

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação do potencial tripanocida dos óleos essenciais de
Melampodium divaricatum e *Hedychium coronarium* e dos extratos
de *Polygonum ferrugineum* em cepas de *Trypanosoma brucei***

DANILO FERNANDO RODRIGUES

Araraquara
2013

DANILO FERNANDO RODRIGUES

**Avaliação do potencial tripanocida dos óleos essenciais de
Melampodium divaricatum e *Hedychium coronarium* e dos extratos
de *Polygonum ferrugineum* em cepas de *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Barretto
Cicarelli

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

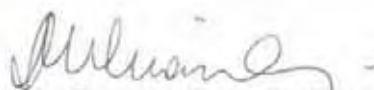
R696a	Rodrigues, Danilo Fernando Avaliação do potencial tripanocida dos óleos essenciais de <i>Melampodium divaricatum</i> e <i>Hedychium coronarium</i> e dos extratos de <i>Polygonum ferrugineum</i> em cepas de <i>Trypanosoma brucei</i> / Danilo Fernando Rodrigues. – Araraquara : [s.n], 2013 88 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli 1. Biotecnologia. 2. RT-PCR. 3. Atividade tripanocida. I. Título.
-------	---

DANILO FERNANDO RODRIGUES

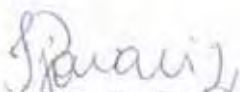
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 05 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Maria Barretto Cicarelli (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Thalita Pedroni Formariz Pilon
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara



Prof. Dr. Roberto Carlos Grassi Malta
Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV, Votuporanga

DADOS CURRICULARES

Nome: Danilo Fernando Rodrigues

Nome em citações bibliográficas: RODRIGUES, D. F.; D.F. Rodrigues; Rodrigues, DF; Danilo F. Rodrigues; Rodrigues DF; Rodrigues, D.F.; RODRIGUES, D.F.

Filiação: Osvaldo Guerreiro Rodrigues e Marilda de Lourdes Bota Rodrigues

Nascimento: 29/10/1988 - Votuporanga/SP - Brasil

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01, Campus - Araraquara - 14801-902, SP - Brasil. Telefone: 16 33016950
URL da home page: <http://www.fcfar.unesp.br/>

E-mail para contato: danilo_frodrigues@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2013 Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 4).

Instituto de Química, UNESP, Brasil.

Título: Avaliação do potencial tripanocida dos óleos essenciais de *Melampodium divaricatum* e *Hedychium coronarium* e dos extratos de *Polygonum ferrugineum* em cepas de *Trypanosoma brucei*.

Orientadora: Regina Maria Barretto Cicarelli

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

2006 - 2010 Graduação em Farmácia.

Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil.

Título: Avaliação do nível de conhecimento e utilização do *Agaricus blazei* (Cogumelo do Sol) da população do município de Votuporanga-SP e Região.

Orientador: Prof^a. M.Sc. Jéssica Laira Ulian Cândido de Sant'anna

Formação complementar

Curso Internacional: Tópicos Avançados em Biofarmácia e Farmacocinética / 2º Taller de Capacitación en Metodologías Biofarmacéuticas, 02 a 05 de outubro de 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

Curso: Citometria de Fluxo - BD Biosciences, 13 de junho de 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

Curso: AVANCES EN GENETICA FORENSE: ADN mitocondrial y mezclas en aSTRs, 10, 11 e 13 de outubro de 2011. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

Produção bibliográfica

Artigos publicados

RODRIGUES, D. F.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; CAVALEIRO, C. M. F.; SALGUEIRO, L.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O.; MARTINS, M. B. G.; CICALLELLI, R. M. B.; MOREIRA, R. R. D. **Chemical Composition and Trypanocidal Activity of the Essential Oils from *Hedychium coronarium* J. Koenig (Zingiberaceae)**. Revista ISRN Infectious Diseases. DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/639275>.

Artigos submetidos para publicação

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; PIETRO, R. C. L. R.; QUEIROZ, G. M. DE; LEITE, C. Q. F.; PAVAN, F. R.; CICALLELLI, R. M. B.; SILVA, F. A. J.; RODRIGUES, D. F.; YANO, T.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. C. S. **Trypanocidal, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)**. Submetido a Journal of Medicinal Food.

Resumo Publicado em Periódico:

Planta Medica 2012; 78 - PD155, DOI: 10.1055/s-0032-1320513. Martins GZ; Magalhães NO; Silva FAJ; Velásquez AMA; Rodrigues DF; Kohatsu AAN; Planeta CS; Cicallelli RMB; Moreira RRD. **Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* strains**. Congresso: International Congress on Natural Products Research - ICNPR, 28 de julho a 01 de agosto de 2012. Grand Hyatt, New York, USA. Página de acesso: <<https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1320513>>.

Apresentação de trabalho e palestra

Ribeiro, F., Gatti, T.H.H., Botelho, V.T., Rodrigues, D.F., Cicallelli, R.M.B., Martins, M.B.G., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Moreira, R.R.D. **Comparação entre Dois Métodos Cromatográficos no Controle de Qualidade do Óleo Essencial de *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae)**. Evento: 1º Simpósio Internacional de Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Básica à Saúde, 26 e 27 de abril de 2013. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, SP.

D.F. Rodrigues - **Versatilidade do Farmacêutico**, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho). Home page: <http://unifev.com.br/cis/farmacia.php>. Evento: II Congresso Saúde UNIFEV. Proferiu a palestra aos alunos e professores participantes do II Congresso Saúde UNIFEV; Local: Votuporanga Clube; Cidade: Votuporanga, UNIFEV, SP.

Silva, F.J.A., Rodrigues, D.F., Arenas Velasquez, A.M., Kohatsu, A.A.N., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Cicallelli, R.M.B. **Evaluation of Trypanocidal activity of *Distictella mansoana*, *Jacaranda puberula* and *Stizophyllum perforatum* extracts on *Trypanosoma cruzi* Y strain**. Congresso: FAMERP-UTMB: "Emerging Infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and

USA”, 07 e 08 de março de 2012. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP.

Martins GZ; Magalhães NO; Silva FAJ; Velásquez AMA; Rodrigues DE; Kohatsu AAN; Planeta CS; Cicarelli RMB; Moreira RRD. **Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* strains.** Congresso: International Congress on Natural Products Research - ICNPR, 28 de julho a 01 de agosto de 2012. Grand Hyatt, New York, USA.

Rodrigues DE, Arenas Velásquez AM, Salgueiro L, Cavaleiro C, Martins GZ, Magalhães NO, Santos LE, Martins MBG, Cicarelli RMB, Moreira RRD. **Chemical composition and trypanocidal activity evaluation of essential oils from *Hedychium coronarium* against *Trypanosoma brucei* strains.** Congresso: 43rd International Symposium on Essential Oils - ISEO, 05 a 08 de setembro de 2012. Faculty of Sciences of Lisbon, Lisbon, Portugal.

G.Z. Martins, N.O. Magalhães, F.A.J. Silva, A.M.A. Velásquez, D.F. Rodrigues, A.A.N. Kohatsu, A.E. Almeida, C.S. Planeta, R.M.B. Cicarelli, R.R.D. Moreira. **Trypanocidal activity of fruits extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hill. on *Trypanosoma brucei* strain.** Congresso: 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology - ISE13, 02 a 06 de setembro de 2012. Universitätsplatz 4, Graz, Áustria.

Arenas Velásquez, A.M.; Rodrigues, D.F.; Silva, F.J.A.; Chiari, B.G.; Almeida, M.G.J.; Isaac, V.L.; Francisco, A.I.; Vargas, M.D.; Cicarelli, R.M.B. **Evaluation of the Trypanocidal activity of diamines and ferrocenyl diamines against *Trypanosoma brucei* strains.** Congresso: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 23 a 27 de setembro de 2012. Hotel Royal Tulip, Rio de Janeiro, RJ.

ARENAS VELÁSQUEZ, A. M.; SILVA, F.A.J.; RODRIGUES, D.F.; KOHATSU, A.A.N.; Chiari, B.G.; DE ALMEIDA, M.G.J.; ISAAC, V.L.B.; Francisco, A.I.; Vargas, M.D.; Cicarelli, R.M.B. **Evaluation of the trypanocidal activity of 1,4-naphthoquinones against *Trypanosoma brucei* strains.** Congresso: XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas` Disease - SBPZ, 01 a 03 de outubro de 2012. Centro de Convenções Hotel Glória, Caxambu, MG.

KOHATSU, A.A.N.; SILVA, F.A.J.; ARENAS VELÁSQUEZ, A. M.; RODRIGUES, D.F.; Chiari, B.G.; DE ALMEIDA, M.G.J.; Francisco, A.I.; DA SILVA, M.T.A.; ROSA, J.A.; Vargas, M.D.; ISAAC, V.L.B.; Cicarelli, R.M.B. **Evaluation of the susceptibility of epimastigote strains from *T. cruzi* to ferrocenyl diamines.** Congresso: XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas` Disease - SBPZ, 01 a 03 de outubro de 2012. Centro de Convenções Hotel Glória, Caxambu, MG.

Participação em eventos científicos

Conferencista no II Congresso Saúde UNIFEV, 2013. (Congresso). Versatilidade do Farmacêutico.

Apresentação de Poster / Paineis no(a) FAMERP-UTMB: Emerging Infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA, 2012. (Congresso). Evaluation of Trypanocidal activity of *Distictella mansoana*, *Jacaranda puberula* and *Stizophyllum perforatum* extracts on *Trypanosoma cruzi* Y strain.

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 23 a 27 de setembro de 2012. Hotel Royal Tulip, Rio de Janeiro, RJ.

II Congresso Farmacêutico da UNESP / 59ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 18 a 24 de agosto de 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

I Semana Internacional de Fitoterapia de Araraquara, 27 de abril a 01 de maio de 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

FAMERP-UTMB: "Emerging Infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA", 07 e 08 de março de 2012. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP.

IV Workshop All Pharma Júnior - Oportunidades do Mundo Farmacêutico, 23 e 24 de maio de 2011. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

I Congresso Farmacêutico da UNESP / 58ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 20 a 26 de agosto de 2011. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

Workshop: Uso de recursos da biodiversidade e sua transferência - Projeto Inova São Paulo, 16 de agosto de 2011. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, SP.

Organização de evento

Membro da Comissão Organizadora - Congresso: I Semana Internacional de Fitoterapia de Araraquara, 27 de abril a 01 de maio de 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

DEDICATÓRIA

*A Deus, que durante todo esse trabalho
e por toda a minha vida tem me acompanhado
e iluminado. Dedico também a meus pais,
com todo meu amor e gratidão, por tudo que
fizeram por mim ao longo de minha vida;
e à minha noiva pelo apoio e ajuda
nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora**, por sempre me darem forças para continuar rompendo os obstáculos do cotidiano, pelas bênçãos derramadas em minha vida e de toda a minha família.

A meus Pais, **Osvaldo** e **Marilda**, minhas bases, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, e por simplesmente terem me feito existir, por tanto amor, por tudo o que eu sou, pela oração, por terem me proporcionado educação e amor pelos estudos, e, apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

À minha noiva, **Carla**, que apesar da distância soube me apoiar e ajudar nas barreiras da vida, por todo amor, confiança, além do apoio e incentivo desde o início ao fim deste trabalho. Obrigado por estar em minha vida e por toda a coragem que você me deu durante esta jornada, que também dedico a você...

A meus irmãos, **Renan** e **Cristiane**, e a todos da minha família, pelo apoio e incentivo prestados.

À **Prof^a. Dr^a. Regina Maria Barretto Cicarelli**, pela acolhida em seu laboratório, pela paciência e compreensão diante de minha inexperiência. Agradeço pelos ensinamentos que possibilitaram meu amadurecimento científico, intelectual e pessoal e pela confiança em minha capacidade.

À **Angela**, pelo trabalho em conjunto e a todos do laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos e do laboratório de Investigação de Paternidade que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Marco Túlio**, que contribuiu com seus conhecimentos práticos e teóricos sobre biologia molecular e o manuseio das cepas do parasito.

À secretária do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, **Margarete Rossi Ferreira**, pela gentileza, pela atenção, sempre disposta a ajudar.

A todos os funcionários: **Wennia, Sandra, Célia, Ana Paula e Cíntia** da Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelos prestados e pela atenção.

A todos os funcionários da biblioteca do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelo auxílio nas correções das referências.

A todos do laboratório de cosmetologia da FCFAr/UNESP, **Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia Isaac, Bruna e Gabriela**, pela realização e auxílio nos testes com células de mamíferos e por todos os seus conhecimentos adicionados a este trabalho.

À **Prof^ª. Dr^ª. Raquel Regina Duarte Moreira** e **Gilmárcio** do Laboratório de Farmacognosia da FCFAr/UNESP, que contribuiu com as amostras e seus conhecimentos gerais.

À **Prof^ª. Dr^ª. Silvia Noelí López**, da Universidad Nacional de Rosario, que além de contribuir com as amostras pode auxiliar no conhecimento específico da planta como um todo.

À banca da qualificação composta por **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa** e a **Prof^ª. Dr^ª. Raquel Regina Duarte Moreira**, que enriqueceram esse estudo com suas relevantes contribuições teóricas.

À banca da defesa desse trabalho composta por **Prof. Dr. Roberto Carlos Grassi Malta** e a **Prof^ª. Dr^ª. Thalita Pedroni Formariz Pilon**, que contribuíram com sugestões importantes para a finalização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES**, pela bolsa concedida e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp - **FUNDUNESP**, pelo auxílio financeiro ao projeto.

*“... Mas é preciso ter força, é preciso ter raça
É preciso ter gana sempre ...
... Mas é preciso ter manha, é preciso ter graça
É preciso ter sonho, sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania de ter fé na vida.”*

Milton Nascimento e Fernando Brant

Resumo

Protozoários como *Trypanosoma brucei* são causadores de importantes doenças que acometem os seres humanos e animais, como a doença do sono. A distribuição desses tripanosomas é exclusiva da África (região central, oeste e leste), sendo transmitidos por moscas do gênero *Glossina*, mais conhecidas como moscas tsé-tsé. Cerca de 60 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença, e muitos casos novos ocorrem a cada ano. Atualmente, os fármacos disponíveis apresentam um número elevado de efeitos colaterais, tornando indispensável à busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse contexto, a prospecção por substâncias tripanocidas a partir de plantas é uma estratégia válida e importante. *Melampodium divaricatum* é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como falsa-calêndula e por apresentar atividade antimalárica. *Hedychium coronarium* conhecida como lírio-do-brejo; é uma planta bem adaptada no Brasil e apresenta atividade anti-helmíntica. A planta *Polygonum ferrugineum* também encontrada na América do Sul apresenta atividades antibióticas e antifúngicas, e é popularmente conhecida como fumo-bravo. No presente trabalho, avaliou-se a atividade tripanocida dos óleos essenciais obtidos das partes aéreas de *M. divaricatum*, dos rizomas e folhas de *H. coronarium* e os seus compostos majoritários 8 (1,8 cineol/eucaliptol) e 9 (óxido de cariofileno), respectivamente; dos extratos e substâncias isoladas de *Polygonum ferrugineum* frente a duas cepas de *T. brucei* (método colorimétrico de MTT). Também, utilizando a técnica de RT-PCR (transcriptase reversa), foram avaliados se alguns dos compostos selecionados apresentariam interferência no processamento de RNA mensageiro (mRNA) do parasito, uma vez que, diferente de outros eucariotos, cujo processamento dos mRNA realiza-se por um mecanismo chamado *cis-splicing*, os tripanosomatídeos utilizam o *trans-splicing*. Os resultados para os ensaios citotóxicos demonstraram graus variados de citotoxicidade no parasito, sendo que um extrato (extrato hexânico bruto - EHB) apresentou uma atividade notável e uma das substâncias (substância 3) revelou um alto potencial de atividade tripanocida, apresentando um IC₅₀ de 1,77 µg/mL para uma das cepas de *T. brucei*. A substância é uma chalcona e vários estudos foram reportados indicando inúmeras propriedades biológicas como antimalárica, antiviral, antileishmaniose, antitumoral, entre outras. Observou-se também que os mesmos compostos (EHB e substância 3) interferiram com o processamento de mRNA do parasito.

Palavras-chave: *Melampodium divaricatum*. *Hedychium coronarium*. *Polygonum ferrugineum*. *Trypanosoma brucei*. Atividade tripanocida. RT-PCR (transcriptase reversa).

Abstract

Protozoa such as *Trypanosoma brucei* are causative important diseases affecting humans and animals, such as sleeping sickness. The distribution of these trypanosomes is unique to Africa (central, west and east), being transmitted by flies of the genus *Glossina*, better known as tsetse flies. About 60 million people are at risk of contracting the disease, and many new cases occur each year. Currently, available drugs have a high number of side effects, making it essential to search for new drug development. In this context, the prospect for trypanocidal substances from plants is an important and valid strategy. *Melampodium divaricatum* is a plant native to South America, popularly known as “falsa-calêndula” and display antimalarial activity. *Hedychium coronarium* known as “lírio-do-brejo”; is a plant well adapted in Brazil and has anthelmintic activity. The plant *Polygonum ferrugineum* also found in South America has antibiotic and antifungal activities, and is popularly known as “fumo-bravo” In the present work, evaluated the trypanocidal activity of essential oils obtained from aerial parts of *M. divaricatum*, rhizomes and leaves of *H. coronarium* and its major compounds 8 (1.8 cineole / eucalyptol) and 9 (caryophyllene oxide), respectively; of extracts and substances of *Polygonum ferrugineum* against two strains of *T. brucei* were evaluated (MTT colorimetric method). Also, using the technique of RT-PCR (reverse transcription), were evaluated if any of the selected compounds would show interference in the processing of messenger RNA (mRNA) of the parasite, since, unlike other eukaryotes, mRNA processing which is carried out by a mechanism *cis-splicing* called the trypanosomatids using the *trans-splicing*. The results for the cytotoxic assays demonstrated varying degrees of cytotoxicity in the parasite, and one extract (crude hexanic extract - CHE) showed a remarkable activity and substance (substance 3) revealed a high potential trypanocidal activity, with a CI_{50} of 1.77 mg/mL for one strain of *T. brucei*. The substance is a chalcone and many studies are reported indicating numerous biological properties such as antimalarial, antiviral, antileishmaniose, antitumor, among others. It was also observed that these compounds (CHE and substance 3) interfere with mRNA processing of the parasite.

