-----------------------|------------------|
| <i>L. velutina</i> | leaf | EELLv14 | 52.1 | 150.9 | 2.8 | Moderately active | Moderately toxic |
| <i>L. velutina</i> | leaf | FHex14 | 36.0 | 67.6 | 1.8 | Active | Toxic |
| <i>L. velutina</i> | leaf | FAc14 | 0.7 | 274.6 | 371.0 | Highly active | Moderately toxic |
| <i>L. lupulina</i> | leaf | FHex11 | 85.7 | 60.1 | 0.7 | Moderately active | Toxic |
| <i>L. lupulina</i> | stem | EESLlup12 | 60.9 | 36.6 | 0.6 | Moderately active | Toxic |

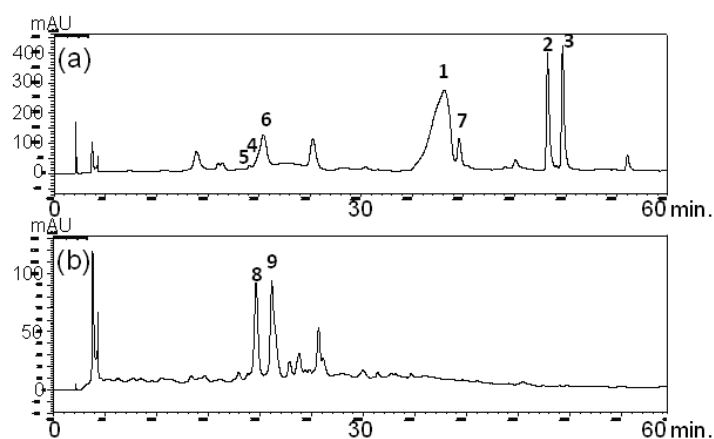


Figure 1. HPLC chromatograms of the ethanolic extracts of *L. velutina* (a) and *L. lupulina* (b), at 254 nm. Identified peaks: [1] naringenin (Rt: 38.7); [2] asebogenin (Rt: 48.7); [3] sakuranetin (Rt: 50.0); [4] 6-hydroxyluteolin-7-*O*- β -glucoside (Rt: 21.1); [5] eriodictyol-7-*O*- β -glucopyranoside (Rt: 19.4); [6] aromadendrin (Rt: 21.5); [7] phloretin (Rt: 39.0); [8] forsythoside B (Rt: 19.6); [9] verbascoside (Rt: 21.1). Numbers were inserted across the chromatograms to facilitate comparison.

2) **Trypanocidal activity of Brazilian plants against the Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi***

Renata Tomé Alves^{a*}, Luis Octávio Regasini^b, Cristiano Soleo Funari^b, Maria Cláudia Marx Young^c, Vanderlan da Silva Bolzani^b, Dulce Helena Siqueira Silva^b, Sérgio de Albuquerque^d, João Aristeu da Rosa^a

^aState University of São Paulo, Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Araraquara-Jaú Highway, km1, ZIP code 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^bState University of São Paulo, Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, Francisco Degni Street, ZIP code 14800-900, Araraquara, SP, Brazil.

^cInstitute of Botany of São Paulo – SP, 3687 Miguel Estéfano Avenue, ZIP code 04301-902, Água Funda, São Paulo, SP, Brazil.

^dUniversity of São Paulo, Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Avenida do Café, ZIP code 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

***Corresponding author.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Parasitologia
Rodovia Araraquara/Jau, Km1, CEP: 14801-902, Araraquara, SP, Brasil
Tel.: +55 16 33016943, Fax: +55 16 33016940, e-mail address: rosaja@fctfar.unesp.br

