



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação in silico e in vitro do efeito tripanocida de óleos essenciais e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como alternativa terapêutica da doença de Chagas

JANAÍNA BRANDÃO SEIBERT

OURO PRETO
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação in silico e in vitro do efeito tripanocida de óleos essenciais e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como alternativa terapêutica da doença de Chagas

JANAÍNA BRANDÃO SEIBERT

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Melo de Abreu Vieira

Co-Orientador estrangeiro: Prof. Cameron Alexander

OURO PRETO

2019

ii

S41a

Seibert, Janaína Brandão.

Avaliação in silico e in vitro do efeito tripanocida de óleos essenciais e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como alternativa terapêutica da doença de Chagas [manuscrito] / Janaína Brandão Seibert. - 2019.

245f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique Santos.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

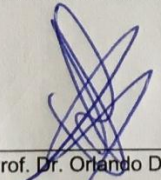
1. Essências e óleos essenciais. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Nanotecnologia. 4. Agentes antiinflamatórios. I. Santos, Orlando David Henrique. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

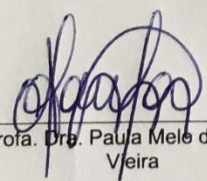


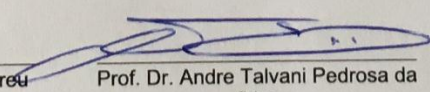
ATA DE DEFESA DE DOUTORADO

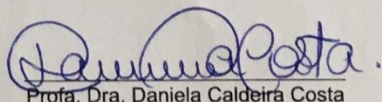
Aos 20 dias do mês de setembro do ano de 2019, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda **Janaina Brandao Seibert**, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Silvana Maria Eloi Santos (Membro - Externo) e pela Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira (Co-Orientadora - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação in Silico e in Vitro do Efeito Tripanocida de Óleos Essenciais e Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados como Alternativa Terapêutica da Doença de Chagas", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Silvana Maria Eloi Santos; segundo, Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho; terceiro, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara; quarto, Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva; quinto, Profa. Paula Melo de Abreu Vieira; sexto, Prof. Orlando David Henrique dos Santos. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 20 de setembro de 2019.

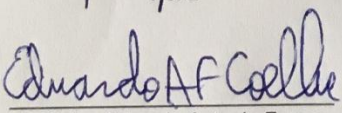

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

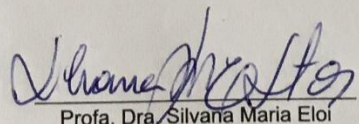
Presidente


Prof. Dra. Paula Melo de Abreu
Vieira


Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da
Silva


Prof. Dra. Daniela Caldeira Costa
Calsavara


Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz
Coelho


Prof. Dra. Silvana Maria Eloi
Santos


Doutoranda

“Um homem nunca sabe aquilo de que é capaz até que o tenta fazer.”

(Charles Dickens)

COLABORADORES

- Profª. Drª. Cláudia Martins Carneiro – Laboratório de Imunopatologia (UFOP)
- Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza – Laboratório de Fitotecnologia (UFOP)
- Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta – Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ)
- Dr. Policarpo Ademar Sales Junior – Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ)
- Profª. Drª. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues – Laboratório de Farmacognosia (UFJF)
- Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo (UFOP)
- Msc. Tatiane Roquete Amparo – Laboratório de Fitotecnologia (UFOP)
- Msc. Tamires Cunha Almeida – Laboratório de Pesquisas Clínicas (UFOP)
- Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias – Laboratório de Imunopatologia (UFOP)
- Dr. João Filipe Pereira Vieira – Laboratório de Imunopatologia (UFOP)
- Drª. Kátia Michelle Freitas – Laboratório de Substâncias Antitumorais (UFMG)
- Drª. Ana Letícia Braz – University of Nottingham
- Drª. Patrícia Monteiro – University of Nottingham
- Msc. Alessandra Travanut – University of Nottingham

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da vida e por sempre se fazer presente me guiando e iluminando meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos e à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira pelo apoio e por ter acreditado na minha capacidade. Esse trabalho é nosso!

Ao Dr. Policarpo Ademar Sales Junior pelo auxílio na avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* realizada no Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Silvane Maria Fonseca Murta. À Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro por permitir a utilização do Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e assessoramento na pesquisa da ação antiparasitária. Ao Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias, Dr. João Filipe Pereira Vieira e Dr^a. Kátia Michelle Freitas pela contribuição nos estudos da atividade anti-inflamatória. Ao Dr. Rodrigo Dian por todos os ensinamentos e por me despertar o interesse pela citometria de fluxo.

À Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (DDTF/DPD – FUNED) sob gerenciamento da Dr^a. Sílvia Ligório Fialho por disponibilizar a utilização do aparelho de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas e a Prof^a. Dr^a. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues pela ajuda nas análises. Nildes, obrigada pela amizade, pela paciência, pela troca de experiência, pela dedicação, pela disposição em me ajudar sempre e, sobretudo, pelos ensinamentos de vida e trabalho, devo tudo isso a você!