Keywords: *Melampodium divaricatum*. *Hedychium coronarium*. *Polygonum ferrugineum*. *Trypanosoma brucei*. Trypanocidal activity. RT-PCR (reverse transcription).

	Página
Figura 1 - Distribuição geográfica do <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> (amarelo) e <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> (vermelho).....	27
Figura 2 - Morfologia do <i>Trypanosoma brucei</i> durante o seu ciclo biológico. Formas: a) sanguínea delgada; b) sanguínea intermediária; c) sanguínea larga; d) procíclica; e) epimastigota e f) metacíclica.....	27
Figura 3 - Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.....	28
Figura 4 - Comparação entre os mecanismos de <i>cis-splicing</i> (A) e <i>trans-splicing</i> (B). As duas etapas de transesterificação estão apresentadas. 5' (GU) e o 3' (AG) sítios de corte (SS) e a sequência BP estão indicadas. BP: <i>Branch point</i> (ponto de ramificação); PPT: <i>Polypyrimidine tract</i> (Trato de polipirimidina); SL: <i>Spliced leader</i> ; SS: <i>Splice site</i> (sítios de corte).....	31
Figura 5 - Estrutura básica das chalconas.....	37
Figura 6 - Estruturas ativas de algumas chalconas.....	38
Figura 7 - Estruturas das substâncias isoladas. A) <i>Polygonum ferrugineum</i> ; B) <i>Hedychium coronarium</i>	50
Figura 8 - Demonstração do ensaio colorimétrico de MTT.....	54
Figura 9 - Esquema de tratamento das células HepG2 para os ensaios citotóxicos de MTT em placa de 96 poços.....	57
Figura 10 - Esquema do ensaio de MTT.....	57
Figura 11 - Anelamento dos <i>primers</i> TS1 e TS2 para a forma não-processada de α -tubulina (banda de 218 pb - pré α -tub).....	60

Figura 12 - Anelamento dos <i>primers</i> TS3 e TS4 para a forma processada de α -tubulina (banda de 871 - pb - α tub).....	61
Figura 13 - Anelamento dos <i>primers</i> 7SL1 e 7SL2 utilizados como controle (banda de 123 pb).....	61
Figura 14 - Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional da reação de <i>trans-splicing</i> . TS1 e TS2 anelam-se no éxon e íntron, ainda não processados do transcrito de α -tubulina (Pré- α -tub). Para avaliação do processamento da α -tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon, quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). E, éxon; I, íntron; SL, <i>Spliced leader</i>	62
Figura 15 - Curva de crescimento de <i>Trypanosoma brucei</i> - cepa 427....	70
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. 7 SL: <i>primers</i> 7SL1/7SL2; α -tub: <i>primers</i> TS1/TS2; Pré α -tub: <i>primers</i> TS3/TS4; ↑: acúmulo; ↓: diminuição.....	71

Tabela 1 -	Atividade tripanocida e índice de segurança de <i>Melampodium divaricatum</i> . ^a IC ₅₀ (µg/mL); ^b S.I.: <i>Safety Index</i> ; ND: Não Determinado; O.E.: Óleo Essencial.....	64
Tabela 2 -	Atividade tripanocida e índice de segurança de <i>Polygonum ferrugineum</i> e seus compostos isolados. ^a IC ₅₀ (µg/mL); ^b S.I.: <i>Safety Index</i> ; ext.: extrato.....	65
Tabela 3 -	Atividade tripanocida e índice de segurança de <i>Hedychium coronarium</i> . ^a IC ₅₀ (µg/mL); ^b SI: <i>Safety Index</i> ; O.E.: Óleo Essencial.....	68

QUADROS

	Página
Quadro 1 - Efeitos colaterais durante o tratamento da doença do sono..	34
Quadro 2 - Características das cepas de <i>Trypanosoma brucei</i>	51
Quadro 3 - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR.....	59
Quadro 4 - Condições empregadas nas reações de PCR para os iniciadores TS1 e TS2 (pré α -tub) e TS3 e TS4 (α -tub).....	60
Quadro 5 - Condições empregadas nas reações de PCR para os iniciadores 7SL1 e 7SL2.....	60

FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma 1 - Obtenção dos óleos essenciais e seus compostos majoritários de <i>Hedychium coronarium</i>	45
Fluxograma 2 - Obtenção do óleo essencial e seu composto majoritário de <i>Melampodium divaricatum</i>	47
Fluxograma 3 - Obtenção dos extratos e substâncias de <i>Polygonum ferrugineum</i>	49

AcOEt – Acetato de Etila

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

cap – Capacete do RNA

CG/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMC – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

EAB – Extrato Acetado de Etila Bruto

EDB – Extrato Diclorometânico Bruto

EHB – Extrato Hexânico Bruto

EMB – Extrato Metanólico Bruto

h – Hora (s)

Hex – Hexano

IC₅₀ – Índice de Citotoxicidade 50 %

kb – Quilo base (1000 pares de base)

M – Molar

MEM – *Minimum Essential Media*

MeOH – Metanol

min – Minuto (s)

MTT – Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio

pb – Pares de base

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

PMS – Metossulfato de Fenazina

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotação Por Minuto

RT-PCR – Transcrição Reversa seguida de Reação de Polimerase em Cadeia

S – Sul

SDM-79 – *Semi-Defined Medium-79*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

seg – Segundo (s)

SL – *Spliced leader*

W – Oeste

α – Alfa

β – Beta

TA – Temperatura Ambiente

> – Maior que

< – Menor que

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	<i>Trypanosoma brucei</i> e doença do Sono	26
1.1.1	Ciclo Biológico e Transmissão	28
1.1.2	Glicoproteína variante de superfície (VSG)	29
1.1.3	Processamento dos RNA mensageiros (mRNAs)	29
1.1.3.1	Processamento dos mRNAs em tripanosomatídeos	30
1.1.3.1.1	<i>Trans-splicing</i>	30
1.1.4	Sintomatologia	31
1.1.5	Diagnóstico	32
1.1.6	Terapêutica	33
1.2	Produtos naturais e seu uso na terapêutica	35
1.3	<i>Hedychium coronarium</i> J. König	35
1.4	<i>Melampodium divaricatum</i> (Rich. In Pers.)	36
1.5	<i>Polygonum ferrugineum</i> Wedd.	36
1.5.1	Chalconas	37
1.6	Óleos Essenciais	39
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	<i>Hedychium coronarium</i>	44
3.1.1	Material Vegetal	44
3.1.2	Obtenção dos óleos essenciais	44
3.2	<i>Melampodium divaricatum</i>	45
3.2.1	Material Vegetal	46
3.2.2	Obtenção do óleo essencial	46
3.3	<i>Polygonum ferrugineum</i>	47
3.3.1	Material Vegetal	47
3.3.2	Obtenção dos extratos	48
3.3.3	Fracionamento dos extratos e purificação dos compostos avaliados	48
3.4	<i>Trypanosoma brucei</i>	50
3.4.1	Obtenção das formas	50
3.4.2	Cultivo dos parasitos	51
3.5	Ensaio citotóxico do MTT	51
3.5.1	Contagem de parasitos	52
3.5.2	Diluição e preparo das amostras	53
3.5.3	Montagem e finalização do teste	53

3.6	Determinação do índice de citotoxicidade 50 % (IC ₅₀)	55
3.7	Teste de citotoxicidade em células HepG2 (Hepatoma humano)	55
3.7.1	Cultivo das células e preparo do teste	56
3.8	Teste de avaliação da interferência na produção de mRNA do parasito	58
3.8.1	Curva de crescimento da cepa 427 de <i>Trypanosoma brucei</i>	58
3.8.2	Extração de RNA total	58
3.8.3	Reação de RT-PCR (utilizando o kit 3' RACE - <i>System for Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	Ensaaios citotóxicos em <i>Trypanosoma brucei</i> e HepG2	64
4.1.1	<i>Melampodium divaricatum</i>	64
4.1.2	<i>Polygonum ferrugineum</i>	65
4.1.3	<i>Hedychium coronarium</i>	67
4.2	Avaliação das alterações na produção de mRNA do gene α -tubulina da cepa 427 de <i>Trypanosoma brucei</i>	69
4.2.1	Resultado da curva de crescimento da cepa 427 de <i>Trypanosoma brucei</i>	69
4.2.2	Resultado das reações de RT-PCR	70
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75

Introdução

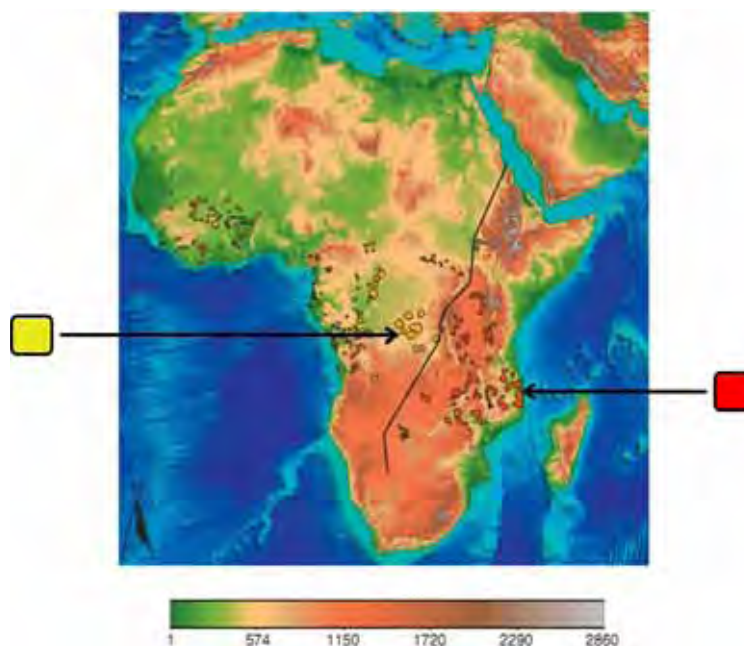
1.1 *Trypanosoma brucei* e doença do Sono

A tripanosomíase africana ou doença do sono é causada por *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*. O *T. b. brucei* foi descrito por David Bruce em 1894, espécie encontrada em animais domésticos, relacionada à doença denominada de nagana. A distribuição desses tripanosomas é exclusiva da África, sendo transmitido por moscas do gênero *Glossina*, mais conhecidas como moscas tsé-tsé (COX, 2004; KIRCHHOFF et al., 2009).

Cerca de 60 milhões de pessoas principalmente as que vivem em zonas rurais da África correm risco de contrair a doença, e muitos casos novos ocorrem a cada ano, porém não se pode comprovar esse número devido à difícil estatística em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012a, 2012b).

O *T. b. gambiense* é encontrado principalmente no oeste e região central da África (Figura 1), causando a doença do sono crônica ou gambiense, que geralmente é transmitida por moscas do gênero *Glossina morsitans* que se alimentam de animais silvestres. Por outro lado, o *T. b. rhodesiense* é encontrado no leste da África (Figura 1), causando a doença do sono aguda ou rhodesiense, que é mais perigosa, pois a doença se desenvolve mais rapidamente. Este protozoário geralmente é transmitido por moscas do gênero *Glossina palpalis* que se alimentaram de humanos infectados, porém, porcos e cães também podem servir de reservatório (COX, 2004).

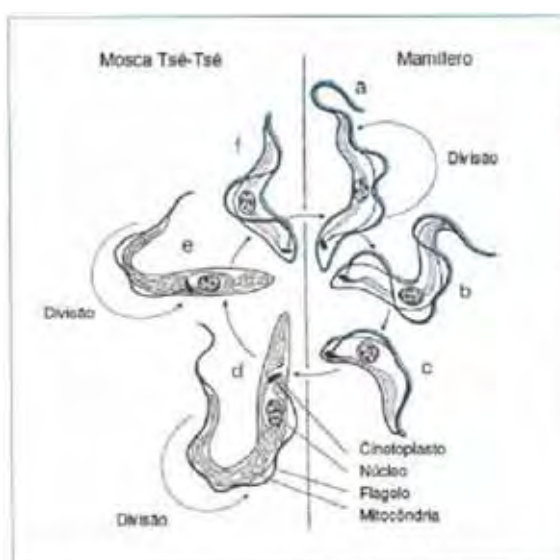
Figura 1 - Distribuição geográfica do *Trypanosoma brucei gambiense* (amarelo) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (vermelho).



Fonte: Welburn; Maudlin; Simarro (2009, p. 708).

Durante o ciclo biológico, o parasito se diferencia em algumas formas e se multiplica por divisão binária, tanto no hospedeiro como no vetor (Figura 2).

Figura 2 - Morfologia do *Trypanosoma brucei* durante o seu ciclo biológico. Formas: a) sanguínea delgada; b) sanguínea intermediária; c) sanguínea larga; d) procíclica; e) epimastigota e f) metacíclica.

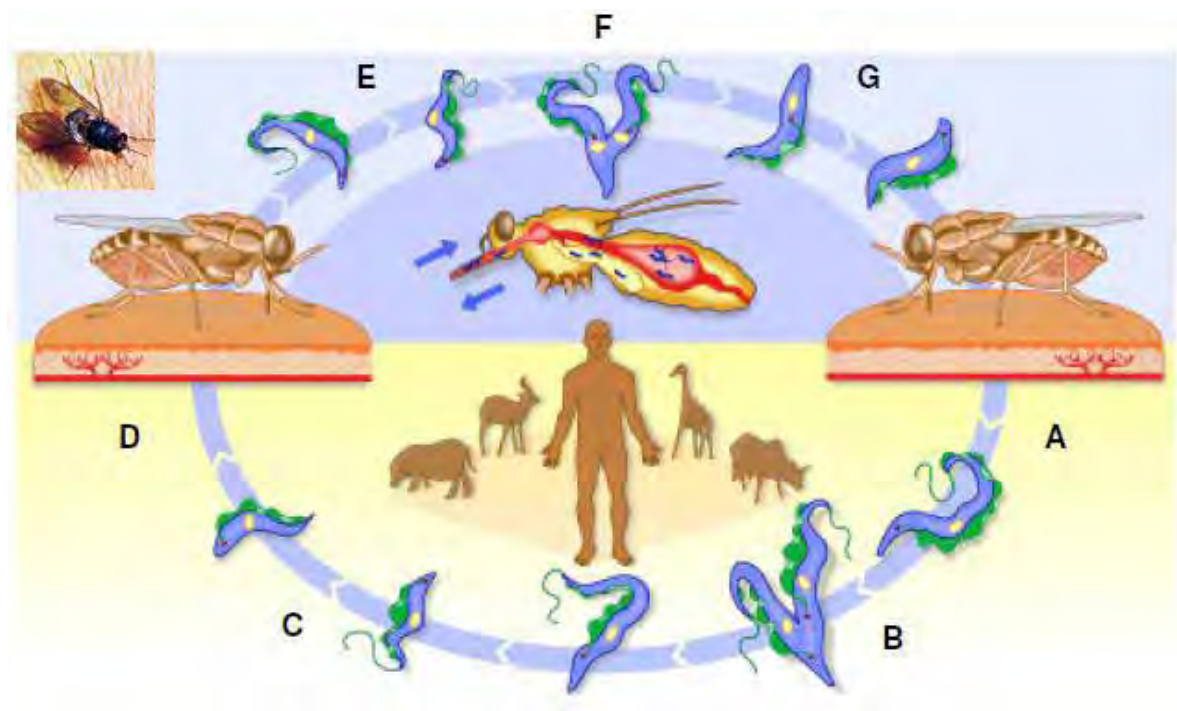


Fonte: Silva (2009, p. 10).

1.1.1 Ciclo Biológico e Transmissão

Durante o ciclo da tripanosomíase africana, a mosca contaminada (*Glossina* sp) injeta formas tripomastigotas metacíclicas (A) durante a picada. O parasito se diferencia em forma tripomastigota sanguínea, que se multiplica na corrente sanguínea (B). Os parasitos se espalham pela corrente sanguínea, podendo atingir o sistema nervoso central. Com a alta parasitemia, essas formas se tornam mais curtas e largas (C). Outra mosca ingere essas formas tripomastigotas, contaminando-se (D). As formas tripomastigotas se diferenciam em formas procíclicas (E) e em seguida em epimastigotas que se multiplicam na glândula salivar (F). Após a multiplicação, essas formas transformam-se em tripomastigotas metacíclicas (G) e o ciclo inicia-se novamente (BRUCE, 1914). O ciclo biológico se encontra esquematizado na Figura 3.

Figura 3 - Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.



Fonte: Silva (2009, p. 11).

1.1.2 Glicoproteína variante de superfície (VSG)

Os tripanosomas possuem uma característica única em sua membrana celular, a glicoproteína variante de superfície (VSG), que constitui uma importante interface molecular entre tripanosomas e o sistema imunitário do hospedeiro, atuando no impedimento da lise do parasito. Dessa maneira os anticorpos liberados contra um epítipo peptídico não podem reconhecer a composição antigênica da VSG. Assim, ocorre uma alteração em sua VSG e uma nova resposta imunológica é desencadeada, repetindo-se por inúmeras vezes esse processo. O acúmulo de anticorpos decorrentes desse processo acaba levando a uma hipergamaglobulinemia, tendo consequências importantes no decorrer da doença (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006; JANNIN; SIMARRO, 2008).

1.1.3 Processamento dos RNA mensageiros (mRNAs)

Desde 1990, os cientistas observaram que eucariotos possuem genomas muito grandes com centenas de milhares de íntrons. A maioria dos genes codificadores de proteínas no genoma humano são compostos de vários éxons interrompidos por íntrons. Avanços no conhecimento da genômica e proteômica de mamíferos confirmaram a necessidade de reprogramação do mRNA usado para obter os produtos dos genes e produção de proteínas e a importância do processamento dos mRNAs, denominado *splicing*, que é um passo essencial da expressão do gene através da remoção de sequências não-codificadoras (íntrons) para ligadura juntas das sequências codificantes (éxons). Os éxons são geralmente curtos com 50 a 250 pb, enquanto que os íntrons são muito maiores e podem chegar a vários milhares de pb.

Splicing é um evento nuclear complexo de processamento dos RNAs, em que éxons diferentes do mRNA de transcritos primários estão unidos. As sequências intrônicas são removidas do pré-mRNA e os éxons fundidos resultando na formação do mRNA maduro, posteriormente é adicionado na sua extremidade 5' o *cap* e poliadenilação em sua extremidade 3', após estas modificações é transportado para

fora do núcleo para ser traduzido em proteínas no citoplasma (revisão em CICARELLI et al., 2012).