ABSTRACT

Chagas disease is one of the main socioeconomic problems in Latin America. Since the treatment of this disease is ineffective, the screening of potential antiprotozoal agents is essential, especially of the ones obtained from natural sources. This study aimed to provide an evaluation of the trypanocidal action of 92 ethanol extracts of species of Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae, and Verbenaceae against the Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. Additionally, the cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts of lineage LLCMK₂. Both the trypanocidal activity and the cytotoxicity were evaluated through the MTT method, in the following concentrations: 500, 350, 250, and 100 µg/ml. Benznidazole was used for

positive control. The best results among the 92 samples evaluated were obtained with ethanol extracts of *Ocotea paranapiacabensis* (Am93), for showing trypanocidal activity against epimastigote forms of the Bolivia strain and being moderately toxic to LLCMK₂ cells, its Selectivity Index (SI) being 14.56, and the extracts of *Aegiphilla lhotzkyana* (Am160), which showed moderate trypanocidal activity against the Bolivia strain and moderate toxicity, its SI being equal to 1.15. The screening of Brazilian plants has indicated the potential effect of ethanol extracts obtained from *Ocotea paranapiacabensis* and *Aegiphilla lhotzkyana* against Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, trypanocidal activity, cytotoxicity, strains, biodiversity, Chagas disease.

INTRODUCTION

In Latin America, Chagas disease is an important cause of morbidity, affecting around 10 million people and representing a risk for 25 million from the South of the United States to the South of Argentina (Who, 2010).

Since this disease affects mostly poor populations, the development of new therapeutic solutions is not an attractive business for the large pharmaceutical companies, and currently it can be said that this initiative is being extremely neglected, which is a very concerning fact on account of the needs of those people (Nwaka & Ridley, 2003). The two pharmaceuticals available for the treatment of Chagas disease, nifurtimox and benznidazole, have potential toxic side effects and variable efficiency, both of them being ineffective in eradicating the infection during its chronic phase, which contributes to its low use rates (Coura, 2009). For that reason, the screening of potential new compounds is essential (Coura & Castro, 2002).

The difficulty to find a substance capable of fighting the parasite can be directly related to the morphological characteristics of the strain, especially considering the presence of different populations, which present distinct tissue tropism. Therefore, different strain groups of *T. cruzi* should be considered in the evaluation of new pharmaceuticals (Macedo et al., 2002).

This scenario clearly shows that it is necessary to develop therapies that stop the multiplication of *T. cruzi* without causing any severe side effect (Coura & Castro, 2002). Medicinal plants have been used in the treatment of parasitic diseases for a long time, and many works sustain the therapeutic value of products from vegetable origin, also describing the trypanocidal activity of natural active ingredients (Bastos et al., 1999; Saraiva et al., 2007; Batista Jr. et al., 2008).

Continuing our studies on the discovery of trypanocidal agents obtained from plants from both the *Cerrado* and the Atlantic Forest (Cotinguiba et al. 2009; Lopes et al., 2008; Regasini et al. 2009), 92 ethanol extracts of species of Annonaceae, Apiaceae, Cucurbitaceae, Lauraceae, Moraceae, Nyctaginaceae, and Verbenaceae were tested against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Y and Bolivia strains), and their cytotoxic activity was evaluated in LLCMK₂ fibroblasts. The emergency to find new antiprotozoal agents with trypanocidal activity and the evidence that some species of the aforementioned families have trypanocidal activity against parasitic forms of *T. cruzi* provided the motivation to carry out the screening of such extracts (Buainain et al., 1992; Fournet et al., 2007; Osorio et al., 2007; Cabral et al., 2010).

MATERIAL AND METHODS

Parasites

In the assays both the Y and Bolivia strains were used, the former belonging to lineage I and the latter, to lineage II. The strains were kept in BALB/c mice and in LIT (Liver Infusion Tryptose) culture medium, in BOD incubator at 28°C, at the Laboratory of Parasitology of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara-SP/UNESP.