Aos amigos do laboratório de Fitotecnologia, em especial, Tatiane Roquete Amparo, pela colaboração na análise *in silico*, por compartilhar todas as conquistas e frustrações e por me despertar a curiosidade em novas pesquisas. E aos demais membros, Fernanda Senna Ferreira, Benila Maria Silveira, Tamires Cunha Almeida, Luciana Miranda e claro, ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza que fizeram do trabalho mais um motivo para aprendizado e diversão. Com vocês, isso tudo se tornou mais fácil.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Levi Eduardo Reis, Rory Cristiane Brito, Kátia da Silva Fonseca e Luciana

Fonseca Medeiros, pela paciência, pelo compromisso em querer ajudar sempre e pelo exemplo de união como grupo de pesquisa.

Ao orientador estrangeiro Cameron Alexander pela oportunidade de uma experiência profissional no exterior e todo incentivo na busca por novas formulações, bem como, as alunas Ana Letícia Braz, Alessandra Travanut e Patrícia Monteiro que tornaram esse momento delicado em mais uma forma de amadurecimento e aprendizado.

À agência financiadora Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa tanto no Brasil quanto no período de doutorado sanduíche (PDSE 88881.188759/2018-01).

Aos meus pais, João Luiz Seibert e Cláudia Maria Archanjo Brandão Seibert, pelo amor e carinho dedicados em todos esses anos e pelo apoio e incentivo dados incondicionalmente para que eu tivesse condições de lutar pelos meus sonhos e alcançar todos os meus objetivos, abdicando de suas próprias vidas para que hoje eu pudesse estar aqui. Obrigada pelos ensinamentos de vida e lições de moral que me fizeram ser quem sou hoje. Saibam que reconheço seus esforços e que serei eternamente grata por tudo que me proporcionaram e espero recompensá-los em dobro. Meu orgulho são vocês!

Ao meu irmão Jardel Brandão Seibert, que mesmo à distância sempre esteve presente na minha vida, me aconselhando e ajudando para que eu alcançasse o sucesso. Minha vida não seria a mesma sem você. Você também é responsável pelo que sou hoje e por tudo que conquistei.

Ao meu namorado Rodrigo Rocha da Cunha Melo, pelo amor e por compartilhar tantos os momentos de felicidades e tristezas, porque esse é o verdadeiro significado de companheirismo. Obrigada pela paciência e por sempre acreditar que todo nosso esforço não será em vão. Você me completa!

Aos meus familiares, pelo incentivo e carinho e por terem vibrado comigo a cada vitória.

Aos amigos, principalmente, Luísa Helena Perin de Melo e Catarina Stivali pela cumplicidade, pelo companheirismo e por ter proporcionado a criação de uma amizade forte e verdadeira que estará para sempre comigo.

À República Cirandinha, ex-alunas e moradoras, pelos inúmeros momentos de diversão, alegria, aprendizado, companheirismo e pelos ensinamentos de convivência, respeito e irmandade, enfim, pela experiência única da vida republicana. Obrigada por poder contar com vocês sempre!

A vocês e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

RESUMO

A falta de uma terapêutica tripanocida eficiente, principalmente na fase crônica da doença de Chagas e sem a presença de efeitos adversos intensos impulsiona a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. As substâncias produzidas através do metabolismo secundário de plantas podem apresentar diferentes efeitos biológicos e serem utilizadas como princípios ativos no tratamento de doenças. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar quimicamente os óleos essenciais extraídos das espécies *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron* e *Microlicia graveolens*, bem como avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* dos fármacos livres e após encapsulamento em sistemas nanoestruturados. A obtenção desses óleos ocorreu a partir da hidrodestilação das partes aéreas, com rendimentos em torno de 0,1 a 2,0% de acordo com a espécie. A caracterização realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu a identificação de mais de 90% dos compostos, com presença majoritária de monoterpenos oxigenados. A partir da análise *in silico* foi possível prever inicialmente que todos os óleos em estudo apresentariam potencial contra o parasito *T. cruzi*. No entanto, na avaliação *in vitro* desta atividade utilizando a cepa Tulahuen, somente o óleo de folhas de *C. densiflorus* se revelou ativo, a partir de uma CI_{50} sobre o parasito equivalente a 60 $\mu\text{g/mL}$ (IS= 3,8). No ensaio de permeabilidade de membrana do parasito, concentrações superiores a 30 $\mu\text{g/mL}$ de óleo apresentaram diferenças em relação ao controle. Este resultado foi confirmado através da microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, sistemas nanoemulsionados, lipossomais e micelares carregados de óleo essencial e/ou benznidazol foram desenvolvidos e apresentaram tamanho em escala nanométrica (<500 nm). A adição dos princípios ativos favoreceu a homogeneidade de distribuição de tamanho para todas as formulações. Além disso, potencial zeta negativo e um pH ácido também definiram as formulações. A estabilidade dos sistemas foi avaliada e apenas os lipossomas contendo ambos os fármacos foram instáveis. As formulações foram capazes de reproduzir a atividade tripanocida apresentada pelo óleo e benznidazol a partir de concentrações inferiores quando comparadas aos fármacos livres. No entanto, as micelas foram caracterizadas pelos maiores índices de seletividade e um efeito sinérgico foi comprovado quando ambos os fármacos foram encapsulados concomitantemente nessa forma farmacêutica. Sendo assim, os resultados desse