1.1.3.1 Processamento dos mRNAs em tripanosomatídeos

Grande parte dos genes de eucariotos possui uma estrutura que alterna éxons e íntrons. Logo após a transcrição, íntrons devem ser retirados a partir do transcrito primário (pré-mRNA) para gerar um mRNA maduro. A união dos éxons vizinhos e a precisa excisão dos íntrons ocorrem por um processo complexo chamado de *splicing*, que quando ocorre dentro de uma única molécula de pré-mRNA é denominada de *cis-splicing*, sendo este o processamento dos mRNAs em mamíferos (WILL; LÜHRMANN, 2001; MAYER; FLOETER-WINTER, 2005).

Já em tripanosomas e leishmanias, os RNAs são processados por um mecanismo diferente chamado de *trans-splicing*. As regiões de dois transcritos separados (em lugar de um único pré-mRNA) são unidas de forma que todo o mensageiro maduro inicia-se com a mesma sequência (aproximadamente 40 nucleotídeos), denominada *spliced leader* (SL) (TSCHUDI; ULLU, 1990; NILSEN, 1995; PERIS et al., 1997; CAMPBELL, 1999; STURM; STURM; YU; CAMPBELL, 1999; MICHAELI, 2011).

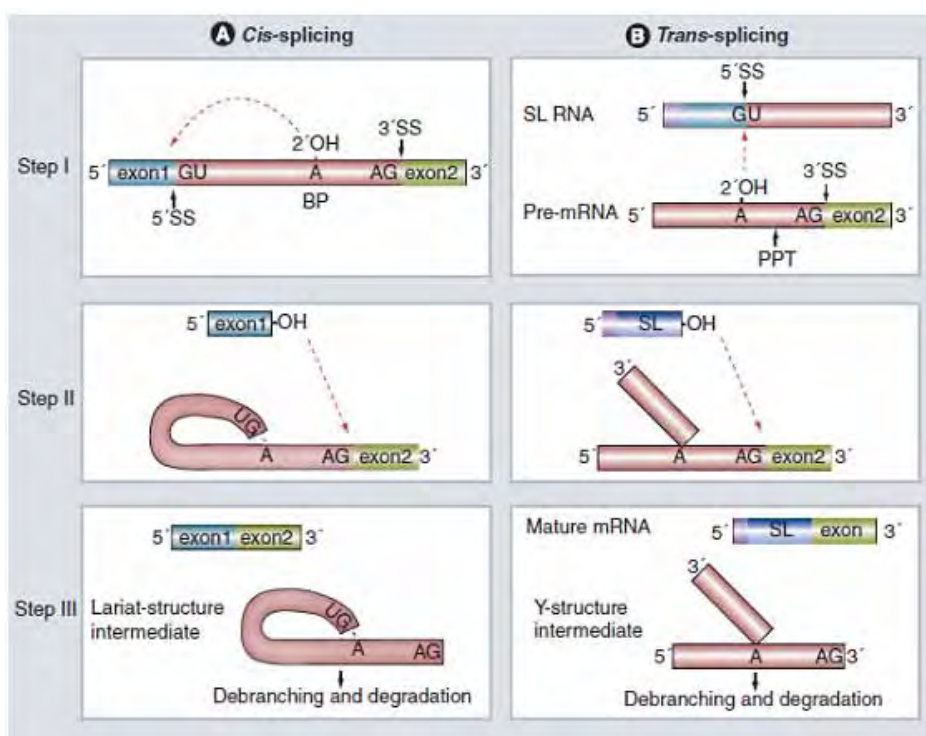
1.1.3.1.1 *Trans-splicing*

Trans-splicing é uma reação intermolecular de processamento de RNA, na qual estão envolvidas duas moléculas distintas de RNA que serão convenientemente unidas, formando um RNA mensageiro maduro. Principais componentes desta reação são o pré-mRNA, transcritos de forma policistrônica em tripanosomatídeos e um pequeno RNA, chamado de *spliced leader* (SL) RNA. Na sequência que representa a extremidade 5' do SL RNA, ocorre uma associação ao 3' *splice site*, para dar origem ao RNA maduro (SHAKED et al., 2010; MICHAELI, 2011). Em 1982, houve o primeiro relato sobre esse tipo de processamento, o qual observou-se que uma sequência idêntica de 39 nucleotídeos permanecia sempre presente na

extremidade 5' de inúmeros transcritos de diferentes glicoproteínas de superfície de *Trypanosoma brucei* (ULLU; TSCHUDI, 1995).

A Figura 4 ilustra as principais diferenças entre o processamento de RNA por *cis* ou *trans-splicing*.

Figura 4 - Comparação entre os mecanismos de *cis-splicing* (A) e *trans-splicing* (B). As duas etapas de transesterificação estão apresentadas. 5' (GU) e o 3' (AG) sítios de corte (SS) e a sequência BP estão indicadas. BP: *Branch point* (ponto de ramificação); PPT: *Polypyrimidine tract* (Trato de polipirimidina); SL: *Spliced leader*; SS: *Splice site* (sítios de corte).



Fonte: Michaeli (2011, p. 460).

1.1.4 Sintomatologia

A doença do sono apresenta sintomatologia variada, porém, pode-se dizer que existem dois estágios clínicos que são observados durante a infecção, o estágio hemolinfático inicial e o estágio encefálico tardio (KENNEDY, 2004). Após a hematofagia da mosca tsé-tsé, um cancro se forma no local da picada,

desaparecendo após 2-3 semanas, dando origem ao estágio hemolinfático inicial (MOLYNEUX et al., 1996; DUMAS; BISSER, 1999), apresentando episódios de febre com linfadenopatia generalizada, seguidos de sintomas não específicos como vertigens, dores de cabeça, fraqueza generalizada e perda de peso; podendo atingir vários órgãos, como o fígado, os rins, o coração, a pele, o sistema endócrino e os olhos. No estágio seguinte chamado de encefálico tardio, observam-se sintomas neurológicos que envolvem anormalidades psiquiátricas, motoras, sensoriais e distúrbios do sono, podendo levar à morte (KENNEDY, 2004).

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da doença do sono é realizado após triagem com a população que vive em áreas de risco, sendo usado com mais frequência teste sorológico, o teste de cartão de aglutinação para tripanosomíase humana (CATT) para *T. b. gambiense* e LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) para *T. b. rhodesiense* (BRUN; BLUM, 2012). Os métodos sorológicos não são suficientemente específicos; casos sorologicamente positivos devem ser confirmados parasitologicamente pelo exame microscópico da linfa, sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR), o qual é obtido por punção suboccipital (logo abaixo do crânio) e diretamente observado ao microscópio, na busca por forma de *T. gambiense*.

Esfregaços sanguíneos corados também poderão ser utilizados no diagnóstico, porém a chance de detecção do tripanosoma é muito baixa (JANNIN; SIMARRO, 2008). Uma vez que o diagnóstico parasitológico seja estabelecido, procedimentos para a determinação do estágio da doença devem ser implementados para a escolha do medicamento adequado para o tratamento. Essa determinação é feita usando a contagem de células brancas do sangue e a presença de parasitos no LCR. O número de células para o primeiro estágio é de 5 células/mL. Se mais de 5 células/mL ou presença de tripanosomas no LCR, o paciente é considerado no segundo estágio. O aumento da concentração de imunoglobulina M (IgM) no LCR, utilizando procedimentos de teste simplificado, tem sido proposto como um marcador para o segundo estágio (JANNIN; SIMARRO, 2008).

1.1.6 Terapêutica

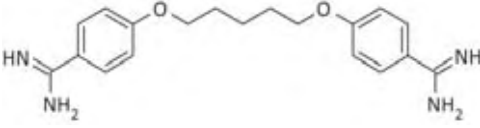
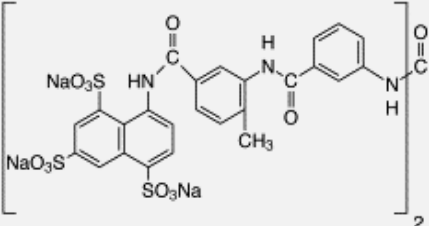
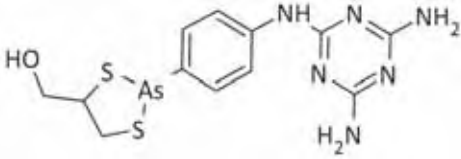
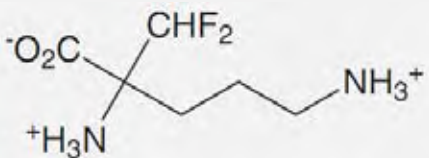
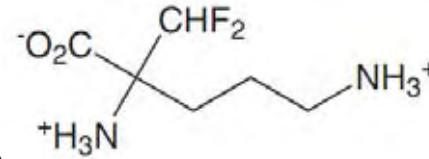
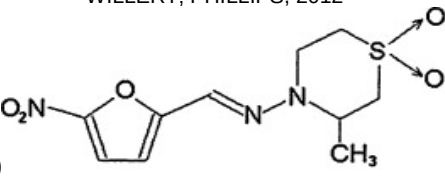
A quimioterapia para a doença do sono, tanto para o tratamento humano, quanto ao seu uso veterinário tem sido negligenciada (KIRCHHOFF et al., 2009). A sua terapêutica está apoiada nos fármacos pentamidina, que foi introduzido no mercado em 1940, exercendo ação contra o *T. b. gambiense* e a suramina, que foi introduzida no mercado em 1920, tendo ação contra o *T. b. rhodesiense*; ambas são utilizadas para a fase inicial da doença, porém, a última também pode ser utilizada na fase crônica (KENNEDY, 2004; COX, 2004).

Para a fase crônica da doença, os fármacos devem possuir propriedades que permitam atravessar a barreira hematoencefálica (SNC), bem como uma maior lipossolubilidade, o que torna mais difícil o tratamento. Entretanto, existem dois fármacos utilizados, o melarsoprol, que foi introduzido em 1949, possuindo ação para ambas as espécies de *T. brucei* e a eflornitina, que foi introduzida em 1981, sendo eficaz somente para o *T. b. gambiense*; mas pode-se também utilizar uma combinação de eflornitina/nifurtimox, sendo o nifurtimox um dos fármacos usados na doença de Chagas (KENNEDY, 2004; COX, 2004; BRUN; BLUM, 2012; RASSI JÚNIOR; RASSI; REZENDE, 2012).

Esses fármacos além de serem altamente tóxicos aos indivíduos, não possuem uma alta eficácia contra o *T. brucei* (GARCIA, 2001; BRUN; BLUM, 2012), sendo necessária a busca por novas moléculas eficazes contra esse parasito. No Quadro 1 é apresentado alguns desses efeito colaterais que podem surgir durante o tratamento da doença do sono.

Não existe ainda nenhuma vacina para a doença do sono, apesar de vários estudos já realizados; não se consegue obter uma vacina eficaz devido à variação antigênica do parasito (COX, 2004; KIRCHHOFF et al., 2009; NOK, 2009).

Quadro 1 - Efeitos colaterais durante o tratamento da doença do sono.

Fármaco	Efeitos Colaterais	Estrutura Molecular
pentamidina	Abcesso asséptico; Diabetes, hipoglicemia Proteinúria Rabdomiólise Hipotensão Queixas subjetivas de mialgia, náuseas e anormalidades gustativa, dor de cabeça, dor no local da injeção, dor abdominal	 BAKER et al., 2013
suramina	Reações imediatas: Náuseas, vômitos, cólicas, Choque anafilático (<1/2000), urticária Reações recentes (3-48 horas): Reação febril Fotofobia, lacrimejamento Hiperestesia Reações tardias: Comuns: lesão renal, proteinúria (geralmente leve) Raras: dermatite alérgica, polineuropatia, agranulocitose, anemia hemolítica	 BARRETT; BARRETT, 2000
melarsoprol	Reações encefalopáticas - Convulsões - Coma progressivo Reações cutâneas Erupções máculo-papulares ou bolhosas, dermatite esfoliativa Polineuropatia Hipotensão, diarreia Alteração de eletrocardiograma (ECG), arritmia	 BAKER et al., 2013
eflornitina	Convulsões Anemia, leucopenia, trombocitopenia, Diarreia, náuseas, vômitos, dor abdominal	 WILLERT; PHILLIPS, 2012
combinação de eflornitina (A) / nifurtimox (B)	Náuseas, vômitos Convulsões Anemia, leucopenia, trombocitopenia	A)  WILLERT; PHILLIPS, 2012 B)  URBINA, 2010

Fonte: Brun; Blum (2012, p. 270).

1.2 Produtos naturais e seu uso na terapêutica

Os produtos minerais, animais e vegetais são fonte de inúmeros medicamentos (ESQUENAZI et al., 2002). A produção de alimentos, cosméticos e novos materiais estão diretamente relacionados à extração da biodiversidade, onde a humanidade é totalmente dependente (SOUZA et al., 2007). O desenvolvimento de um novo fármaco a partir de fontes naturais pode ser obtido com custos muito menores quando comparados com demais fármacos sintéticos; com isso há o interesse de inúmeras empresas pela busca por novos produtos ou compostos de origem natural para incorporar em produtos existentes (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

1.3 *Hedychium coronarium* J. König

A família Zingiberaceae possui cerca de 80 espécies caracterizadas pelo gênero *Hedychium*, no qual várias delas possuem propriedades medicinais, industriais ou comestíveis (HE, 2000; GOPANRAJ et al, 2005; GAO et al., 2008). Dentre essas espécies, pode-se citar a *Hedychium coronarium* J. König, que é uma monocotilêdonia encontrada na Ásia tropical bem adaptada na América do Sul, principalmente no Brasil, sendo popularmente chamada de gengibre-branco, lírio-do-brejo, lágrima-de-moça, lírio-branco, borboleta, mariazinha-do-brejo, lágrima-de-vênus e jasmin-borboleta (KISSMANN, 1991; SANTOS; PEDRALLI; MEYER, 2005).

H. coronarium é utilizada na medicina popular brasileira e seu extrato é usado no tratamento de dores, ferimentos, infecções em geral, inflamações na garganta e reumatismo (PIO CORRÊA, 1969; FACUNDO; MOREIRA, 2005). O extrato do rizoma, tanto seco quanto fresco, foi comprovado experimentalmente possuir atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Trichoderma* spp., sendo as duas últimas causadoras de dermatites (JOY; RAJAN; ABRAHAM, 2007); e o seu óleo volátil possui ação anti-helmíntica (OLIVEIRA et al., 1985). As folhas da *H. coronarium* apresentam um efeito diurético e anti-hipertensivo (RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO, 1988). Outras propriedades da *H. coronarium* segundo Matsuda et al. (2002) estão associadas à inibição da

permeabilidade vascular e produção de óxido nítrico em ratos. As flores, sob forma de infusão, também possuem efeito diurético e redutor da pressão arterial (DI STASI; HIRUMA, 2002).

Da mesma forma que o lírio-do-brejo produz substâncias antimicrobianas, verificou-se também a liberação de um componente cercaricida, com atividade contra *Schistosoma mansoni*, interferindo em sua multiplicação (WARREN; PETERS, 1968).

1.4 *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.)

A espécie *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.), nativa da América do Sul, pertence à família Asteraceae (AGRA; FREITAS; BARBOSA FILHO, 2007; BOTSARIS, 2007) e está entre as 40 espécies do gênero *Melampodium* (TURNER, 1993; BREMER; ANDERBERG, 1994). Essa espécie é conhecida popularmente como falsa-calêndula (NOGUEIRA et al., 2006), flor-amarela, estrelinha, flor-de-ouro (LORENZI, 2000); picão-da-praia (AGRA; FREITAS; BARBOSA FILHO, 2007); fel da terra e salsa da praia (BOTSARIS, 2007). O seu uso está comumente empregado na medicina popular (GIRÓN et al., 1991), onde na Guatemala, a planta inteira é usada contra resfriados e suas folhas são utilizadas como antimalárico e no tratamento de problemas estomacais (GIRÓN et al., 1991). Já no Brasil o seu uso popular é empregado para o tratamento da malária e muitas outras indicações como inflamações, febre, entre outras (BOTSARIS, 2007).

1.5 *Polygonum ferrugineum* Wedd.

A espécie *Polygonum ferrugineum* Wedd., popularmente conhecida como fumo-bravo (PIVARI; POTT; POTT, 2008), pertence à família Polygonaceae e está englobada em cerca de 300 espécies caracterizadas no gênero *Polygonum* (WANG; ZHANG; YANG, 2005). Esse gênero está espalhado em várias partes do mundo, sendo amplamente encontrado na América do Sul, principalmente em climas temperados. São conhecidos pelo fato de produzirem uma variedade de metabólitos

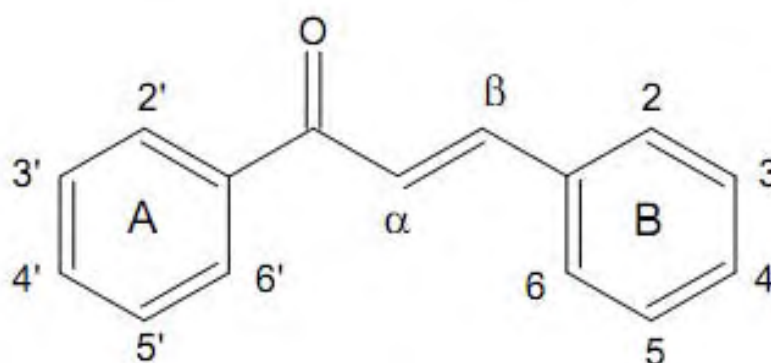
secundário incluindo os flavonóides (SARTOR; SILVA; SOUZA, 1999; PENG et al., 2003), triterpenos (DUWIEJUA et al., 1999), antraquinonas (MATSUDA et al., 2001; YIM et al., 1998), comarinas (SUN; SNEDEN, 1999), fenilpropanóides (MURAI et al., 2001; TAKASAKI et al., 2001), lignanas (KIM; WOO; PARK, 1994), sesquiterpenos (DATTA et al., 2000) e taninos (WANG; ZHANG; YANG, 2005).

Na Argentina é empregada na medicina tradicional para curar feridas, como antisséptico, antibiótico ou antifúngico (LÓPEZ; FURLAN; ZACCHINO, 2011).