Botanical material and extraction

The vegetable material was collected by PhD Maria Cláudia Marx Young in remaining areas of Atlantic Forest and *Cerrado* in the State of São Paulo, and it was identified by PhD Inês Cordeiro [Institute of Botany, State Department of the Environment, São Paulo – SP (IBt-SMA)]. The voucher specimens were then deposited in the herbarium “Maria Eneyda P. Kaufmann” at the IBT-SMA. The codes of the extracts and voucher specimens can be found in Table 1.

After the collection, the botanical material was dried in the absence of light and then powdered using a cutting mill. A 30 g portion of the powder was extracted with ethanol (5 x 100 mL) during three weeks, at room temperature. After the filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, which resulted in the crude extracts.

Twenty-eight of the 92 ethanol extracts evaluated belong to the genera *Rollinia*, *Xylopia*, *Anaxagorea*, *Annona*, *Guatteria* and *Duguetia*, of the family Annonaceae; 01, to the genus *Hydrocotyle*, family Apiaceae; 02, to the genus *Cayaponia*, family Cucurbitaceae; 36, to the genera *Nectandra* and *Ocotea*, family Lauraceae; 01, to the genus *Dorstenia*, family Moraceae; 08, to the genera *Bougainvilleae*, *Pisonia* and *Guapira*, family Nyctaginaceae; and 16, to the genera *Lantana*, *Starchytarpheta*, *Aegiphilla* and *Lippia*, family Verbenaceae (Table 1).

***In vitro* assay for trypanocidal activity**

Trypanocidal activity was evaluated by means of the MTT method, with changes (Muelas-Serrano et al., 2000).

The epimastigote forms (1.10^7 parasites/ml), obtained from culture in stationary phase, were cultured in plates with 96 wells in BOD incubator at 28°C for 24 hours, concentrations for the ethanol extracts being 500, 350, 250 and 100 µg/ml. After this period, the MTT (2.5 mg/ml) and PMS (0.22 mg/ml) solutions were added to each well, and the plate was incubated for 1 hour. Then 100 µl of HCl (1M) and SDS (10%) were added to it. The plate was kept at room temperature for 30 minutes, and the reading was performed on a spectrophotometer at 595 nm. Benznidazole was used in the same concentrations for positive control.

The assays were in triplicate, and the results were expressed as IC₅₀, calculated by the statistical method of sigmoid concentration-response curve using the GraphPad prisma 4.0 software.

Cytotoxicity Assay

Extracts with trypanocidal activity against epimastigote forms of *T. cruzi* were evaluated regarding their cytotoxicity in LLCMK₂ fibroblasts by means of the MTT method, with changes (Muelas-Serrano et al., 2000).

LLCMK₂ cells (1.10^6 /ml) were cultured in plates with 96 wells and ethanol extracts in the following concentrations: 500, 350, 250 and 100 µg/ml. The plates were incubated in a CO₂ incubator at 5% and 37°C for 24 hours. After that period, 10 µL of MTT solution (5mg/ml) were added to each well, and the plates were incubated for 4 hours. Then 100 µl of acid isopropyl were added, and the plate was kept at room temperature for 1 hour. The reading was performed on a spectrophotometer at 595 nm.

RPMI culture medium was used for positive control, whereas LLCMK₂ cells were used for negative control.

The assays were carried out in triplicate, and the results were expressed as CC₅₀, calculated by the statistical method of sigmoid concentration-response curve using the GraphPad prisma 4.0 software.

The cytotoxic activity (CC₅₀) was related to the trypanocidal activity (IC₅₀) in order to determine the correspondent Selectivity Index (IS=CC₅₀/IC₅₀).

RESULTS AND DISCUSSION

Ninety-two ethanol extracts of different species of the Brazilian flora were tested. The trypanocidal activity of the samples was classified according to criteria set by Osorio et al. (2007). The extracts were classified as highly active (IC₅₀<10 µg/ml), active (IC₅₀>10<50 µg/ml), moderately active (IC₅₀>50<100 µg/ml) and inactive (IC₅₀>100 µg/ml). With regard to the cytotoxicity, the samples were classified as highly toxic (CC₅₀<10 µg/ml), toxic (CC₅₀>10<100 µg/ml), moderately toxic (CC₅₀>100<1000 µg/ml) and potentially non-toxic (CC₅₀>1000 µg/ml).