trabalho demonstram o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* como candidato potencial ao tratamento da doença de Chagas, o qual é capaz de eliminar o *T. cruzi in vitro* a partir de baixas concentrações. Em adição, as formas micelares contendo benznidazol podem ser uma alternativa na quimioterapia chagásica tanto na sua forma simples, bem como, em combinação com o óleo essencial de *C. densiflorus*.

Palavras-chave: *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron*, *Microlicia graveolens*, óleo essencial, anti-*Trypanosoma cruzi*, micelas, nanoemulsão, lipossoma.

ABSTRACT

The absence of efficient trypanocidal therapy in the chronic phases of the Chagas disease and without intense adverse effects supports research for development of new drugs. Substances produced by plants secondary metabolism exhibit several biological effects and they are used as active principles in the treatment of diseases. This work aimed characterizing essential oils extracted from *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron* and *Microlicia graveolens* species, as well as evaluating the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of the free drugs and after their encapsulation in nanostructured systems. These oils were produced by hydrodistillation from the aerial parts and the yields ranged from 0.1 to 2.0% according to the species. Oils characterization by gas chromatography mass spectrometry allowed identifying more than 90% of the compounds, that were mainly classified as oxygenated monoterpenes. *In silico* analysis initially predicted that all oils under study have potential against the *T. cruzi* parasite. However, this activity was evaluated *in vitro* using Tulahuén strain and only the essential oil from *C. densiflorus* leaves was active, from IC₅₀ on the parasite equivalent to 60 µg/mL (SI = 3.8). In the parasite membrane permeability assay, oil concentrations higher than 30 µg/mL showed differences when compared to the control. This result was confirmed by transmission electron microscopy. In addition, nanoemulsion, liposome and micellar systems loaded with essential oil and/or benznidazole were developed and showed a nanometric size (<500 nm). The drug addition favored the homogeneous size distribution. Moreover, negative zeta potential and acid pH also defined these formulations. The systems stability was evaluated and only liposomes loaded with both drugs were unstable. The formulations were able to reproduce the oil and benznidazole trypanocidal activity at lower concentrations than free drugs. However, micelles showed the highest selectivity index and a synergistic effect was demonstrated when both drugs were encapsulated in that pharmaceutical form. Thus, the results of this work indicate the essential oil from *C. densiflorus* leaves as a potential candidate for the treatment of Chagas disease since it is able to eliminate *T. cruzi* *in vitro* at low concentrations. Moreover, benznidazole-loaded micellar forms may be an alternative in chagasic chemotherapeutics through of its simple form or in combination with the *C. densiflorus* essential oil.

Key words: *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron*, *Microlicia graveolens*, essential oil, anti-*Trypanosoma cruzi*, micelle, nanoemulsion, liposome.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XX
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Doença de Chagas	2
1.2. Processo inflamatório na doença de Chagas	5
1.3. Estresse oxidativo na doença de Chagas	7
1.4. Tratamento da doença de Chagas	9
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-<i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Uso de plantas medicinais no tratamento da doença de Chagas	15
1.1.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.1.2. Análise <i>in silico</i>	17
1.2. Óleos essenciais.....	18
1.3. Espécies em estudo.....	21
1.3.1. <i>Cymbopogon densiflorus</i>	21
1.3.2. <i>Cymbopogon nardus</i>	22
1.3.3. <i>Melaleuca leucadendron</i>	24
1.3.4. <i>Microlícia graveolens</i>	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Material botânico e obtenção dos óleos essenciais.....	29
3.2. Caracterização da composição química dos óleos essenciais.....	30
3.3. Avaliação <i>in silico</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.4.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.4.2. Citotoxicidade.....	33
3.5. Teste de permeabilidade de membrana	34
3.5.1. Citometria de fluxo	34