1.5.1 Chalconas

As chalconas pertencem à família dos flavonóides e estão envolvidas na sua biossíntese; possuem uma estrutura molecular versátil, cujos seus derivados são alvos de muitas pesquisas (BANDGAR et al., 2010b). As chalconas purificadas de fontes naturais são amplamente conhecidas por apresentarem atividades antifúngicas e antimaláricas (ELSOHLY et al., 2001; DOMÍNGUEZ et al., 2001).

Figura 5 - Estrutura básica das chalconas.



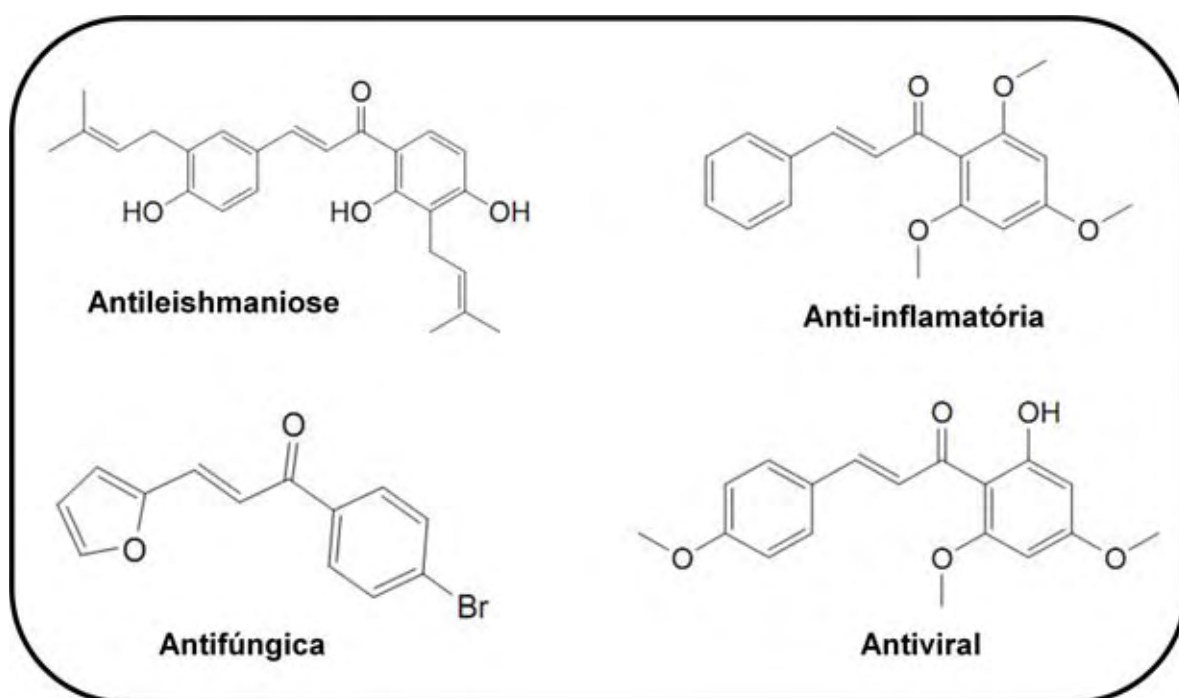
Fonte: Silva (2008, p. 26).

A estrutura básica das chalconas possui uma conjugação do grupo carbonila com a porção olefínica ligando os grupos aromáticos e de um ponto de vista químico, as chalconas são cetonas α e β insaturadas (Figura 5). Existe uma característica nas chalconas que pode fornecer à molécula um grande potencial

biológico (NOWAKOWSKA, 2007) antioxidante e, ainda, sua utilização em aplicações ópticas não-lineares (NLO) (HARRISON et al., 2005). Isso ocorre através da combinação destes grupos carboxila e olefínica, que quando unidos forma uma cadeia reativa ceto-etileno (DAS et al., 2010), podendo levar à conjugação dos dois anéis aromáticos (PATIL et al., 2009).

Os compostos apresentados na Figura 6 citados por Wattenberg e colaboradores (1994) demonstram diversas ligações com substituintes e grupos aromáticos, porém a conexão dos grupos aromáticos é mantida através da formação da cadeia ceto-olefínica. A maior parte das chalconas é conhecida pelas suas atividades biológicas.

Figura 6 - Estruturas ativas de algumas chalconas.



Fonte: Carvalho Júnior (2012, p. 15).

As chalconas têm sido alvo de muitas pesquisas por apresentarem atividades biológicas como anti-inflamatória (BATT et al., 1993; DIMMOCK et al., 1999; WON et al., 2005; TANAKA et al., 2009), antifúngica, inseticida (DIMMOCK et al., 1999; KUMAR et al., 2003; BOECK et al., 2005; SIVAKUMAR; MUTHU KUMAR; DOBLE,

2009), antitumoral (YAMAMOTO et al., 1991; DIMMOCK et al., 1999; KUMAR et al., 2003; RAO; FANG; TZENG, 2004; WON et al., 2005), analgésica, antileishmaniose (RIZVI et al., 2010), antioxidante (DIMMOCK et al., 1999; PADHYE et al., 2009), antimalárica (LI et al., 1995; DIMMOCK et al., 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2005; PADHYE et al., 2009), antibacteriana (DIMMOCK et al., 1999; NIELSEN et al., 2004; NOWAKOWSKA et al., 2008; ÁVILA, 2008), antiviral (ISHITSUKA et al., 1982; DIMMOCK et al., 1999), entre outras. Essas propriedades farmacológicas diferentes umas das outras, só é possível devido à ocorrência de uma substituição dos anéis aromáticos A ou B por outro substituinte (CHIARADIA et al., 2008).

As chalconas que possuem ligantes metoxila apresentam como um dos principais fatores o aumento na sua atividade, em especial as que possuem um efeito antimalárico (KUMAR et al., 2010), antitumoral (ECHEVERRIA et al., 2009) e anti-inflamatória (BANDGAR et al., 2010a). Esses ligantes metoxila apresentam elétrons livres (REZK, et al., 2002), estando relacionado ao composto com atividade anti-malaria reportado por Kumar (2010), que além de apresentar estes elétrons livres apresentam também grupos retiradores de elétrons que estão localizados no anel B.

A atividade antimitótica também ficou comprovada contra células HeLa (linhagem de células tumorais), cujos estudos relacionados às chalconas confirmaram um aumento dessa atividade devido a molécula possuir mais de um grupo metoxila (EDWARDS; STEMERICK; SUNKARA, 1990).

1.6 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais consistem na maior parte de uma mistura de hidrocarbonetos (terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, entre outros) e também de alguns compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, entre outros) (GUENTHER, 1977; SIMÕES; SPITZER, 2004). Os compostos terpênicos, cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno são os mais frequentes e os monoterpenos correspondem a

aproximadamente 90 % da composição. Os diterpenos são encontrados apenas em óleos vegetais extraídos com solventes orgânicos.

De acordo com a família a que pertencem às espécies, os elementos voláteis podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos. Os óleos essenciais localizam-se em estruturas especiais de secreção, como cavidades, canais (bolsas) esquizógenos ou lisígenos, canais oleíferos, pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIANI et al., 2000; FABROWSKI, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2004). Além da variação de acordo com o órgão de localização, outros fatores podem interferir na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal, tais como: a época de coleta; condições climáticas e de solo, localização geográfica; ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (MOREIRA et al., 1980, ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; MEJDOUB; KATSIOTIS, 1998; WIRTHENSOHN; SEDGLEY, 1998; SIANI et al., 2000; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Dessa forma, o óleo essencial juntamente com seus componentes principais tem demonstrado um grande espectro de atividades biológicas e, com isso, pesquisadores ressaltam sua importância em vários campos da química dos alimentos, da farmacologia e farmacêutica (CRISTANI et al., 2007).

Cerca de 3.000 óleos essenciais são conhecidos e dentre estes aproximadamente 300 estão disponíveis comercialmente, em especial para as indústrias farmacêuticas, agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumes, sendo seus constituintes utilizados para muitas finalidades (SILVA et al., 2003; HAJHASHEMI; GHANNADI; SHARIF, 2003; PERRY et al., 2003).

Apesar de apresentar várias características benéficas, não podem ser descartados os efeitos tóxicos acarretados por essas substâncias, que podem levar desde uma simples reação cutânea a efeitos convulsivantes e psicotrópicos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; FABROWSKI, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- 2.1** Avaliar a atividade tripanocida dos óleos essenciais de *Melampodium divaricatum*, dos rizomas e das folhas de *Hedychium coronarium* e seus compostos majoritários e os extratos e substâncias isoladas de *Polygonum ferrugineum* em formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *T. brucei* por meio do método colorimétrico MTT.
- 2.2** Avaliar a atividade em células HepG2 (linhagem de hepatoma humano) e calcular o índice de segurança de cada composto (*Safety Index*).
- 2.3** Avaliar as alterações na produção de mRNA do gene α -tubulina da cepa 427 de *T. brucei*, tratadas com os compostos que apresentaram um IC_{50} relevante frente a pentamidina, utilizando o método de RT-PCR (*Reverse Transcription*).

Material e Métodos



3.1 *Hedychium coronarium*

Os óleos essenciais obtidos dos rizomas e das folhas de *H. coronarium* e de seus compostos majoritários (1,8 cineol/eucaliptol e óxido de cariofileno, respectivamente), foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Raquel Regina Duarte Moreira do Laboratório de Farmacognosia do Departamento PANT - FCFAr/UNESP.

3.1.1 Material vegetal

Folhas e rizomas de *H. coronarium* foram coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins pela Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete G. Martins - Câmpus Experimental do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Vicente - SP, Brasil; em março de 2011 e identificado pelo Dr. Vinicius Castro Souza - Agronomia, Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo - USP - Piracicaba, SP - Brasil. Exemplares das espécies foram depositados no Herbário da Escola Superior de Agricultura - ESA/USP sendo registrado com o número 93272 ESA.

3.1.2 Obtenção dos óleos essenciais

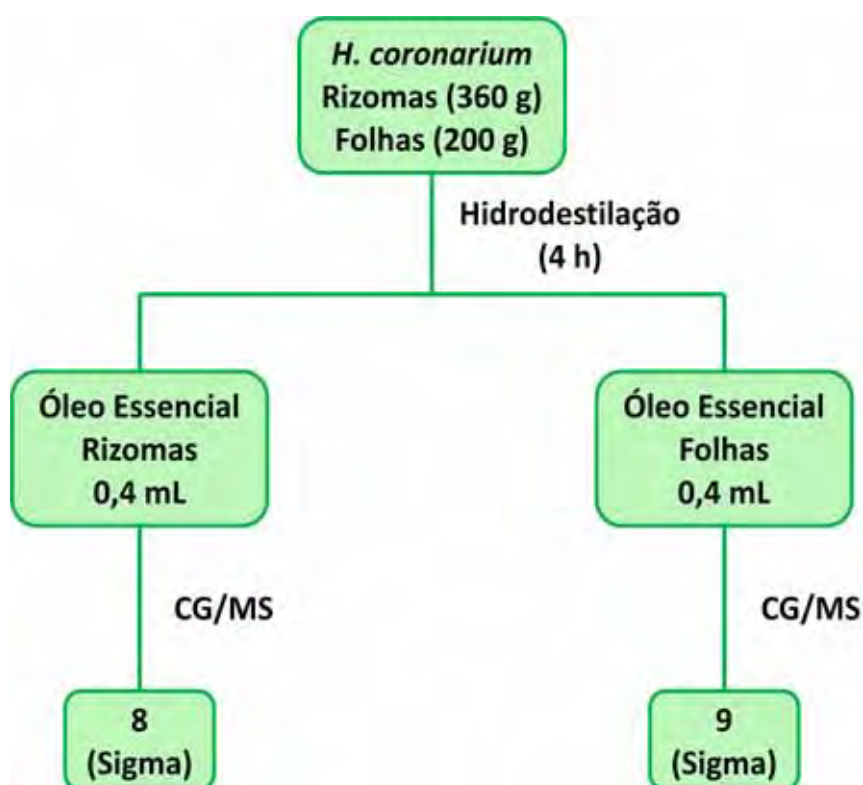
A obtenção dos óleos essenciais foi realizada pelo laboratório da Prof^a. Dr^a. Raquel Regina Duarte Moreira (FCFar/UNESP). Folhas e rizomas foram submetidos à secagem ao ar livre à temperatura ambiente e, em seguida, processados de forma independente; folha grosseiramente dividida, rizoma cortado e esmagado. Os óleos essenciais foram obtidos através de um processo de hidrodestilação por 4 h utilizando um aparelho de Clevenger modificado (WASICKY, 1963). Os óleos foram armazenados ao abrigo da luz a 4 °C, até ser utilizado.

Os compostos majoritários da planta *H. coronarium* foram identificados em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Cavaleiro da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sendo: óxido de cariofileno - óleo essencial das folhas e 1,8-cineol/eucaliptol - óleo essencial dos rizomas, os quais foram adquiridos

posteriormente da Sigma. Os compostos majoritários isolados da planta *H. coronarium* supracitados, foram renomeados e estarão citados no decorrer do trabalho da seguinte maneira: **8** (1,8 cineol/eucaliptol) e **9** (óxido de cariofileno).

No Fluxograma a seguir está esquematizado como foram obtidos os óleos essenciais e seus compostos majoritários.

Fluxograma 1 - Obtenção dos óleos essenciais e seus compostos majoritários de *Hedychium coronarium*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 *Melampodium divaricatum*

O óleo essencial obtido das partes aéreas de *M. divaricatum* foi cedido pela Prof^a. Dr^a. Raquel Regina Duarte Moreira do Laboratório de Farmacognosia do Departamento PANT - FCFAr/UNESP.

3.2.1 Material Vegetal

As partes aéreas (mistura de folhas, flores e escapos) de *M. divaricatum* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara - SP, entre as coordenadas 21° 48' 51,4" S e 48° 12' 5,1" W, com altitude de 661 metros, nos diferentes períodos do ano (primavera, verão, outono e inverno) de 2011 e de 2012. A exsicata da planta está depositada no Herbário do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, sob o número de registro HRCB 35294.

3.2.2 Obtenção do óleo essencial

A obtenção do óleo essencial foi realizada pelo laboratório da Prof^a. Dr^a. Raquel Regina Duarte Moreira (FCFAR/UNESP). Para a obtenção do óleo essencial foram utilizadas as partes aéreas, secas em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40 °C. O óleo essencial obtido foi adequadamente armazenado sob baixas temperaturas (4 a 8 °C) até o momento do uso. Para a extração do óleo essencial foi utilizado o processo de hidrodestilação por 4 h em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY, 1963).

O composto majoritário identificado nas partes aéreas da planta *M. divaricatum* foi o *E*-cariofileno, porém, devido a dificuldades na obtenção da substância e falta do produto no mercado por tratar-se de um produto importado, não foi possível sua aquisição, impedindo a realização dos ensaios com este composto; assim, somente foi avaliado o óleo essencial bruto de *M. divaricatum*. O composto majoritário isolado da planta *M. divaricatum* apresentado acima, foi renomeado e será citado no decorrer do trabalho da seguinte maneira: **10** (*E*-cariofileno). No Fluxograma 2, encontram-se as etapas para obtenção do óleo essencial e seu composto majoritário.

Fluxograma 2 - Obtenção do óleo essencial e seu composto majoritário de *Melampodium divaricatum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 *Polygonum ferrugineum*

Os extratos e as substâncias isoladas de *P. ferrugineum* foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Silvia Noelí López - Laboratorio Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario - UNR, Suipacha 531, 2000 - Rosario, Argentina.

3.3.1 Material Vegetal

As partes aéreas de *Polygonum ferrugineum* Wedd. (Polygonaceae) foram coletadas em janeiro de 2011 em Puerto Gaboto, província de Santa Fé, República

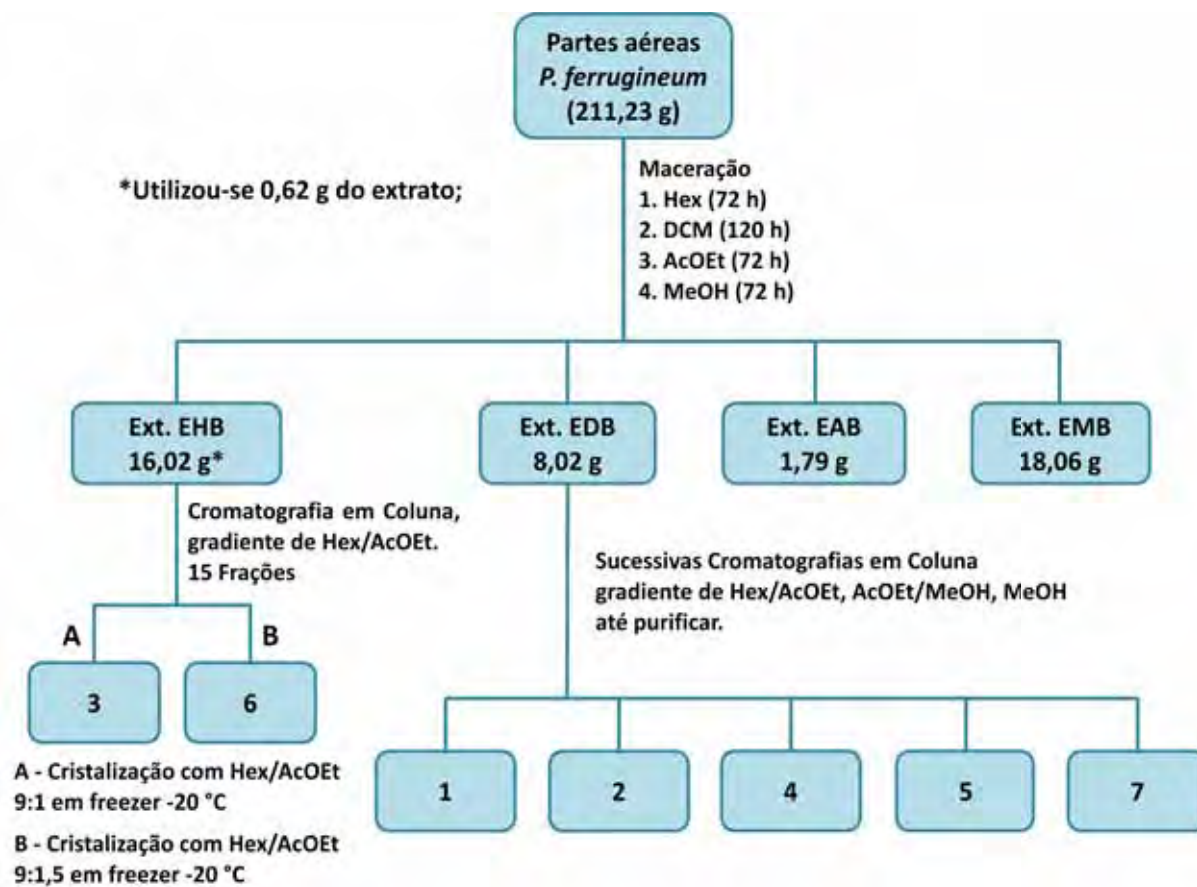
Argentina. A identificação foi feita pela Dr^a. Susana Gattuso (Área Biología Vegetal, FCByF – UNR) e uma exsicata [Gattuso, S (899) UNR 2028] foi depositada no Herbário da UNR.