According to this classification, all the 92 ethanol extracts tested against epimastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* are inactive (Table 2).

Regarding the Bolivia strain, the fruit extract of *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) (Am93) is considered active, whereas the fruit extract of *Aegiphilla lhotzkyana* (Verbenaceae) (Am160) and the leaf extract of *Ocotea elegans* (Am73) were respectively classified as moderately active and inactive against the same parasitic forms (Table 3).

The IC₅₀ values for benznidazole against epimastigote forms of the Y and Bolivia strains were 0.99 and 11.77, respectively (Tables 2 and 3).

Regarding the cytotoxicity analysis, the extracts of *Duguetia lanceolata* (Am379) and *Xylopiia aromatica* (M1103) were classified as toxic to LLCMK₂ cells, whereas the extracts of *Ocotea paranapiacabensis* (Am93), *Ocotea elegans* (Am73), *Ocotea indecora* (R60), *Aegiphilla lhotzkyana* (Am160), *Guapira oppositta* (Am116), *Guatteria elliptica* (Am03), and *Duguetia lanceolata* (Am352) were classified as moderately toxic (Tables 2 and 3).

The most promising samples were the ones that proved to be more active against epimastigote forms of *T. cruzi* and less toxic to LLCMK₂ cells.

According to this classification, the most promising extracts for chemical and pharmacological investment were the fruit of *Ocotea paranapiacabensis*, Lauraceae (Am93), for proving to be active against epimastigote forms of the Bolivia strain and moderately toxic to LLCMK₂ cells, its SI being equal to 14.56, and the fruit extract of *Aegiphilla lhotzkyana*, Verbenaceae (Am160), which was also tested against the Bolivia strain and showed moderate activity regarding the parasites and the LLCMK₂ cells.

By comparing the trypanocidal activity of the extracts against the Y strain and the Bolivia strain, a clear difference could be noted. The material tested against the Y strain didn't show a satisfactory activity. On the other hand, two extracts (Am93 and Am160), which were tested against the Bolivia strain, were found to be, respectively, active and moderately active against such parasitic forms.

This difference in sensitivity between the strains can be explained by the fact that *T. cruzi* populations show large intraspecific variability, as it can be noted by differences in their morphology, virulence, pathogenicity, evasion ability in case of an immune response from the host, antigenic composition and biochemical properties (Fernandes et al., 1998; Tibayrenc & Ayala, 2002).

The trypanocidal activity of the ethanol extract of *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) against epimastigote forms of the Bolivia strain is reported in this work for the first time. Data from the literature report the activity of isolated alkaloids of *Ocotea odorifera* against promastigote forms of *Leishmania braziliensis*, *L. donovan* and *L. amazonensis* and trypomastigote forms of *T. cruzi* (Fournet et al., 2007). Extracts of branches and roots of the same species were found to be active against *Plasmodium falciparum*. Popular medicine recommends the use of these plants in the treatment of dermatoses, rheumatism, fever and syphilis (Botsaris, 2007).

Aegiphilla lhotzkyana (Verbenaceae), which showed trypanocidal activity against the Bolivia strain, is widely distributed in Northeastern Brazil, where it is popularly known as *pau-de-sebo*. The oil obtained from its fruit is used in popular medicine for treating pediculosis and scabies, and its extract is used as an antidote to snakebite (Costa-Lotufo, 2004). The activity of this crude extract was unknown until this research was carried out, because there are no reports in the literature on the trypanocidal activity of this species, not even on the genus it belongs to.

The screening of Brazilian plants has indicated the potential effect of ethanol extracts obtained from fruits of *Ocotea paranapiacabensis* (Lauraceae) and *Aegiphilla lhotzkyana* (Verbenaceae) against Chagas disease, considering the epimastigote forms of the Bolivia strain of *T. cruzi*.