3.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
3.6. Análises estatísticas	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Material botânico e obtenção dos óleos essenciais.....	36
4.2. Caracterização da composição química dos óleos essenciais.....	40
4.3. Avaliação <i>in silico</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
4.4. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
4.4.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
4.4.2. Citotoxicidade.....	61
4.5. Teste de permeabilidade de membrana	64
4.5.1. Citometria de fluxo	64
4.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	67
5. CONSIDERAÇÕES	71
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	72
.....	72
1. INTRODUÇÃO	73
1.1. Nanotecnologia.....	73
1.2. Sistemas nanoestruturados para o tratamento da doença de Chagas	74
1.3. Nanoemulsão	76
1.4. Lipossoma.....	78
1.5. Micela	81
1.6. PLA-PEG.....	83
1.7. Alginato	85
1.8. Quitosana.....	87
2. OBJETIVOS	89
2.1. Objetivo geral	89
2.2. Objetivos específicos.....	89
3. MATERIAL E MÉTODOS	90
3.1. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados	90
3.1.1. Sistema nanemulsionado.....	90
3.1.2. Sistema lipossomal.....	90
3.1.3. Sistema micelar.....	91
3.2. Caracterização dos sistemas nanoestruturados	92

3.2.1. Determinação do diâmetro médio de partícula e índice de polidispersividade.....	92
3.2.2. Determinação do potencial zeta	92
3.2.3. Determinação do pH.....	92
3.3. Avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados.....	93
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	93
3.4.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	93
3.4.2. Citotoxicidade.....	94
3.5. Análises estatísticas	94
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1. Caracterização dos sistemas nanoestruturados	95
4.1.1. Determinação do diâmetro médio de partícula e índice de polidispersividade.....	95
4.1.2. Determinação do potencial zeta	99
4.1.3. Determinação do pH.....	101
4.2. Avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados.....	102
4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	107
4.3.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	107
4.3.2. Citotoxicidade.....	113
5. CONSIDERAÇÕES	117
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS – DOUTORADO SANDUÍCHE	118
Development of PLA-PEG nanoparticles loaded with essential oil from <i>Cymbopogon densiflorus</i> leaves for the treatment of chagas disease.....	119
Nanoparticles from natural polymers, alginate and chitosan, as an alternative for the treatment of chagas disease.....	143
APÊNDICE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	169
1. INTRODUÇÃO	170
1.1. Uso de plantas medicinais no tratamento da inflamação.....	170
1.2. Uso de plantas medicinais no estresse oxidativo.....	172
2. OBJETIVOS	175
2.1. Objetivo geral	175
2.2. Objetivos específicos.....	175

3. MATERIAL E MÉTODOS	176
3.1. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti-inflamatória.....	176
3.1.1. Citotoxicidade.....	176
3.1.2. Dosagem de citocinas	177
3.1.3. Dosagem de óxido nítrico.....	178
3.1.4. Dosagem de espécies reativas de oxigênio.....	180
3.1.5. Avaliação da expressão da enzima iNOS.....	181
3.1.6. Avaliação da expressão da enzima COX-2.....	182
3.2. Avaliação <i>in silico</i> da atividade anti-inflamatória.....	184
3.2.1. Atividade anti-inflamatória.....	184
3.2.2. Avaliação da ligação molecular.....	184
3.3. Análises estatísticas	185
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	186
4.1. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti-inflamatória.....	186
4.1.1. Citotoxicidade.....	186
4.1.2. Dosagem de citocinas	187
4.1.3. Dosagem de óxido nítrico.....	192
4.1.4. Dosagem de espécies reativas de oxigênio.....	195
4.1.5. Avaliação da expressão da enzima iNOS.....	199
4.1.6. Avaliação da expressão da enzima COX-2.....	201
4.2. Avaliação <i>in silico</i> da atividade anti-inflamatória.....	203
4.2.1. Atividade anti-inflamatória.....	203
4.2.2. Avaliação da ligação molecular.....	206
5. CONSIDERAÇÕES	210
REFERÊNCIAS.....	212