3.3.2 Obtenção dos Extratos

Conforme as informações recebidas do Laboratorio Farmacognosia da Prof^a. Dr^a. Silvia Noelí López da Argentina, as folhas foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho. Posteriormente, 211,23 g de folhas moídas foram maceradas com solventes de polaridade em ordem crescente. Primeiramente utilizou-se Hexano (Hex) - 72 h, depois diclorometano (DCM) - 120 h, acetato de etila (AcOEt) - 72 h e finalmente metanol (MeOH) - 72 h (Fluxograma 3). Toda vez que foi trocado o solvente extrator, aplicou-se filtração a vácuo e o solvente foi evaporado do material vegetal em capela de exaustão. Os extratos foram concentrados por evaporação a pressão reduzida em evaporador rotatório. A nomenclatura dos extratos no decorrer do trabalho será: extrato hexânico bruto (EHB), extrato diclorometânico bruto (EDB), extrato acetato de etila bruto (EAB) e extrato metanólico bruto (EMB).

3.3.3 Fracionamento dos extratos e purificação dos compostos avaliados

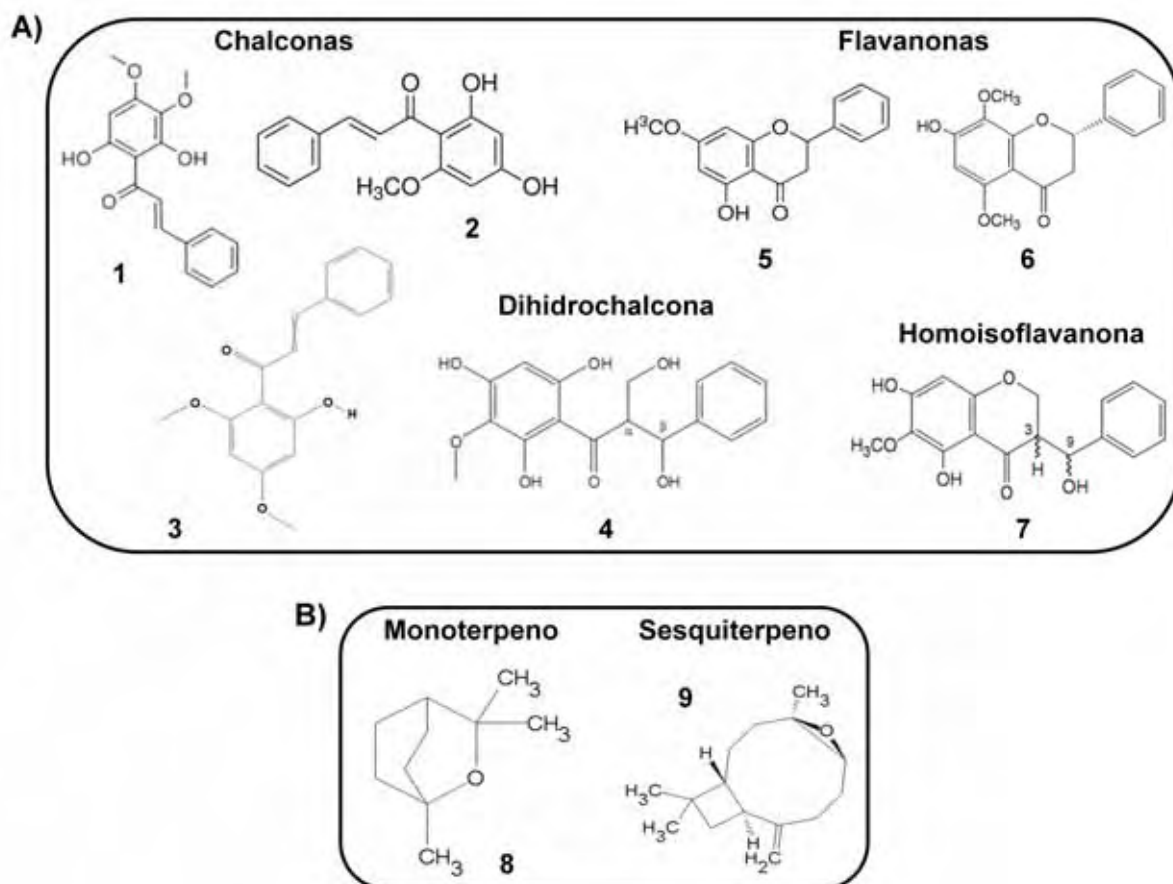
A partir do extrato EDB, foram purificados os seguintes compostos: 6# (5,8-dimetoxi-7-hidroxiflavanona), B1 (2',4',6'-trihidroxi-3'-metoxi- α -hidroximetil- β -hidroxidihidrochalcona), B2 (5,7-dihidroxi-6-metoxi-3-(9-hidroxi-fenilmetil)-cromen-4-ona), CHI (2',6'-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-chalcona) e CHII (2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona). Já a purificação a partir do extrato EHB, originou dois compostos: 1°C FR4 (5-hidroxi-7-metoxiflavanona) e fração 5 (4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona), apresentados no Fluxograma 3 (compostos citados em LÓPEZ et al., 2006). As substâncias isoladas da plantas *P. ferrugineum* apresentadas acima, foram renomeadas e citadas no decorrer do trabalho da seguinte maneira: **1** (CHI); **2** (CHII); **3** (fração 5); **4** (B1); **5** (B2); **6** (1°C FR4) e **7** (6#).

Fluxograma 3 - Obtenção dos extratos e substâncias de *Polygonum ferrugineum*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As estruturas das substâncias isoladas de *H. coronarium* e *P. ferrugineum* estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7 - Estruturas das substâncias isoladas. **A)** *Polygonum ferrugineum*; **B)** *Hedychium coronarium*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 *Trypanosoma brucei*

3.4.1 Obtenção das formas

As formas procíclicas de *T. brucei* cepa 427 (CROOS; MANNING, 1973) e cepa 29-13 (WIRTZ; CLAYTON, 1995) (Quadro 2) foram utilizadas para os testes tripanocidas por se tratarem de formas não infectantes para os humanos, serem de fácil manutenção em cultura e os resultados obtidos podem orientar experimentos posteriores em formas infectantes.

Quadro 2 - Características das cepas de *Trypanosoma brucei*.

<i>Trypanosoma brucei</i> 427	<i>Trypanosoma brucei</i> 29-13
Cepa virulenta, isolada em 1960 de uma ovelha;	Cepa geneticamente modificada a partir da cepa selvagem <i>T. brucei</i> 427;
Não completa o ciclo biológico no inseto vetor;	Obtida pela clonagem de dois plasmídeos que contêm os promotores:
A forma procíclica é encontrada somente no intestino médio da mosca;	1) T7 RNA polimerase;
Não é transmitida pela mosca tsé-tsé aos humanos;	2) Repressor da Tetraciclina;
Utilizadas para estudos de bioquímica, biologia molecular e celular do parasito;	estes estão localizados no locus de α - β tubulina do DNA da cepa 427.
Variação antigênica, monomórfica, geneticamente manipulável, fácil cultivo e manutenção da cultura, não infecciosa em humanos.	Utilizadas em técnicas de RNAi (RNA de interferência) para avaliação da expressão de genes.
	Resistente a Higromicina e Geneticina.

Fontes: Wirtz; Clayton, 1995; Peacock et al., 2008.

3.4.2 Cultivo dos parasitos

Os parasitos foram cultivados em meio SDM-79 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco) (BRUN; SCHONENBERGER, 1979), penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma), e para a cepa 29-13 além desses antibióticos foram adicionados também geneticina (G418 - Sigma) e higromicina (Sigma), ambas foram cultivadas a 28 °C com repiques diários para a manutenção da cultura. Para a realização do ensaio citotóxico do MTT as culturas foram mantidas até a obtenção da fase exponencial de crescimento (1×10^6 parasitos/mL). Os parasitos foram mantidos em freezer -80 °C em solução glicerinada.

3.5 Ensaio citotóxico do MTT

Na técnica de MTT ocorre a redução do sal tetrazólio (MTT) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (Sigma) em um produto colorido, *formazan*, pela

ação de algumas enzimas presentes nas mitocôndrias, como por exemplo, a succinato desidrogenase (DUTTA et al., 2005); o produto é avaliado por espectrofotometria a 595 nm que demonstra proporcionalmente a atividade metabólica das células observadas ou a viabilidade dessas em cultura (SIEUWERTS et al., 1995). É uma técnica interessante para análise de diversas substâncias simultaneamente (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GOMEZ-BARRIO, 2000; COTINGUIBA et al., 2009). O ensaio foi realizado de acordo com Mosmann (1983), e modificado por Cotinguiba e colaboradores (2009).

3.5.1 Contagem de parasitos

Após observação de ausência de contaminação na cultura de *T. brucei*, adicionou-se 0,5 µL de formol (Synth), 19 µL de meio de cultura SDM-79 e 1 µL de parasito (diluição 1:20) em um tubo de 1,5 mL, para contagem em câmara de Neubauer. A suspensão de parasitos foi aplicada entre lâmina e lamínula. Em seguida, observou-se ao microscópio para a contagem dos parasitos. O cálculo da concentração de parasitos foi realizado segundo a equação abaixo:

$$\text{n}^{\circ} \text{ total de parasitos/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ parasitos contados} / 4 \times 20 \times 10^4$$

Em que:

4 = n° de quadrantes da câmara de Neubauer.

20 = diluição (1:20).

10⁴ = fator da câmara de Neubauer.

A suspensão dos parasitos após a contagem foi ajustada de 1×10^4 para 1×10^6 parasitos/mL.

3.5.2 Diluição e preparo das amostras

As amostras analisadas foram o óleo essencial de *M. divaricatum*, os óleos essenciais do rizoma e da folha de *H. coronarium*, e seus compostos majoritários, 8 - rizoma e 9 - folha; foram também analisados os extratos EHB, EDB, EAB e EMB de *P. ferrugineum*, e as suas substâncias isoladas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Como controle positivo utilizou-se a pentamidina que é um dos fármacos usados no tratamento da doença do sono (BRAY et al., 2003).

As amostras foram diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido - Synth), em uma concentração final de 20 mg/mL; para a dissolução completa utilizou-se o auxílio de um vórtex.

A partir da solução estoque foram realizadas as diluições a serem testadas em placa de poliestireno estéril com 96 poços, sendo realizado em câmara de fluxo laminar.

Para as substâncias isoladas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, as análises foram iniciadas com uma diluição de 5 mg/mL, colocada no poço H: 10 µL (20 mg/mL estoque) + 30 µL DMSO. Assim as concentrações finais dessas substâncias nos respectivos poços são A: 1; B: 2,5; C: 5; D: 10; E: 25; F: 50 e G: 100 µg/mL.

Para os óleos essenciais e os extratos iniciou-se diretamente com a concentração de 20 mg/mL em DMSO (solução estoque), sendo as concentrações finais das amostras nos respectivos poços A: 25; B: 50; C: 100; D: 200; E: 300; F: 400 e G: 500 µg/mL.

3.5.3 Montagem e finalização do teste

Em cada uma das concentrações foram adicionadas 3 µL da solução nos poços em uma nova placa (fileiras A a G, colunas 1 a 6). Em seguida, adicionou-se 97 µL de meio de cultura contendo parasitos nas colunas 1, 2 e 3 e apenas meio de cultura nas colunas 4, 5 e 6 (controle). A fileira H foi utilizada como controle: colunas

1 a 3, contendo somente parasitos, sem substância; e 4 a 6, somente meio de cultura, sem substância, os testes foram realizados em triplicata.

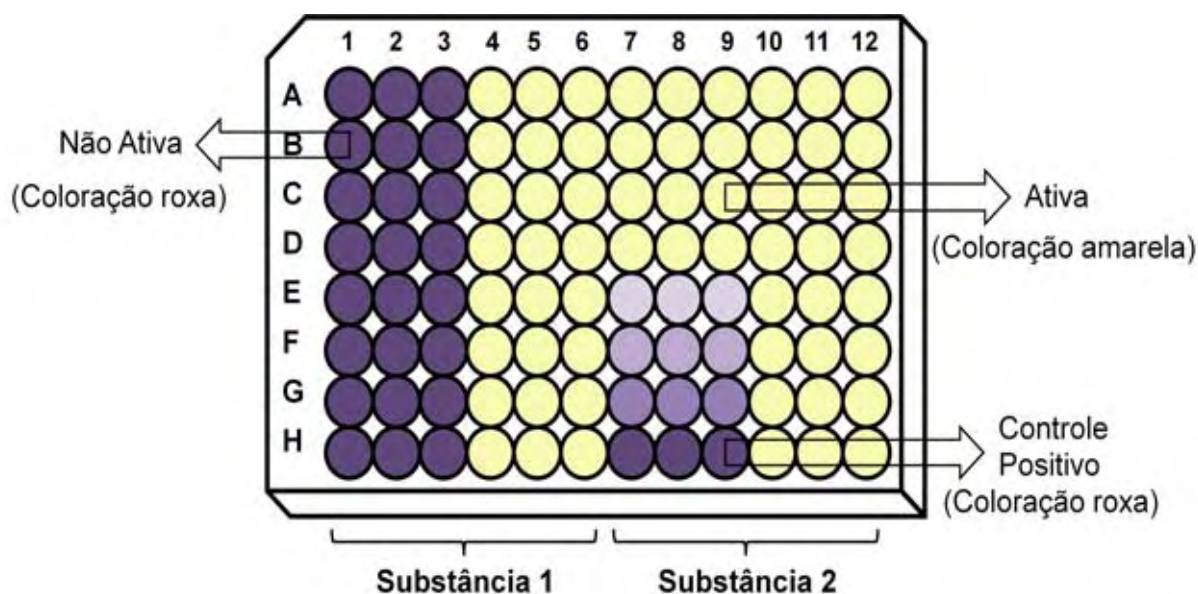
A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 24 h. Adicionou-se 10 µL de solução MTT + Metossulfato de fenazina - PMS por orifício (2,5 mg/mL de MTT - Sigma e 0,22 mg/mL de PMS - Sigma), repetindo-se a incubação por mais 1 h 15 min ao abrigo da luz, seguido da adição de 100 µL de solução SDS 10 % / HCl 0,01 M, para dissolver os cristais de *formazan*, incubou-se por mais 30 min em TA.

- Solução MTT/PMS

2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS

A leitura da Densidade Óptica (DO) foi realizada em leitor de Elisa (Bio Rad) a 595 nm, a Figura 8 demonstra como se interpreta que uma substância foi ativa utilizando a técnica de MTT.

Figura 8 - Demonstração do ensaio colorimétrico de MTT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Determinação do índice de citotoxicidade 50 % (IC₅₀)

Com as absorvâncias obtidas foram elaborados gráficos para determinação do IC₅₀. Os índices de citotoxicidade (IC₅₀), que significam 50 % da concentração inibitória das substâncias que reduzem em 50 % a viabilidade celular dos parasitos foram quantificados graficamente a partir de uma curva dose-resposta (concentração versus viabilidade celular), obtidos por análise de regressão linear com limite de confiança próximo a 95 % e o IC₅₀ definido através de equação de uma reta (software Origin 7.0 - WASS, 2002).

3.7 Teste de citotoxicidade em células HepG2 (Hepatoma humano)

As células HepG2 são metabolicamente competentes, e amplamente utilizadas para simular *in vitro* a função hepática do organismo humano, mostrando atividade de enzimas de fase I e fase II, incluindo enzimas do citocromo P450 (SASSA et al., 1987; NATARAJAN; DARROUDI, 1991; DAUER et al., 2003; HEWITT; HEWITT, 2004; CHIARI et al., 2012). Essa linhagem celular é adequada para avaliar os efeitos de genotoxicidade e de antigenotoxicidade de diferentes compostos, tais como os taninos (DAUER et al., 2003; CHIARI et al., 2012) e na avaliação do metabolismo de proteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (HAVEKES et al., 1983; CHIARI et al., 2012).

Em parceria com a equipe da Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Isaac do Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Cosmetologia - FCFAr/UNESP, foram realizados também testes de citotoxicidade com as células HepG2 (linhagem celular de hepatoma humano) para cálculo do *Safety Index*, ou seja, o grau de segurança para a utilização das substâncias em células de mamíferos, que é calculado pela equação à seguir:

$$\text{Safety Index} = \text{IC}_{50} \text{ HepG2} / \text{IC}_{50} \text{ T. brucei}$$

3.7.1 Cultivo das células e preparo do teste

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando células de hepatoma humano (HepG2). As células foram cultivadas em meio *Minimum Essential Media* (MEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e antibióticos [penicilina (Sigma) 100 U/mL, estreptomicina (Sigma) 0,1 mg/mL]. As culturas foram mantidas a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. As células em confluência de 80 a 90 % foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm durante 3 minutos, e depois plaqueadas em placas de 96 poços (TPP). Para neutralizar a tripsina (Sigma) foi utilizado meio MEM com soro fetal bovino.

Para os ensaios de citotoxicidade foram usadas 1×10^6 células/mL. As placas foram incubadas durante 24 h para a adesão das células completa na placas de 96 poços.