These data reinforce the importance of the efforts to promote the sustainable use of the Brazilian biodiversity, focusing on the search for new therapeutic agents for the treatment of some neglected diseases that affect millions of people in Brazil and other countries.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Miriam P. A. Toldo, Mariana Rosa, Mariana Bryan Augusto, Aline Rimoldi and Isabel Martinez for helping in the laboratory procedures, and the BIOTA-FAPESP (03/02176-7) and BIOPROSPECTA-FAPESP (04/07932) programs and the CNPq for the scholarships and resources granted.

REFERENCES

- Bastos JK, Albuquerque S, Silva MLA 1999. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. *Planta Medica* 65: 1-4.
- Batista JM Jr, Lopes AA, Ambrósio DL, Regasini LO, Kato MJ, Bolzani Vda S., Cicarelli RM, Furlan M 2008. Natural chromenes and chromene derivatives as potencial anti-trypanosomal agents. *Biol Pharm Bull* 3: 538-540.
- Botsaris A 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *J Ethnobiol Ethnomed* 1: 18.
- Buainain A, Giazzi JF, Belda Neto FM, Martini AS, Rosa, JA, Pozetti, GL 1992. Estudo da atividade de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* em meio líquido de Warren. *Revista de Ciências Farmacêuticas* 14: 93-102.
- Cabral MM, Barbosa-Filho JM, Maia GL, Chaves MC, Braga MV, De Souza W 2010. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 124: 319-324.
- Costa-Lotufo LV, Silveira ER, Barros MC, Lima MA, De Moraes ME, De Moraes MO, Pessoa C 2004. Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphilla lhotzkyana*. *Planta Med* 70: 180-182.
- Cotinguiba F, Regasini LO, Bolzani VS, Deboni HM, Passerini DO, Cicarelli RMB 2009. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res* 18: 703-711.
- Coura JR, Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Coura JR 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 549-554.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 58: 807-811.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Guy I, Guinaudeau H, Heinzen H 2007. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* 78: 382-384.

Lopes AA, López SN, Regasini LO, Batista-Jr. JM, Ambrósio DL, Kato MJ, da Silva Bolzani V, Cicarelli RM, Furlan M 2008. *In vitro* activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Res* 22: 1040-1046.

Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 4: 1-16.

Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrío A 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. *Parasitol Res* 86: 999-1002.

Nwaka S, Ridley RG 2003. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nat Rev Drug Discov* 2: 919-928.

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

Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani VS, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M 2009. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev Bras Farmacog* 19: 199-203.

Saraiva J, Vega C, Rolon M, da Silva R, Silva, ML, Donate PM, Bastos JK, Gomez-Barrío A, de Albuquerque S 2007. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 100: 791-795.

Tibayrenc M, Ayala FJ 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 18: 405-410.

WHO – World Health Organization (2010). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, access in august 2010.

Table 1. Ethanol extracts of plants from the Atlantic Forest and *Cerrado*.