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas. 1- Um inseto vetor triatomíneo infectado ao alimentar-se de sangue, elimina pelas fezes, tripomastigotas próximo do local da picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através do ferimento da picada ou por mucosas intactas. 2- Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao ponto de entrada onde diferenciam-se nas formas intracelulares, os amastigotas. 3- Os amastigotas replicam-se por divisão binária. 4- Então diferenciam-se em formas tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de uma grande variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, em um ciclo infectante contínuo. 5- O triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo parasitos circulantes. 6- As formas tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7- Multiplicam-se por divisão binária. 8- No intestino posterior o parasito se diferencia na forma infectante, o tripomastigota metacíclico. “i” Estágio infeccioso. “d” Estágio diagnóstico (Fonte: Adaptado de CDC, 2016). 4
- Figura 2:** Formação de unidades de isopreno a partir do ácido mevalônico (MVA) e biossíntese de terpenóides a partir da ligação "cabeça-cauda" das unidades de isoprenos (Fonte: SEIBERT, 2015). 19
- Figura 3:** Exemplar da espécie *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf coletada na região de Ouro Preto/MG. 22
- Figura 4:** Exemplar da espécie *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. 23
- Figura 5:** Exemplar da espécie *Melaleuca leucadendron* (L.) L., coletada na região de Ouro Preto/MG. 25
- Figura 6:** Exemplar da espécie *Microlicia graveolens* DC, coletada na região de Ouro Preto/MG. 27
- Figura 7:** Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*. a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis*-piperitol. 42
- Figura 8:** Fórmula estrutural do limoneno, constituinte majoritário do óleo essencial de flores de *Cymbopogon densiflorus*. 43
- Figura 9:** Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon nardus*. a) Citronelal; b) Citronelol; c) Geraniol. 44
- Figura 10:** Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*: a) α -pineno; b) β -pineno; c) 1,8-cineol; d) Viridiflorol. 49
- Figura 11:** Fórmula estrutural do *cis*-acetato de pinocarvil, constituinte majoritário do óleo essencial de folhas de *Microlicia graveolens*. 51
- Figura 12:** Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática do parasito *Trypanosoma cruzi* após tratamento nas diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* representada por histogramas (A) e barras (B). a) OE 240 μ g/mL; b) OE 120 μ g/mL; c) OE 60 μ g/mL; d) OE 30 μ g/mL; e) OE 15 μ g/mL; IP – Iodeto de propídio; CN – Controle negativo. #Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$ 66
- Figura 13:** Análise através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) do parasito *Trypanosoma cruzi* sem tratamento (A - Controle negativo) e após tratamento com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (B). Seta preta: ruptura da membrana plasmática; Seta branca: presença de vacúolos citoplasmáticos. 69
- Figura 14:** Linha do tempo de sistemas de liberação de fármaco obtidos através da nanotecnologia, destacando algumas formulações de escala nanométrica que foram marcos importante ao longo da história (Traduzido de SHI *et al.*, 2010). 73

Figura 15: Representação esquemática de nanoemulsões do tipo O/A e A/O (Fonte: Adaptado de OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004).	77
Figura 16: Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas, unilamelar e multilamelar (Traduzido de MISHARA <i>et al.</i> , 2011).	79
Figura 17: Representação esquemática da forma micelar a partir do polímero Pluronic F127 (Adaptado de JHAVERI & TORCHILIN, 2014).	82
Figura 18: Representação esquemática de nanocápsula (A), nanoesfera (B) e nanopartícula formada pelos polímeros polilactídio (PLA) e polietilenoglicol (PEG) (C) (Adaptado de SHALABY <i>et al.</i> , 2014; SUFFREDINI, EAST & LEVY, 2014).	84
Figura 19: Representação esquemática de nanopartícula formada por alginato (Adaptado de SEVERINO <i>et al.</i> , 2015).	87
Figura 20: Representação esquemática de nanopartícula formada por quitosana (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2017).	88
Figura 21: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas nanoemulsionados de acordo com o período analisado. NE-CN: Nanoemulsão como controle negativo; NE-OE: Nanoemulsão contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> ; NE-OE+BZ: Nanoemulsão contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e benznidazol; NE-BZ: Nanoemulsão contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$	104
Figura 22: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas lipossomais de acordo com o período analisado. LIP-CN: Lipossoma como controle negativo; LIP-OE: Lipossoma contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> ; LIP-OE+BZ: Lipossoma contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e benznidazol; LIP-BZ: Lipossoma contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$. # Sistema instável.	105
Figura 23: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas micelares de acordo com o período analisado. MIC-CN: Micela como controle negativo; MIC-OE: Micela contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> ; MIC-OE+BZ: Micela contendo óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e benznidazol; MIC-BZ: Micela contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$	107
Figura 24: Isobogramas descrevendo os efeitos do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> quando combinado com o benznidazol nas formas nanoemulsionadas (A), lipossomais (B) e micelares (C). Abaixo da linha contínua corresponde às posições para um efeito sinérgico.	112
Figura 25: Porcentagem da viabilidade celular de macrófagos J774 de acordo com as concentrações de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> na ausência e presença de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (100 ng/mL).	186
Figura 26: Dosagem de TNF (A), IFN- γ (B), MCP-1 (C), IL-10 (D) e IL-6 (E) após tratamento nas diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> na ausência (-) e presença (+) de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (100 ng/mL). #Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$. *Não foi possível a quantificação.	188
Figura 27: Dosagem de óxido nítrico (NO) a partir do método de Griess (A), porcentagem de células produtoras de óxido nítrico (B) e intensidade média de fluorescência (C) através da citometria de fluxo, após tratamento de macrófagos J774 com diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> na ausência (-) ou presença (+) de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (100 ng/mL). *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$	193