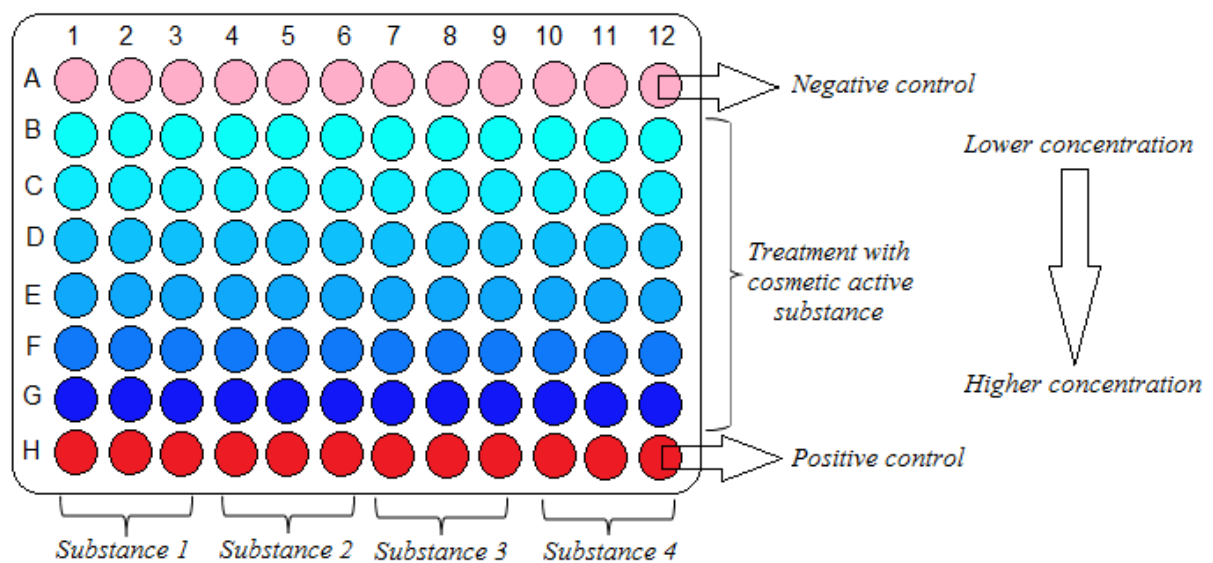
Em cada experimento foi testado um controle negativo (MEM com a respectiva concentração de DMSO (sigma) em cada tratamento) e um controle positivo (DMSO em MEM a 10 %). Todos os compostos foram testados em diferentes concentrações (0; 5; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) e solubilizados em meio MEM depois de prévia solubilização em DMSO, como mostrado na Figura 9. Após 24 h, o tratamento foi removido e as placas foram lavadas suavemente com tampão fosfato salino (PBS - Sigma) (BRUGGINSSER et al., 2002), e 100 µL de MTT (Sigma) (1 mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 ± 2 °C durante 4 h, protegido da luz, a fim de observar a presença de cristais de formazan (MOSMANN, 1983). Este procedimento pode ser observado no esquema da Figura 10. Para a solubilização dos cristais de formazan, utilizou 100 µL de álcool isopropílico (Synth) foram adicionados a cada poço e a absorvância foi lida a 595 nm. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em pelo menos três ensaios independentes, e, em cada ensaio, o tratamento foi realizado em triplicata. A porcentagem de células mortas e vivas foi calculada em relação ao controle negativo e representa a citotoxicidade de cada tratamento, tal como proposto por Zhang et al. (2004), como mostra a seguir:

$$\% \text{ da viabilidade celular} = \left(\frac{A \text{ do controle negativo} - A \text{ do tratamento}}{A \text{ do controle negativo}} \right) \times 100$$

Em que:

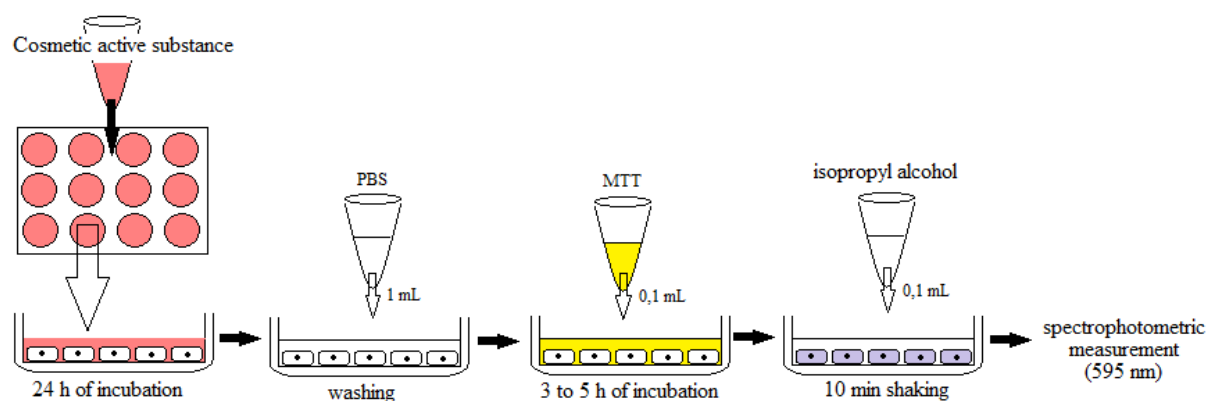
A = Absorvância (leitura realizada em 595 nm)

Figura 9 - Esquema de tratamento das células HepG2 para os ensaios citotóxicos de MTT em placa de 96 poços.



Fonte: Chiari et al. (2012, p. 10).

Figura 10 - Esquema do ensaio de MTT.



Fonte: Chiari et al. (2012, p. 10).

3.8 Teste de avaliação da interferência na produção de mRNA do parasito

3.8.1 Curva de crescimento da cepa 427 de *Trypanosoma brucei*

A curva de crescimento de *Trypanosoma brucei* - cepa 427 utilizando como controle a pentamidina foi elaborada para determinar em qual tempo de tratamento dos parasitos com os compostos selecionados após os resultados obtidos de IC₅₀ (através de *screening*) se alcançava a quantidade de células necessária (5 a 10x10⁶ parasitos/mL), para sua utilização na técnica de RT-PCR. A curva foi elaborada dentro de um período de 24 horas de tratamento.

3.8.2 Extração de RNA total

A obtenção de RNA total do parasito para a utilização na reação de RT-PCR foi realizada por meio da técnica de extração de RNA com TRIZOL[®] (Invitrogen), de acordo com as especificações técnicas do fabricante; antes do início dessa técnica foi realizado uma lavagem na cultura dos parasitos com tampão fosfato salino (PBS) [1x], e em seguida realizando a extração com os reagentes fenol clorofórmio (Synth), isopropanol (Synth), etanol absoluto 99,8 % (Merck), água dietilpirocarbonato - inibidor de RNAase (DEPC) (Fermentas) e etanol a 70 % preparado com água DEPC, após a obtenção do precipitado de RNA total, o mesmo foi diluído em 20 µL de água DEPC e realizado uma quantificação no aparelho Epoch (BioTek), o qual ajustou-se para uma concentração de 5 µg de RNA total em 11 µL de água DEPC.

3.8.3 Reação de RT-PCR (utilizando o kit 3' RACE - *System for Rapid Amplification of cDNA Ends*)

A reação de transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR, do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*), foi utilizada para detectar o RNA mensageiro presente nas células. Durante o experimento foi obtido um DNA complementar (cDNA) ao RNA, com a enzima transcriptase reversa utilizando-se como molde o RNA total. Para essa finalidade, o kit 3' RACE - *System for Rapid*

Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) foi empregado de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de RT-PCR foi realizada com o protocolo descrito em Silva (2009) e Silva et al. (2011). Para a reação foram necessários 5 µg de RNA total extraído a partir de parasitos tratados e não tratados com as substâncias.

A seguir, no Quadro 3, apresentam-se as sequências de todos os iniciadores utilizados nos experimentos:

Quadro 3 - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR.

<i>Adapter Primer</i>	5' - GGC CAC GCG TCG ACT ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'
<i>Random Hexamer Primer</i>	5' - NNNNNN - 3'
TS1	5' - CAA TGT GGA TGC AGA TAG CC - 3'
TS2	5' - GTA AGT GGT GGT GGC GTA AG - 3'
TS3	5' - GAG AGT TGC TCG TGG TAG GC - 3'
TS4	5' - GTA CTA TAT TGA TGC GTG AGG C - 3'
7SL1	5' - TTG CTC TGT AAC CTT C - 3'
7SL2	5' - TCT ACA GTG GCG ACC TCA AC - 3'

Para a reação, foram utilizados 200 ng do reagente de *Random Hexamer Primer* (Fermentas) com intuito de amplificar os RNAs não processados e *Adapter primer* para os processados. O protocolo original foi alterado em relação aos tempos de incubação, utilizando 5 min a 25 °C, 50 min a 42 °C e 15 min a 70 °C, para síntese do cDNA.

Para avaliação do produto (RNA maduro) da reação de *trans-splicing*, foram empregados nas reações de PCR os iniciadores TS1 e TS2 para formas não processadas, e TS3 e TS4 para formas processadas de α -tubulina, utilizando cDNA obtido com *Random Hexamer Primer* e *Adapter primer*, respectivamente, de acordo com as condições do Quadro a seguir:

Quadro 4 - Condições empregadas nas reações de PCR para os iniciadores TS1 e TS2 (pré α -tub) e TS3 e TS4 (α -tub).

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	2 min e 30 seg	1X
94	45 seg	21X
53	45 seg	
72	1 min	
72	5 min	1X
4	Tempo indeterminado	1X

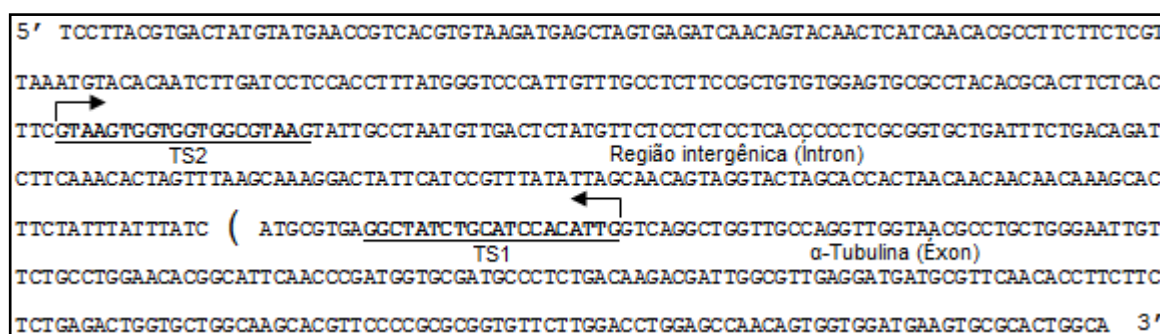
Como controle da reação foi amplificado o transcrito de 7 SL RNA, utilizando os iniciadores 7SL1 e 7SL2, de acordo com Ambrósio et al. (2009), adotando as condições do Quadro a seguir:

Quadro 5 - Condições empregadas nas reações de PCR para os iniciadores 7SL1 e 7SL2.

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
94	2 min e 30 seg	1X
94	45 seg	21X
44	45 seg	
72	1 min	
72	5 min	1X
4	Tempo indeterminado	1X

Foi utilizado a sequência do gene Tb927.1.2400, obtido do *GenBank*, para demonstrar as regiões em que os *primers* flanqueiam e se anelam ao gene α -tubulina de *T. brucei*. (Figuras 11, 12 e 14)

Figura 11 - Anelamento dos *primers* TS1 e TS2 para a forma não-processada de α -tubulina (banda de 218 pb - pré α -tub).



Fonte: Elaborado pelo autor.

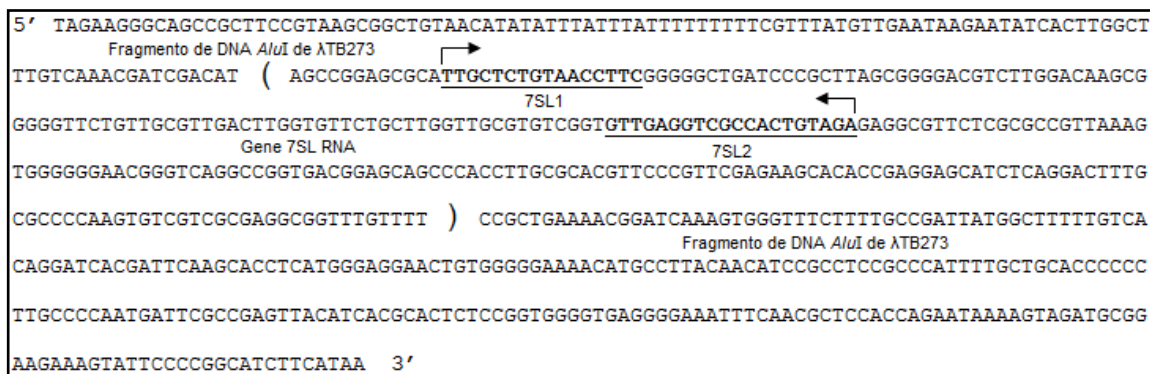
Figura 12 - Anelamento dos *primers* TS3 e TS4 para a forma processada de α -tubulina (banda de 871 - pb - α tub).



Fonte: Elaborado pelo autor.

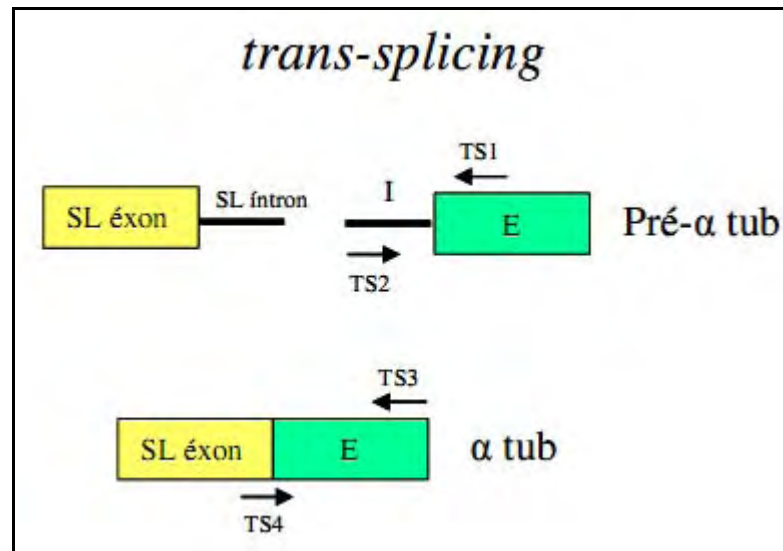
O transcrito de 7 SL RNA foi utilizado, sequência obtida do manuscrito de Michaelis e colaboradores (1992), demonstrando as regiões em que os *primers* utilizados como controle 7SL1 e 7SL2 flanqueiam e se anelam. (Figura 13)

Figura 13 - Anelamento dos primers 7SL1 e 7SL2 utilizados como controle (banda de 123 pb).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional da reação de *trans-splicing*. TS1 e TS2 anelam-se no éxon e íntron, ainda não processados do transcrito de α -tubulina (Pré- α -tub). Para avaliação do processamento da α -tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon, quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). E, éxon; I, íntron; SL, *Spliced leader*.



Fonte: Silva, 2009.

Resultados e Discussão

4.1 Ensaios citotóxicos em *Trypanosoma brucei* e HepG2

Os resultados obtidos para os ensaios citotóxicos de MTT com o objetivo de avaliar a atividade tripanocida e seu *Safety Index* (índice de segurança – em testes com células de mamíferos) demonstrou graus variados de citotoxicidade, desde compostos muito ativos a outros que praticamente não exerceram nenhum efeito contra o parasito.

4.1.1 *Melampodium divaricatum*

Na Tabela 1 são apresentados os valores do Índice de Citotoxicidade 50 % (IC_{50}) do óleo essencial de *M. divaricatum* frente às cepas 427 e 29-13 de *T. brucei* e o valor em células de mamífero (HepG2); utilizou-se a pentamidina como controle positivo (IC_{50} = 2,19 μ g/mL).

Tabela 1 - Atividade tripanocida e índice de segurança de *Melampodium divaricatum*. ^a IC_{50} (μ g/mL); ^bS.I.: *Safety Index*; ND: Não Determinado; O.E.: Óleo essencial.

Compostos	^a Células HepG2	^a <i>T. brucei</i> Cepa 427	^b S. I. <i>T. brucei</i> Cepa 427	^a <i>T. brucei</i> Cepa 29-13	^b S. I. <i>T. brucei</i> Cepa 29-13
O.E. Partes aéreas	67,90	> 100	< 0,68*	> 100	< 0,68*
10	ND	ND	ND	ND	ND
pentamidina	54,87	2,19	25,05	2,19	25,05

*Esses compostos necessitam de concentrações superiores a 100 μ g/mL para obterem atividade nas cepas de *T. brucei* e, portanto, os valores de *Safety Index* estão < 10, não sendo considerados seguros para a utilização proposta.

Em relação à atividade do óleo essencial das partes aéreas da planta *M. divaricatum*, o valor indicou ausencia de atividade tripanocida para ambas as cepas de *T. brucei* (IC_{50} > 100 μ g/mL); talvez esses valores possam ser diferentes, se o óleo essencial for preparado a partir do rizoma da planta e não de suas partes aéreas, nas quais existe maior concentração de seus constituintes voláteis.

Quanto ao composto 10, principal constituinte do óleo essencial de *M. divaricatum*, não foram realizados os testes conforme mencionado em Materiais e Métodos (item 3.2.2.).

O resultado apresentado para as células HepG2 revelou um valor de *Safety Index* menor do que 1, para as duas cepas de *T. brucei*, demonstrando que esse composto não é indicado para o uso seguro em humanos, tendo em vista que foi inferior a 10 (protocolo padronizado pelo Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da FCFAr/UNESP - PASSERINI, 2008).

4.1.2 *Polygonum ferrugineum*

Os resultados obtidos da atividade tripanocida e em células de mamífero referente à planta *P. ferrugineum* estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade tripanocida e índice de segurança de *Polygonum ferrugineum* e seus compostos isolados. ^aIC₅₀ (µg/mL); ^bS.I.: *Safety Index*; ext.: extrato.