| Annonaceae | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------|
| Extract/ voucher sample | Species | Part of the plant | Extract/voucher sample | Species | Part of the plant |
| M723 | <i>Rollinea sericea</i> | Branches | Rm98 | <i>Xylopia langsdorfiana</i> | Leaves |
| M1103 | <i>Xylopia aromatica</i> | Fruits | Rm99 | <i>Xylopia langsdorfiana</i> | Branches |
| M1143 | <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> | Leaves | Am03 | <i>Guatteria elliptica</i> | Branches |
| M1144 | <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> | Branches | Am115 | <i>Rollinea sericea</i> | Branches |
| R123 | <i>Annona cacans</i> | Leaves | Am145 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Leaves |
| R124 | <i>Annona cacans</i> | Branches | Am146 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Branches |
| R278 | <i>Guatteria australis</i> | Leaves | Am223 | <i>Annona coriacea</i> | Leaves |
| R279 | <i>Guatteria australis</i> | Branches | Am224 | <i>Annona coriacea</i> | Branches |
| R286 | <i>Xylopia aromatica</i> | Leaves | Am338 | <i>Guatteria nigrescens</i> | Leaves |
| R287 | <i>Xylopia aromatica</i> | Branches | Am339 | <i>Guatteria nigrescens</i> | Branches |
| R316 | <i>Duguetia furfuracea</i> | Fruits | Am352 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Leaves |
| R404 | <i>Annona cornifolia</i> | Leaves | Am379 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Branches |
| R405 | <i>Annona cornifolia</i> | Branches | Am468 | <i>Guatteria elliptica</i> | Leaves |
| Rm12 | <i>Rollinea sericea</i> | Leaves | Am469 | <i>Guatteria elliptica</i> | Branches |
| Apiaceae | | | Cucurbitaceae | | |
| M 861 | <i>Hydrocotyle banariensis</i> | Leaves | Am 109 | <i>Cayaponia tayiuya</i> | Fruits |
| | | | Am 110 | <i>Cayaponia tayiuya</i> | Branches |
| Moraceae | | | | | |
| Am29 | <i>Dorstenia arifolia</i> | Branches | | | |
| Lauraceae | | | | | |
| M686 | <i>Nectandra oppositifolia</i> | Leaves | R173 | <i>Ocotea velutina</i> | Branches |
| M687 | <i>Nectandra grandiflora</i> | Leaves | R188 | <i>Ocotea silvestris</i> | Leaves |
| M698 | <i>Nectandra grandiflora</i> | Branches | R189 | <i>Ocotea silvestris</i> | Branches |
| M819 | <i>Nectandra membranacea</i> | Leaves | R388 | <i>Ocotea megabotamica</i> | Leaves |
| R174 | <i>Nectandra aspidata</i> | Leaves | R389 | <i>Ocotea megabotamica</i> | Branches |
| R175 | <i>Nectandra aspidata</i> | Branches | R429 | <i>Ocotea pulchella</i> | Leaves |
| Rm128 | <i>Nectandra membranacea</i> | Leaves | R430 | <i>Ocotea pulchella</i> | Branches |
| Am12 | <i>Nectandra cissiflora</i> | Branches | Am71 | <i>Ocotea laxa</i> | Leaves |
| Am46 | <i>Nectandra membranacea</i> | Branches | Am72 | <i>Ocotea laxa</i> | Branches |
| Am257 | <i>Nectandra cuspidata</i> | Leaves | Am73 | <i>Ocotea elegans</i> | Leaves |
| Am258 | <i>Nectandra cuspidata</i> | Branches | Am74 | <i>Ocotea elegans</i> | Branches |
| M614 | <i>Ocotea aciphylla</i> | Branches | Am92 | <i>Ocotea</i> | Leaves |
| | | | | <i>paranapiacabensis</i> | |
| M809 | <i>Ocotea odorifera</i> | Branches | Am93 | <i>Ocotea</i> | Fruits |
| | | | | <i>paranapiacabensis</i> | |
| M823 | <i>Ocotea velloziana</i> | Leaves | Am94 | <i>Ocotea</i> | Branches |
| | | | | <i>paranapiacabensis</i> | |
| M849 | <i>Ocotea odorifera</i> | Leaves | Am245 | <i>Ocotea corymbosa</i> | Leaves |
| R59 | <i>Ocotea indecora</i> | Leaves | Am246 | <i>Ocotea corymbosa</i> | Branches |
| R60 | <i>Ocotea indecora</i> | Branches | Am447 | <i>Ocotea teleiandra</i> | Leaves |
| R172 | <i>Ocotea velutina</i> | Leaves | Am448 | <i>Ocotea teleiandra</i> | Branches |
| Nyctaginaceae | | | | | |
| R17 | <i>Bougainvillea</i> sp. | Leaves | Am116 | <i>Guapira opposita</i> | Leaves |
| R18 | <i>Bougainvillea</i> sp. | Branches | Am117 | <i>Guapira opposita</i> | Branches |
| R148 | <i>Pisonia ambigua</i> | Leaves | Am202 | <i>Guapira noxia</i> | Leaves |
| R149 | <i>Pisonia ambigua</i> | Branches | Am203 | <i>Guapira noxia</i> | Branches |
| Verbenaceae | | | | | |
| M872 | <i>Lantana undulata</i> | Leaves | Am158 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Leaves |
| M873 | <i>Lantana undulata</i> | Branches | Am159 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Branches |
| M943 | <i>Starchytarpheta cayenensis</i> | Leaves | Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Fruits |
| M944 | <i>Starchytarpheta cayenensis</i> | Branches | Am270 | <i>Lippia velutina</i> | Leaves |
| R184 | <i>Aegiphilla sellowiana</i> | Leaves | Am271 | <i>Lippia velutina</i> | Branches |
| R185 | <i>Aegiphilla sellowiana</i> | Branches | Am371 | <i>Lippia lupulina</i> | Leaves |
| R297 | <i>Lippia salviaefolia</i> | Leaves | Am372 | <i>Lippia lupulina</i> | Branches |
| R298 | <i>Lippia salviaefolia</i> | Branches | Am373 | <i>Lippia lupulina</i> | Flowers |