Figura 28: Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento de macrófagos J774 com diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* na ausência (-) ou presença (+) de LPS (5 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) a partir da citometria de fluxo. A – Porcentagem de células produtoras de óxido nítrico e B – Intensidade média de fluorescência. #Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$... 197

Figura 29: Análise da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos J774 na ausência (CN - controle negativo) ou presença (CP - controle positivo) de LPS (5 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) após tratamento com óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (250 µg/mL). A – Imagens obtidas através da microscopia confocal e B – Intensidade média de fluorescência obtida através do software *Image J*. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$ 200

Figura 30: Análise da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) em macrófagos J774 na ausência (CN - controle negativo) ou presença (CP - controle positivo) de LPS (5 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) após tratamento com óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (250 µg/mL). A – Imagens obtidas através do gel de Western blot e B – Gráfico da razão COX-2/β-actina. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$ 202

Figura 31: Diagrama 3D demonstrando o sítio de ligação dos compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (A) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (B). a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis*-piperitol. 206

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies <i>Cymbopogon densiflorus</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Melaleuca leucadendron</i> e <i>Microlicia graveolens</i> de acordo com o período da coleta.....	36
Tabela 2: Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	41
Tabela 3: Caracterização química do óleo essencial de flores de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	43
Tabela 4: Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>	44
Tabela 5: Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	48
Tabela 6: Caracterização química do óleo essencial de flores de <i>Melaleuca leucadendron</i>	50
Tabela 7: Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Microlicia graveolens</i>	51
Tabela 8: Previsões <i>in silico</i> dos potenciais efeitos biológicos e mecanismos de ação anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> dos compostos majoritários de cada óleo essencial utilizando a ferramenta PASS online.....	54
Tabela 9: Determinação da CI ₅₀ das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> e das células L929 sob ação dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies <i>Cymbopogon densiflorus</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Melaleuca leucadendron</i> e <i>Microlicia graveolens</i> e determinação do índice de seletividade para atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Tabela 10: Constituição qualitativa e quantitativa das nanoemulsões obtidas a partir da adição de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e/ou benznidazol.....	90
Tabela 11: Constituição qualitativa e quantitativa dos lipossomas obtidos a partir da adição de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e/ou benznidazol.....	91
Tabela 12: Constituição qualitativa e quantitativa das micelas obtidas a partir da adição de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e/ou benznidazol.....	92
Tabela 13: Caracterização dos sistemas nanoemulsionados, lipossomais e micelares de acordo com o diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH.....	96
Tabela 14: Determinação da CI ₅₀ das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> e das células L929 sob ação dos sistemas nanoestruturados e determinação do índice de seletividade para a atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	108
Tabela 15: Determinação do índice da concentração inibitória fracionada e do efeito sobre a atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> quando combinado com o benznidazol.....	111
Tabela 16: Previsões <i>in silico</i> dos potenciais efeitos biológicos e mecanismos de ação anti-inflamatória dos compostos majoritários de óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> , utilizando a ferramenta PASS online.....	204
Tabela 17: Análise da ligação molecular entre os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).....	207
Tabela 18: Análise da ligação molecular entre os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> e a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2).....	208

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LOX: 5-Lipoxigenase	DTN: Doenças tropicais negligenciadas
Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	EOM: Estruturas orgânicas de metal
A/O: Emulsão água em óleo	EPI: <i>Emulsion Phase Inversion</i>
ATP: Adenosina trifosfato	ERN: Espécie reativa de nitrogênio
BSA: <i>Bovine serum albumin</i>	ERO: Espécie reativa de oxigênio
BZ: Benznidazol	GPX: Glutathione peroxidase
CBA: <i>Cytometric Bead Array</i>	HGPRT: Hipoxantina guanina fosforribosil transferase
CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose
CI ₅₀ : Concentração inibitória de 50%	IBE: Inibidores da biossíntese do ergosterol
CIF: Concentração inibitória fracionada	ICC: Insuficiência cardíaca congestiva
CMC: Concentração micelar crítica	ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada
CNT: Células não tratadas	IFN- γ : Interferon- γ
COX: Ciclo-oxigenase	IK: Índice de Kovats
CPRG: <i>Chlorophenol red beta-D-galactopyranoside</i>	I κ B: Inibidor de kappa B
CT: Células tratadas	IL: Interleucina
CYP51: Lanosterol 14 α -demetilase	IMF: Intensidade média de fluorescência
DAF2-DA: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína	iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol	IP: Iodeto de propídio
DCF: Diclorofluoresceína	IPP: Pirofosfato de isopentenila
DCFH-DA: Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína	IS: Índice de seletividade
DMAP: Pirofosfato de dimetilalila	JNK 1/2: <i>C-Jun NH2-Terminal Kinase</i>
DMSO: Dimetilsulfóxido	LIP: Lipossoma
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila	

L-NAME: N^w-nitro-arginina-metil-ester

LPS: Lipopolissacarídeo

LUV: *Large unilamellar vesicles*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MEP: Metileritritol fosfato