Compostos	^a Células HepG2	^a <i>T. brucei</i> Cepa 427	^b S. I. <i>T. brucei</i> Cepa 427	^a <i>T. brucei</i> Cepa 29-13	^b S. I. <i>T. brucei</i> Cepa 29-13
1	> 500	> 100	*	> 100	*
2	> 500	> 100	*	> 100	*
3	152,79	1,77	86,32	1,36	112,34
4	300	84,80	3,54	95,67	3,13
5	500	> 100	5	> 100	5
6	> 500	> 100	*	> 100	*
7	> 500	> 100	*	> 100	*
ext. EAB	> 500	72,61	> 6,89*	72,37	> 6,90*
ext. EDB	77,29	48,22	1,60	27,43	2,82
ext. EHB	80,49	8,65	9,30	9,21	8,74
ext. EMB	> 500	185,28	> 2,70*	150,74	> 3,31*
pentamidina	54,87	2,19	25,05	2,19	25,05

*Esses compostos necessitam de concentrações superiores a 100 µg/mL para obterem atividade nas cepas de *T. brucei* e, portanto, os valores de *Safety Index* estão < 10, não sendo considerados seguros para a utilização proposta.

O extrato EAB (acetato de etila) apresentou potencial atividade tripanocida para a cepa 427 ($IC_{50} = 72,61 \mu\text{g/mL}$) e 29-13 ($IC_{50} = 72,37 \mu\text{g/mL}$) de *T. brucei*, o mesmo sendo observado para o extrato EMB (metanólico), respectivamente, IC_{50} 185,28 e 150,74 $\mu\text{g/mL}$ para 427 e 29-13 de *T. brucei*, com valores diferentes para cada cepa.

O extrato EDB (diclorometânico) revelou um IC_{50} melhor que os extratos anteriores com valores de 48,22 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 427) e 27,43 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 29-13); mais uma vez, o resultado foi menor na cepa 29-13 quando comparada com a cepa 427.

O extrato EHB (hexânico) foi o que apresentou o melhor valor dentre os resultados obtidos com os extratos, com um valor de IC_{50} de 8,65 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 427) e 9,21 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 29-13). Tratando-se de extratos, em que várias substâncias estão presentes (nesse caso incluindo aquelas isoladas do EHB - 3 e 6), estes resultados são interessantes e promissores, principalmente o extrato EHB.

As substâncias isoladas de *P. ferrugineum*, tais como, 1, 2, 5, 6 e 7 não apresentaram potencial atividade tripanocida para as duas cepas utilizadas; enquanto a substância 4 obteve um resultado de IC_{50} de 84,80 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 427) e 95,67 $\mu\text{g/mL}$ (cepa 29-13), demonstrando atividade para *T. brucei*, em concentração muito alta.

Entretanto, o resultado mais promissor foi o da substância isolada do extrato EHB, a substância 3, que apresentou um IC_{50} de 1,77 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa 427 e 1,36 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa 29-13 de *T. brucei*, enquanto que o IC_{50} da pentamidina foi de 2,19 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas. Esse resultado pode ser explicado devido a substância 3 ser uma chalcona, e a literatura mostra que nessa classe existe uma grande variedade de atividades biológicas, como a antileishmaniose (RIZVI et al., 2010) e a antimalárica (LI et al., 1995; DIMMOCK et al., 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2005; PADHYE et al., 2009), uma vez que em sua estrutura molecular existem ligantes metoxila e hidroxila, sugerindo que sua atividade tripanocida possa estar relacionada ao estresse oxidativo. Assim, esta foi a primeira vez que se descreve a atividade antitripanocida de chalconas.

Vale ressaltar que estudos para avaliar a influência ou não no processamento de mRNA do parasito foram realizados na tentativa de deduzir se as substâncias podem influenciar a formação do RNA mensageiro.

Em relação aos resultados das células HepG2, foram demonstrados graus variados de citotoxicidade e revelaram um *Safety Index*, para a maior parte dos compostos, abaixo de 10, o que demonstra uma margem baixa de segurança. O extrato EHB revelou valores de *Safety Index* próximos a 10, possibilitando ensaios em mamíferos com maior segurança. A substância 3 apresentou valores de *Safety Index* iguais a 86,32 para a cepa 427 e 112,34 para a cepa 29-13, que foram bastante expressivos, sugerindo que essa substância pode ser promissora e com um alto índice de segurança para testes com mamíferos e formas sanguíneas infectantes.

Com esses resultados foi possível evidenciar que a atividade tripanocida dessa planta está relacionada à classe das chalconas.

4.1.3 *Hedychium coronarium*

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do IC₅₀ dos óleos essenciais de *H. coronarium* e seus compostos majoritários frente ao *T. brucei* e as células HepG2.

Os óleos essenciais da planta *H. coronarium*, rizomas e folhas, bem como, o composto 8, o principal constituinte do óleo dos rizomas, revelaram valores de IC₅₀ >100 µg/mL, indicando que esses compostos não apresentam atividade tripanocida para ambas as cepas de *T. brucei* (valor do IC₅₀ da pentamidina, utilizada como controle positivo, foi 2,19 µg/mL).

O composto 9, principal constituinte do óleo essencial das folhas de *H. coronarium*, revelou atividade contra as cepas de *T. brucei* 427 (IC₅₀ = 65,77 µg/mL) e 29-13 (IC₅₀ = 24,53 µg/mL).

Tabela 3 - Atividade tripanocida e índice de segurança de *Hedychium coronarium*. ^aIC₅₀ (µg/mL); ^bSI: *Safety Index*; O.E.: Óleo Essencial.

Compostos	^a Células HepG2	^a <i>T. brucei</i> Cepa 427	^b <i>S. I.</i> <i>T. brucei</i> Cepa 427	^a <i>T. brucei</i> Cepa 29-13	^b <i>S. I.</i> <i>T. brucei</i> Cepa 29-13
O.E. Folhas	69,20	> 100	< 0,69*	> 100	< 0,69*
O.E. Rizoma	67,54	> 100	< 0,68*	> 100	< 0,68*
8	> 500	> 100	*	> 100	*
9	287,83	65,77	4,38	24,53	11,73
pentamidina	54,87	2,19	25,05	2,19	25,05

*Esses compostos necessitam de concentrações superiores a 100 µg/mL para obterem atividade nas cepas de *T. brucei* e, portanto, os valores de *Safety Index* estão < 10, não sendo considerados seguros para a utilização proposta.

No desenvolvimento do trabalho, houve interesse em verificar um possível sinergismo entre o composto 9 e pentamidina (1:1, V/V). Os resultados mostraram uma atividade semelhante e mais intensa para ambas as cepas (IC₅₀ = <1,0 µg/mL). O óxido de cariofileno, denominado de composto 9 nesse trabalho, foi previamente reconhecido como um dos principais constituintes para a atividade do extrato hexânico de *Serjania yucatanensis* contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (POLANCO-HERNÁNDEZ et al., 2012). Outros estudos corroboram com os resultados dos efeitos citotóxicos, uma vez que também demonstra o uso do óxido de cariofileno em vários modelos celulares, causando a inibição da cadeia de transporte de elétron mitocondrial (MONZOTE et al., 2009) ou a utilização na indução de apoptose (PARK et al., 2011).

Com relação aos resultados de citotoxicidade obtidos para as células HepG2, foram revelados valores de *Safety Index* abaixo de 10 para quase todos os compostos, menos para o composto 9 - cepa 29-13, que apresentou um valor de 11,73.

Os valores de IC₅₀ diferentes encontrados nas cepas 427 e 29-13 para os extratos EMB e EAB de *P. ferrugineum*, bem como para o composto 9, principal constituinte do óleo essencial das folhas de *H. coronarium*, chamaram a atenção, uma vez que não eram esperadas diferenças nos valores apresentados para essas cepas de *T. brucei*.

A cepa 29-13 possui algumas modificações genéticas (apresentadas no item 3.4.1 – Quadro 2), tais como a introdução de plasmídeos contendo o gene T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina (WIRTZ; CLAYTON, 1995), requerendo constante pressão seletiva dos antibióticos higromicina e geneticina (G418) na manutenção em meio de cultura. É provável que a adição desses antibióticos poderia potencializar a atividade tripanocida dos extratos e composto testados, como observado.

Os óleos essenciais de *M. divaricatum*, *H. coronarium* (folha e rizoma) e um de seus compostos majoritários (8 do rizoma), e as substâncias isoladas de *P. ferrugineum*, 1, 2, 5, 6 e 7, não apresentaram atividade tripanocida para o parasito testado. Entretanto, estudos podem ser realizados com os óleos essenciais no intuito de averiguar uma possível atividade repelente ou atraente contra o vetor da doença do sono, a mosca tsé-tsé.

4.2 Avaliação das alterações na produção de mRNA do gene α -tubulina da cepa 427 de *Trypanosoma brucei*

4.2.1 Resultados da curva de crescimento da cepa 427 de *Trypanosoma brucei*

A curva de crescimento de *Trypanosoma brucei* - cepa 427, utilizando como controle a pentamidina, está apresentada na Figura 15:

Desta forma, ficou padronizado de 18-20 h de tratamento, pois neste período foi possível obter a quantidade necessária de células para os ensaios (5 a 10×10^6 parasitos/mL).

Figura 15 - Curva de crescimento de *Trypanosoma brucei* - cepa 427.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim os dois compostos selecionados pelos resultados de IC_{50} (através de *screening*), foram o extrato EHB e a substância 3. As culturas de *T. brucei* (cepa 427) foram incubadas com os compostos durante 18-20 h para serem posteriormente utilizadas na técnica de RT-PCR.

4.2.2 Resultados das reações de RT-PCR

Os estudos de prospecção das substâncias com atividade tripanocida para avaliar possíveis interferências no processamento de mRNA do parasito, utilizando como modelo o gene α -tubulina, visam dar continuidade à linha de pesquisa de VIANNA; AMBRÓSIO; CICARELLI, 2001; AMBRÓSIO et al., 2004; BARBOSA et al., 2007; AMBRÓSIO et al., 2007; BOSETTO et al., 2008; AMBRÓSIO et al., 2009; SILVA, 2009; SILVA et al., 2011 e ARNOSTI, 2011, e foram realizados neste trabalho por reações de RT-PCR semi-quantitativa com dois compostos: extrato EHB e substância 3 (selecionados após a obtenção dos resultados de IC_{50}).

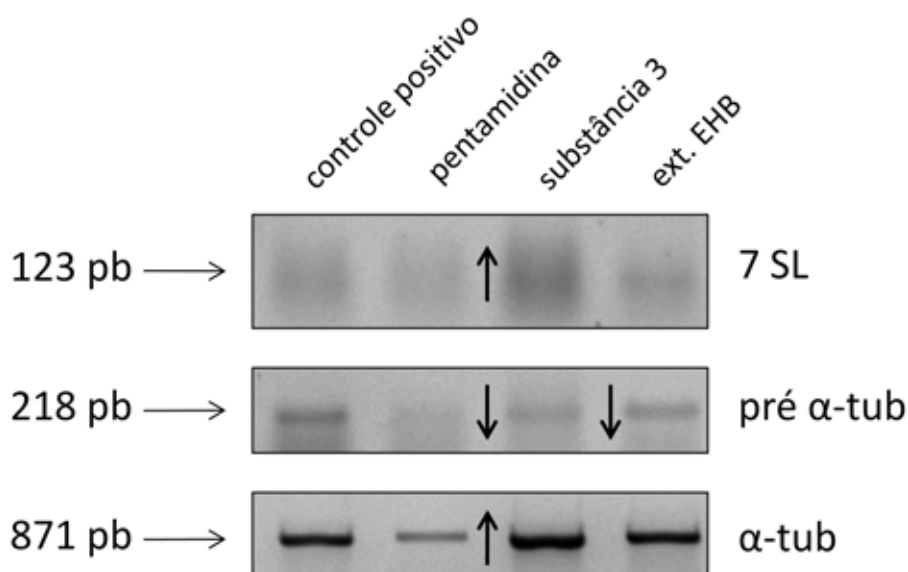
O protocolo utilizado para a RT-PCR foi o mesmo descrito em Silva (2009) e Silva et al. (2011). Após amplificação por PCR, os fragmentos de tubulina devem

apresentar 871 pb para a forma processada (α -tub), 218 pb para a forma não-processada (pré- α tub) e 123 pb para o transcrito de 7 SL RNA.

A reação foi padronizada conforme descrito em Material e Métodos (item 3.8.3); o peso molecular utilizado para o experimento foi 1 kb *plus* (invitrogen); os compostos escolhidos para tratamento dos parasitas foram extrato EHB e substância 3; reações controle: parasitos sem tratamento; parasitos com pentamidina e controle negativo (sem DNA).

Os resultados das reações de RT-PCR obtidos para o extrato EHB e a substância 3 estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. 7 SL: *primers* 7SL1/7SL2; α -tub: *primers* TS1/TS2; Pré α -tub: *primers* TS3/TS4; $\uparrow$: acúmulo; $\downarrow$: diminuição.



No controle positivo os parasitos não foram tratados com substâncias, portanto, a presença das bandas para a forma processada e não processada de α -tubulina eram esperadas, conforme apresenta os resultados.

A pentamidina apresentou uma intensidade menor das bandas (7 SL, pré α -tub e α -tub) e uma vez que se liga ao DNA do cinetoplasto do parasito, levando a

desintegração e colapso da membrana mitocondrial (BRAY et al., 2003), então, esse resultado também se justifica.

Quando os parasitos foram tratados com o extrato EHB, os resultados demonstram uma diminuição discreta da forma não processada de α -tubulina (pré α -tub), mas aparentemente sem alteração para a forma processada de α -tubulina (α -tub). Esse resultado pode sugerir alguma interferência do extrato EHB com o processamento do pré mRNA.

Por outro lado, ao tratar os parasitos com a substância 3, observa-se como uma queda acentuada no nível de transcrito não processado de α -tubulina (pré α -tub) e um acúmulo tanto do transcrito processado de α -tubulina (α -tub), como para o 7 SL. Esses resultados demonstram que a substância 3 interfere também na reação de *trans-splicing*, podendo ser esse o principal fator para a toxicidade da substância.

Entretanto, estes dados ainda são preliminares e mais experimentos devem ser realizados para confirmação desses achados.

Em suma, face aos resultados observados, foi possível visualizar que os dois compostos interferem de algum modo no processamento do mRNA do parasito, e algumas hipóteses podem ser levantadas: de que a substância 3 estaria interferindo no processamento pelo fato de acumular os transcritos processados e do 7 SL, que ao final comprometeria a tradução das proteínas do parasito; em relação ao extrato EHB que apresentou uma diminuição do transcrito pré α -tub, poderia estar comprometendo o suprimento de pré mRNA para a formação de mRNA maduro.

Conclusões

- ✓ Os óleos essenciais das plantas *Melampodium divaricatum* e *Hedychium coronarium* (folhas e rizomas), bem como, as substâncias 1 (2',6'-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-chalcona), 2 (2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona), 5 (5,7-dihidroxi-6-metoxi-3-(9-hidroxi-fenilmetil)-cromen-4-ona), 6 (5-hidroxi-7-metoxiflavanona), 7 (5,8-dimetoxi-7-hidroxiflavanona) e 8 (1,8 cineol/eucaliptol), não apresentaram atividade tripanocida contra as formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *Trypanosoma brucei*;
- ✓ Os extratos EDB, EAB e EMB, e a substância 4 (2',4',6'-trihidroxi-3'-metoxi- α -hidroximetil- β -hidroxi-dihidrochalcona), apresentaram atividade para ambas as cepas de *T. brucei*, porém, em concentrações elevadas, quando comparadas a pentamidina;
- ✓ A substância 9 (óxido de cariofileno) demonstrou atividade tripanocida elevada, mas no instante em que foi realizado o experimento para avaliar o sinergismo entre a substância 9 e a pentamidina (1:1, V/V), obteve-se valores promissores e bem abaixo do fármaco controle (pentamidina);
- ✓ O extrato EHB foi o que apresentou a melhor atividade tripanocida dentre os resultados obtidos dos extratos;
- ✓ O experimento de MTT demonstrou também que a substância 3 (4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona), isolada do extrato EHB de *P. ferrugineum*, apresenta um alto potencial de atividade tripanocida, com valores obtidos para as cepas de *T. brucei* abaixo da pentamidina (fármaco controle), e revelou um elevado índice de segurança para testes em mamíferos;
- ✓ Experimentos de RT-PCR (*reverse transcription*) demonstraram que o extrato EHB e a substância 3 apresentam interferência na reação de *trans-splicing* do *T. brucei*, uma vez que essas poderiam estar influenciando na formação de mRNA maduro, bem como na tradução de proteínas do parasito.

Referências

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan./mar. 2007.

AMBRÓSIO, D. L.; SILVA, M. T. A.; CICARELLI, R. M. B. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 97-105, fev. 2007.

AMBRÓSIO, D. L.; BARBOSA, C. F.; VIANNA, V. F.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: establishment of permeable cells for RNA processing analysis with drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 617-620, out. 2004.

AMBRÓSIO, D. L.; LEE, J. H.; PANIGRAHI, A. K.; NGUYEN, T. N.; CICARELLI, R. M. B.; GÜNZL, A. Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 990-1000, July 2009.

ARNOSTI, L. V. **Reação de trans-splicing in vitro utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi***. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

ÁVILA, H. P. **Atividade antibacteriana de chalconas**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BAKER, N.; KONING, H. P.; MÄSER, P.; HORN, D. Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 110-118, Mar. 2013.

BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. G.; BODADE, R. G.; TOTRE, J. V.; KHOBRAGADE, C. K. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p.1364-1370, Feb. 2010a.

BANDGAR, B. P.; PATIL, S. A.; GACCHE, R. N.; KORBAD, B. L.; HOTE, B. S.; KINKAR, S. N.; JALDE, S. S. Synthesis and biological evaluation of nitrogen containing chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 730-733, Jan. 2010b.

BARBOSA, C. F.; OKUDA, E. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 1, p. 33-39, Jan. 2007.

BARRETT, S. V.; BARRETT, M. P. Anti-sleeping sickness drugs and cancer chemotherapy. **Parasitology Today**, v. 16, n. 1, p. 7-9, Jan. 2000.