Table 2. Trypanocidal activity and cytotoxicity of families of the Brazilian flora against epimastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* and LLCMK₂ fibroblasts, respectively.

| N. Extract | Species | Family/ Part of the plant | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | SI | Trypanocidal activity | Cytotoxicity |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|------|--------------------------|------------------|
| Am93 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Lauraceae Fruits | 179.8 | 392.2 | 2.18 | Inactive | Moderately toxic |
| R60 | <i>Ocotea indecora</i> | Lauraceae Branches | 214.8 | 498.2 | 2.32 | Inactive | Moderately toxic |
| Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Verbenaceae Fruits | 126.0 | 104.1 | 0.83 | Inactive | Moderately toxic |
| Am116 | <i>Guapira opposita</i> | Nyctaginaceae Leaves | 386.4 | 115.9 | 0.30 | Inactive | Moderately toxic |
| Am379 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Annonaceae Branches | 250.2 | 52.23 | 0.21 | Inactive | Toxic |
| Am03 | <i>Guatteria elliptica</i> | Annonaceae Branches | 345.1 | 103.3 | 0.30 | Inactive | Moderately toxic |
| Am352 | <i>Duguetia lanceolata</i> | Annonaceae Leaves | 157.9 | 332.4 | 2.11 | Inactive | Moderately toxic |
| M1103 | <i>Xylopia aromatica</i> | Annonaceae | 253.1 | 98.40 | 0.39 | Inactive | Toxic |
| Benznidazole - IC₅₀ = 11.77 µg/ml | | | | | | | |

Table 3. Trypanocidal activity and cytotoxicity of families of the Brazilian flora against epimastigote forms of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and LLCMK₂ fibroblasts, respectively.

| N. Extract | Species | Family/ Part of the plant | IC ₅₀ µg/ml | CC ₅₀ µg/ml | SI | Trypanocidal activity | Cytotoxicity |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|--------------------------|------------------|
| Am93 | <i>Ocotea paranapiacabensis</i> | Lauraceae Fruits | 26.93 | 392.2 | 14.56 | Active | Moderately toxic |
| Am73 | <i>Ocotea elegans</i> | Lauraceae Leaves | 350.8 | 140.2 | 0.400 | Inactive | Moderately toxic |
| Am160 | <i>Aegiphilla lhotzkyana</i> | Verbenaceae Fruits | 90.89 | 104.1 | 1.150 | Moderately active | Moderately toxic |
| Benznidazole - IC₅₀ = 0.99 µg/ml | | | | | | | |