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MIC: Micela

MLV: *Multilamellar large vesicles*

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MVA: Ácido mevalônico

NE: Nanoemulsão

NF-κB: Fator nuclear kappa B

NFX: Nifurtimox

NK: Célula natural killer

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOX2: NADPH oxidase

O/A: Emulsão óleo em água

OE: Óleo essencial

OMS: Organização mundial da saúde

Pa: Probabilidade de ser ativo

PASS: *Prediction of Activity Spectra for Substances*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PDB: *Protein data bank*

PDI: *Polydispersity index*

PEG: Polietilenoglicol

PEO: Polietilenoglicol

Pi: Probabilidade de ser inativo

PG: Prostaglandina

PLA: Polilactídio

PPARs: *Peroxisome proliferator-activated receptors*

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

PVA: Álcool polivinílico

PVP: Polivinilpirrolidona

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RSO: Relação surfactante-óleo

SDS: Dodecilsulfato de Sódio

SFB: Soro fetal bovino

SOD: Superóxido dismutase

SUV: *Small unilamellar vesicles*

Th: Linfócito T *helper*

THA: Tripanossomíase humana africana

TGF-β: Fator de crescimento e transformação beta

TNF-α: Fator alpha de necrose tumoral

TR: Tempo de retenção

TTBS: Solução salina tamponada com tris

USFDA: *United States Food and Drug Administration*

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

As “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTN) são moléstias endêmicas em cerca de 149 países e constituídas por 17 diferentes enfermidades, as quais estão relacionadas principalmente às condições socioeconômicas adversas das regiões acometidas (WHO, 2010).

Dentre as DTN, está a doença de Chagas (Tripanossomíase americana) que constitui uma antroponose difundida no continente americano desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e endêmica em 21 países da América Latina (WHO, 2017). Apesar dos avanços obtidos em seu controle, estima-se que 75 milhões de pessoas devam estar expostas à infecção e entre 6 e 7 milhões estão infectadas pelo parasito responsável pela doença (WHO, 2017). A cada ano, estima-se que mais de 10 mil pessoas morrem devido às manifestações clínicas dessa doença e suas complicações (WHO, 2017). No Brasil, sua distribuição abrange cerca de 2.450 municípios, envolvendo uma população de mais de 25 milhões que estão sujeitas a esse risco (WHO, 2017).

A transmissão por vetores e novas infecções pelo *T. cruzi* têm diminuído em mais de 70% em todo o continente, fato este que tem ocorrido devido a um conjunto de medidas que englobam tanto a utilização de inseticidas quanto a educação voltada à saúde pública (MONCAYO, 2003). Por outro lado, está cada vez maior a notificação de casos em áreas não endêmicas como Europa, Austrália e Japão (GASCON, BERN & PINAZO, 2010). Estas regiões são os principais alvos da migração latino-americana, o que leva à internacionalização das relações humanas. Sendo assim, a transmissão vetorial é substituída por outras importantes formas de contaminação, como as transmissões orais, congênitas, por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (COURA & VIÑAS, 2010; SCHUMUNIS, 2007). Este fato também foi observado nos EUA, onde a presença de um grande número de imigrantes infectados possibilita a transmissão do parasito, provavelmente, através da transfusão sanguínea (BERN *et al.*, 2011).

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Nas áreas endêmicas, a transmissão ocorre por vetores

intradomiciliares, sendo o homem infectado, principalmente, durante ou após o repasto sanguíneo do triatomíneo, chamado popularmente de “barbeiro” (BURLEIGH & ANDREWS, 1995; CHAGAS, 1909). Embora o *Triatoma infestans*, o principal vetor da doença, esteja sob controle em muitas regiões endêmicas, vários outros triatomíneos, como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Pastronylus megistus* e outras espécies domésticas e silvestres continuam a transmitir a infecção na América Latina (URBINA & DOCAMPO, 2003).

O ciclo biológico do parasito (Figura 1) é do tipo heteroxênico e pode ser dividido em: o ciclo em seres humanos e outros mamíferos, composto por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado; e o ciclo no triatomíneo, em que a multiplicação é extracelular no inseto vetor. Dependendo da etapa no ciclo biológico, o *T. cruzi* pode se apresentar em diferentes estágios morfológicos (BURLEIGH & ANDREWS, 1995; CHAGAS, 1909).