- BATT, D. G.; GOODMAN, R.; JONES, D.; KERR, J. S.; MANTEGNA, L. R.; McCALLISTER, C.; NEWTON, R. C.; NURNBERG, S.; WELCH, P. K.; COVINGTON, M. B. 2'-substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis. **Journal of Medical Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 1434-1442, May 1993.
- BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; LOPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLAN, R. L. E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylene-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 2/3, p. 87-95, Mar. 2005.
- BOSETTO, M. C.; MORTARA, R. A.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; SILVA, M. T. A.; OKUDA, E. S.; CICARELLI, R. M. B. Detection and localization of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) in Trypanosomatids using anti-m3G antibodies. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 95-99, Mar. 2008.
- BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 18, p. 1-8, May 2007.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232-239, May 2003.
- BREMER, K.; ANDERBERG, A. A.; KARIS, P. O.; LUNDBERG, J. Tribe Eupatorieae. In: BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 1994. Cap. 23, p. 625-680.
- BRUCE, D. Classification of the African trypanosomes pathogenic to man and domestic animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, p. 1-22, Nov. 1914.
- BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, May 2002.
- BRUN, R.; BLUM, J. Human African Trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 261-273, June 2012.
- BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289-292, Sept. 1979.
- CARVALHO JÚNIOR, P. S. C. **Chalconas metoxiladas bioativas**: cristalização, estrutura e arranjo supramolecular. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2012.

CHIARADIA, L. D.; SANTOS, S. dos; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2, 4, 6-trimethoxyacetophenone in Raw264.7 cells stimulated by LPS: quantitative structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 658-667, Jan. 2008.

CHIARI, B. G.; MARTINI, P. C.; MORAES, J. D. D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M. A.; CICARELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 2, n. 2, p. 08-14, June 2012.

CICARELLI, R. M. B.; ARNOSTI, L. V.; TREVELIN, C. C.; SILVA, M. T. A. Tools for trans-splicing drug interference evaluation in kinetoplastid. In: MOHAMMAD, S. (Org.). **Parasitology**. Imphal: InTech, 2012. v. 1, p. 3-28.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1969. v. 4, p. 674-675.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, Jan. 2009.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 231-245, June 2004.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, July 2007.

CROOS, G. A.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* sspp. in semi-defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, Dec. 1973.

DAS, B. C.; MARIAPPAN, G.; SAHA, S.; BHOWMIK, D.; CHIRANJIB. Anthelmintic and anti-microbial activity of some novel chalcone derivatives. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 113-120, 2010.

DATTA, B. K.; DATTA, S. K.; RASHID, M. A.; NASH, R. J.; SARKER, S. D. A sesquiterpene acid and flavonoids from *Polygonum viscosum*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 2, p. 201-205, May 2000.

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 199-207, May 2003.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125-1149, Dec. 1999.

DI STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. 604 p.

DOMÍNGUEZ, J. N.; LEÓN, C.; RODRIGUES, J.; GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Il Farmaco**, v. 60, n. 4, p. 307-311, Apr. 2005.

DOMÍNGUEZ, J. N.; CHARRIS, J. E.; LOBO, G. ; GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N.; MORENO, M. M.; RIGGIONE, F.; SANCHEZ, E.; OLSON, J.; ROSENTHAL, P. J. Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 555-560, June 2001.

DUMAS, M.; BISSER, S. Clinical aspects of human African trypanosomiasis. In: DUMAS, M.; BOUTEILLE, B.; BUGUET, A. (Ed.). **Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness**. Paris: Springer Verlag, 1999. p. 215-233.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, June 2005.

DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I. J.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. The anti-inflammatory compounds of *Polygonum bistorta*: isolation and characterisation. **Planta Medica**, v. 65, n. 4, p. 371-374, May 1999.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C. A.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 221-231, Jan. 2009.

EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. Chalcones: a new class of antimitotic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 1948-1954, July 1990.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 87-89, Feb. 2001.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B.; ROZENTAL, S.; SILVA, A. J.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 647-652, Dec. 2002.

FABROWSKI, F. J. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002. 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

- FACUNDO, V. A.; MOREIRA, L. S. Estudo fitoquímico e farmacológico dos constituintes fixos e voláteis de *Hedychium coronarium* J. Koen. (Zingiberaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 45., 2005, Belém. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Química, 2005. p. 45.
- GAO, L.; LIU, N.; HUANG, B.; HU, X. Phylogenetic analysis and genetic mapping of Chinese *Hedychium* using SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 4, p. 369-377, Aug. 2008.
- GARCIA, L. S. **Diagnostic medical parasitology**. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001. p. 235-244.
- GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2/3, p. 173-187, Sept. 1991.
- GOPANRAJ, G.; DAN, M.; SHIBURAJ, S.; SETHURAMAN, M. G.; GEORGE, V. Chemical composition and antibacterial activity of the rhizome oil of *Hedychium larsenii*. **Acta Pharmaceutica**, v. 55, n. 3, p. 315-320, Sept. 2005.
- GUENTHER, E. History, origin in plants, production and analysis. In: ____ . **The essential oils**. 4th ed. Toronto: Van Nostrand, 1977. v. 2.
- HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67-71, Nov. 2003.
- HARRISON, W. T. A.; YATHIRAJAN, H. S.; SAROJINI, B. K.; NARAYANAD, B.; ANILKUMAR, H. G. Do C-H...O and C-H... π interactions help to stabilize a non-centrosymmetric structure for racemic 2,3-dibromo-1,3-diphenylpropan-1-one? **Acta Crystallographica. Section C: Crystal Structure Communications**, v. 61, n. 12, p. o728-o730, Dec. 2005.
- HAVEKES, L.; VAN HINSBERGH, V.; KEMPE, H. J.; EMEIS, J. The metabolism *in vitro* of human low-density lipoprotein by the human hepatoma cell line HepG2. **The Biochemical Journal**, v. 214, n. 3, p. 951-958, Sept. 1983.
- HE, E. Y. Study on *Hedychium coronarium* Koenig's edibility and its pharmacological experiments. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, v. 11, p. 1077-1078, 2000.
- HEWITT, N. J.; HEWITT, P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. **Xenobiotica**, v. 34, n. 3, p. 243-256, Mar. 2004.
- ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y. T.; OHSAWA, C.; FUJII, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 617-621, Oct. 1982.

- JANNIN, J.; SIMARRO, P. Protozoan diseases: African Trypanosomiasis. In: Heggenhougen, K. **International encyclopedia of public health**. Oxford: Academic Press, 2008. v. 5, p. 331-335.
- JOY, B.; RAJAN, A.; ABRAHAM, E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 439-443, May 2007.
- KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 496-504, Feb. 2004.
- KIM, H. J.; WOO, E. R.; PARK, H. A novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 581-586, May 1994.
- KIRCHHOFF, L. V.; BACCHI, C. J.; MACHADO, F. S.; WEISS, H. D.; HUANG, H.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; Trypanosomes – In: SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2009. v. 5, p. 744-757.
- KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1991. v. 1, 603 p.
- KUMAR, R.; MOHANAKRISHNAN, D.; SHARMA, A.; KAUSHIK, N. K.; KALIA, K.; SINHA, A. K.; SAHAL, D. Reinvestigation of structure e activity relationship of methoxylated chalcones as antimalarials: synthesis and evaluation of 2,4,5-trimethoxy substituted patterns as lead candidates derived from abundantly available natural β -asarone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5292-5301, Nov. 2010.
- KUMAR, S. K.; HAGER, E.; PETTIT, C.; GURULINGAPPA, H.; DAVIDSON, N. E.; KHAN, S. R. Design, synthesis and evolution of novel boronicchalcone derivatives as antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n.14, p. 2813-2815, July 2003.
- LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMÍNGUEZ, J. N.; DAVISON, E.; KURSBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZMAN, E. O. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. **Journal of Medical Chemistry**, v. 38, n. 26, p. 5031-5037, Dec. 1995.
- LÓPEZ, S. N.; FURLAN, R. L. E.; ZACCHINO, S. A. Detection of antifungal compounds in *Polygonum ferrugineum* Wedd. extracts by bioassay-guided fractionation. Some evidences of their mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 633-636, Nov. 2011.
- LÓPEZ, S. N.; SIERRA, M. G.; GATUSO, S. J.; FURLÁN, R. L.; ZACCHINO, S. A. An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygonaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2152-2158, Oct. 2006.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

MATSUDA, H.; SHIMODA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 14, p. 1839-1842, July 2001.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; SAKAMOTO, Y.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2527-2534, Aug. 2002.

MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 501-513, Aug. 2005.

MEJDOUB, R.; KATSIOTIS, S. Factors influencing the yield and the quality of the obtaining essential oil from the leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook growing in Crete. **Scientia Pharmaceutica**, v. 66, p. 93-105, 1998.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459-474, Apr. 2011.

MICHAELI, S.; PODELL, D.; AGABIAN, N.; ULLU, E. The 7SL RNA homologue of *Trypanosoma brucei* is closely related to mammalian 7SL RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 55-64, Mar. 1992.

MOLYNEUX, D. H.; PENTREATH, V.; DOUA, F. African trypanosomiasis in man. In: COOK, G. C. (Ed.). **Manson's tropical diseases**. 20th ed. London: WB Saunders, 1996. p. 1183-1196.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 337-347, Nov. 2009.

MOREIRA, E. A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; FRANKE, T. A.; MIGUEL, O. G. O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.V.M. aclimatado no estado do Paraná-Brasil. **Tribuna Farmacêutica**, v. 48, n. 1-2, p. 44-53, enero/dic. 1980.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, Dec. 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, Dec. 2000.

MURAI, Y.; KASHIMURA, S.; TAMEZAWA, S.; HASHIMOTO, T.; TAKAOKA, S.; ASAKAWA, Y.; KIGUCHI, K.; MURAI, F.; TAGAWA, M. Absolute configuration of (6S,9S)-roseoside from *Polygonum hydropiper*. **Planta Medica**, v. 67, n. 5, p. 480-481, July 2001.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, n. 5, p. 399-403, Sept. 1991.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHØNNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, June 2004.

NILSEN, T. W. Trans-splicing: an update. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1/2, p. 1-6, July 1995.

NOGUEIRA, M. E. I.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I.; LONGO, M. C.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 3, p. 361-366, Apr. 2006.

NOK, A. J. African Trypanosomiasis. In: BARRETT, A. D. T.; STANBERRY, L. R. **Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases**. Amsterdam: Academic Press 2009. Cap. 62, p. 1257-1273.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, Feb. 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; KDZIA, B.; SCHROEDER, G. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 707-713, Apr. 2008.

OLIVEIRA, F.; MARQUES, M. R. C.; MANCINI, B. Caracterização farmacobotânica de *Hedychium coronarium* Koenig. uma fraude de *Angelica archangelica* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 7, p. 51-59, 1985.

PADHYE, S.; AHMAD, A.; OSWAL, N.; SARKAR, F. H. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 2, n. 2, p. 38, Sept. 2009.

PARK, K. R.; NAM, D.; YUN, H. M.; LEE, S. G.; JANG, H. J.; SETHI, G.; CHO, S. K.; AHN, K. S. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 178-188, Dec. 2011.

PASSERINI, G. D. **Avaliação da potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

- PATIL, C. B.; MAHAJAN, S. K.; KATTI, S. A. Chalcone: a versatile molecule. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 11-22, 2009.
- PEACOCK, L.; FERRIS, V.; BAILEY, M.; GIBSON, W. Fly transmission and mating of *Trypanosoma brucei brucei* strain 427. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 100-106, Aug. 2008.
- PENG, Z.; STRACK, D.; BAUMERT, A.; SUBRAMANIAM, R.; GOH, N.; CHIA, T.; TAN, S.; CHIA, L. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 219-228, Jan. 2003.
- PERIS, M.; SIMPSON, A. M.; GRUNSTEIN, J.; LILIENTAL, J. E.; FRECH, G. S.; SIMPSON, L. Native gel analysis of ribonucleoprotein complexes from a *Leishmania tarentolae* mitochondrial extract. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 9-24, Mar. 1997.
- PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 651-659, June 2003.
- PIVARI, M. O.; POTT, V. J.; POTT, A. Macrófitas aquáticas de ilhas flutuantes (baceiros) nas sub-regiões do Abobral e Miranda, Pantanal, MS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 563-571, ago. 2008.
- POLANCO-HERNÁNDEZ, G.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; CHAN-BACAB, M. J.; SAGUA-FRANCO, H.; GONZÁLEZ, J.; OSORIO-RODRÍGUEZ, L.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 451-455, July 2012.
- RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2679-2686, May 2004.
- RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, June 2012.
- REZK, B. M.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DER VIJGH, W. F. F.; BAST, A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, n. 1, p. 9-13, July 2002.
- RIBEIRO, R. A.; FIUZA DE MELO, M. M.; BARROS, F. de; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 261-269, Mar. 1986.

- RIBEIRO, R. A.; BARROS, F. de; MELO, M. M. de; MUNIZ, C.; CHIEIA, S.; WANDERLEY, M. G.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 19-29, Sept. 1988.
- RIZVI, S. U.; SIDDIQUI, H. L.; PARVEZ, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUI, W. A.; YASINZAI, M. M. Antimicrobial and antileishmanial studies of novel(2E) -3-(2-chloro-6-methyl/methoxyquinolin-3-yl) -1-(aryl)prop-2-en-1-ones. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 301-306, Mar. 2010.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327 p.
- SANTOS, S. B.; PEDRALLI, G.; MEYER, S. T. Aspectos da fenologia e ecologia de *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae) na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto – MG. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 175-180, abr. 2005.
- SARTOR, C.; SILVA, C. da; SOUZA, M. de. Flavonoid glycosides of *Pollygonum stelligerum* Cham. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 3, p. 303-304, Apr. 1999.
- SASSA, S.; SUGITA, O.; GALBRAITH, R. A.; KAPPAS, A. Drug metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 143, n. 1, p. 52-57, Feb. 1987.
- SHAKED, H.; WACHTEL, C.; TULINSKI, P.; YAHIA, N. H.; BARDA, O.; DARZYNKIEWICZ, E.; NILSEN, T. W.; MICHAELI, S. Establishment of an *in vitro* trans-splicing system in *Trypanosoma brucei* that requires endogenous spliced leader RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 10, p. e114, June 2010
- SIANI, A. C; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, set./out. 2000.
- SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 813-823, Nov. 1995.
- SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUZA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2/3, p. 277-283, Dec. 2003.
- SILVA, M. T. A. da. **Identificação e caracterização funcional de proteínas específicas do complexo U5 snRNP em Tripanosomatídeos**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SILVA, M. T. A. da; AMBRÓSIO, D. L.; TREVELIN, C. C.; WATANABE, T. F. LAURE, H. J.; GREENE, L. J.; ROSA, J. C.; VALENTINI, S. R.; CICARELLI, R. M. B. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p.130-138, mar. 2011.

SILVA, V. A. **Estudo da síntese da chalcona 1(4'-n-fenil-sulfonilamidafenil)-3-(4-metilfenil)-2e-propen-1-ona**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. p. 821.

SIVAKUMAR, P. M.; MUTHU KUMAR, T.; DOBLE, M. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on Chalcones. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 1, p. 68-79, July 2009.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, jan./mar. 2007.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 19361-19367, July 1999.

STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 1595-1604, Feb. 1999.

SUN, X.; SNEDEN, A. T. Neoflavonoids from *Polygonum perfoliatum*. **Planta Medica**, v. 65, n. 7, p. 671-673, Oct. 1999.

TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; KUROKI, S.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoid esters of sucrose, vanicoside B and lapathoside A from *Polygonum lapathifolium*. **Cancer Letters**, v. 173, n. 2, p. 133-138, Nov. 2001.

TANAKA, H.; NAKAMURA, S.; ONDA, K.; TAZAKI, T.; HIRANO, T. Sofalcone, an anti-ulcer chalcone derivative, suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation: implication of heme-oxygenase-1 induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, n. 4, p. 566-571, Apr. 2009.

TSCHUDI, C.; ULLU, E. Destruction of U2, U4, or U6 small nuclear RNA blocks trans-splicing in trypanosome cells. **Cell**, v. 61, n. 3, p. 459-466, May 1990.

TURNER, B. L. A new species of *Melampodium* (Asteraceae, Heliantheae) from Jalisco, Mexico. **Phytologia**, v. 75, n. 2, p. 136-139, Aug. 1993.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20365-20369, Sept. 1995.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n.1/2, p. 55-68, July/Aug. 2010.

VIANNA, V. F.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B. Mapeamento de bandas de trans-splicing *in vitro* com extratos nucleares de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 2, p. 295-306, 2001.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 645-665, 2006.

WANG, K. J.; ZHANG, Y. J.; YANG, C. R. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 483-487, Jan. 2005.

WARREN, K. S.; PETERS, P. A. Cercariae of *Schistosoma mansoni* and plants: attempt to penetrate *Phaseolus vulgaris* and *Hedychium coronarium* produces a cercaricide. **Nature**, v. 217, n. 5129, p. 647-648, Feb. 1968.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 7-81, jan./jun. 1963.

WASS, J. A. Origin 7.0. **Biotech Software and Internet Report**, v. 3, n. 5/6, p. 130-133, Nov. 2002.

WATTENBERG, L. W.; COCCIA, J. B.; GALBRAITH, A. R. Inhibition of carcinogen-induced pulmonary and mammary carcinogenesis by chalcone administered subsequent to carcinogen exposure. **Cancer Letters**, v. 83, n. 1/2, p. 165-169, Aug. 1994.

WELBURN, S. C.; MAUDLIN, I.; SIMARRO, P. P. Sleeping sickness. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 706-720.

WILL, C. L.; LÜRHMANN, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 290-301, June 2001.

WILLERT, E.; PHILLIPS, M. A. Regulation and function of polyamines in African trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 66-72, Feb. 2012.

WIRTHENSOHN, M. G.; SEDGLEY, M. Effect of pruning on regrowth or cut foliage stems of seventeen *Eucalyptus* species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, n. 6, p. 631-636, 1998.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179-1183, May 1995.

WON, S. J.; LIU, C. T.; TSAO, L. T.; WENG, J. R.; KO, H. H.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103-112, Jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **African trypanosomiasis (sleeping sickness)**. 2012a. (Fact sheet N°259). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>>. Acesso em: 14 nov. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is sleeping sickness?** 2012b. (Online Q&A). Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/52/en/>>. Acesso em: 03 jul. 2012.

YAMAMOTO, S.; AIZU, E.; JIANG, H.; NAKADATE, T.; KIYOTO, I.; WANG, J. C.; KATO, R. The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 2, p. 317-323, Feb. 1991.

YIM, T. K.; WU, W. K.; MAK, D. H.; KO, K. M. Myocardial protective effect of an anthraquinone containing extract of *Polygonum multiflorum* ex vivo. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 607-611, Oct. 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, jan./fev. 2001.

ZHANG, Y.; WU, L. J.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, Jan. 2004.