Em síntese, o mecanismo natural da infecção pelo *T. cruzi* ocorre a partir da eliminação de formas tripomastigotas metacíclicos nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo, os quais penetram pelo local da picada ou mucosa adjacente e interagem com células do sistema mononuclear fagocitário da pele ou mucosas, dando início ao ciclo no hospedeiro vertebrado. Nesta etapa, as formas tripomastigotas se transformam em amastigotas, as quais são capazes de se multiplicar intracelularmente por divisão binária. Posteriormente, estes são diferenciados novamente em tripomastigotas, passando pelo estágio intermediário de epimastigota e são liberados da célula hospedeira para o interstício. Em seguida, caem na corrente circulatória e atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo, podendo ser destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro ou serem ingeridos por triatomíneos para cumprir seu ciclo extracelular. Durante o hematofagismo, o vetor ingere as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado infectado, promovendo o ciclo no triatomíneo. No estômago do vetor, ocorre a transformação das formas tripomastigotas em formas arredondadas (esferomastigotas) e epimastigotas. Essa última forma é a responsável pela manutenção da infecção no vetor, através de sua multiplicação no intestino médio.

Por fim, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas no reto, sendo eliminados nas fezes ou urina (CDC, 2016).

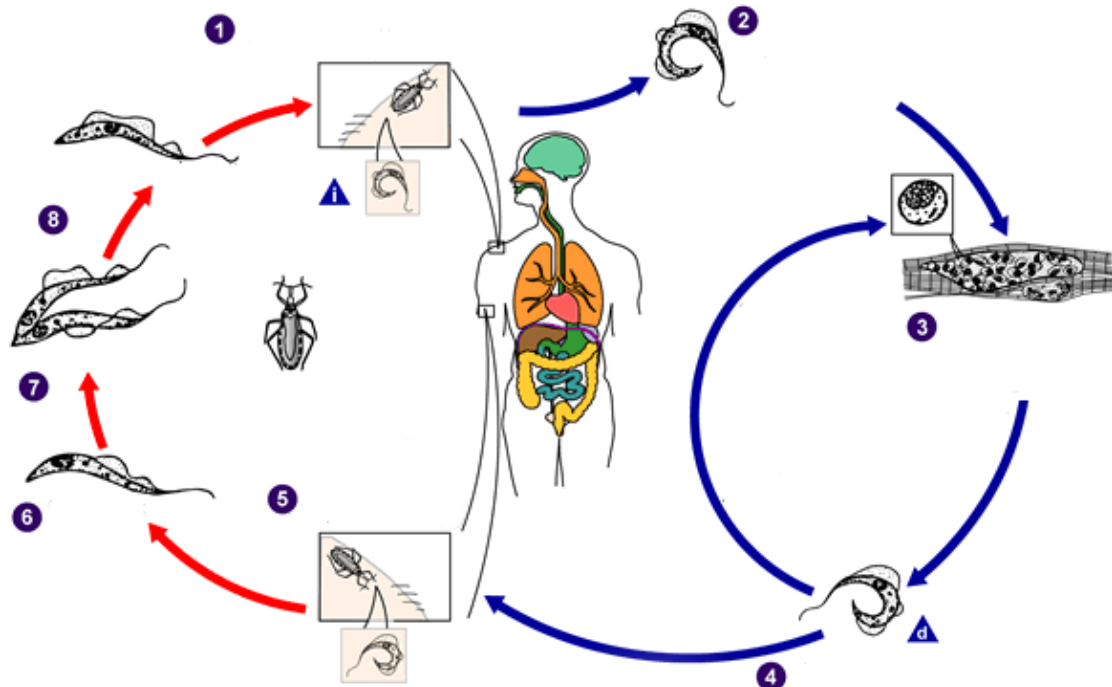


Figura 1: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas. 1- Um inseto vetor triatomíneo infectado ao alimentar-se de sangue, elimina pelas fezes, tripomastigotas próximo do local da picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através do ferimento da picada ou por mucosas intactas. 2- Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao ponto de entrada onde diferenciam-se nas formas intracelulares, os amastigotas. 3- Os amastigotas replicam-se por divisão binária. 4- Então diferenciam-se em formas tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de uma grande variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, em um ciclo infectante contínuo. 5- O triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo parasitos circulantes. 6- As formas tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7- Multiplicam-se por divisão binária. 8- No intestino posterior o parasito se diferencia na forma infectante, o tripomastigota metacíclico. “i” Estágio infeccioso. “d” Estágio diagnóstico (Fonte: Adaptado de CDC, 2016).

No início da infecção, a parasitemia é mais elevada e pode levar à morte do hospedeiro em cerca de 10% dos casos devido à encefalomielite ou insuficiência cardíaca, constituindo, assim, a fase aguda. Os sinais da infecção iniciam-se através das manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romana) ou na pele (chagoma de inoculação). Além disso, esta fase caracteriza-se por uma sintomatologia inespecífica representada por febre, edema localizado e generalizado, taquicardia, linfadenopatia, esplenomegalia, linfocitose e, raras às vezes, perturbações

neurológicas. Após o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz, inicia-se a fase crônica caracterizada por parasitemia subpatente, podendo o paciente permanecer na forma indeterminada por toda a vida. Nessa fase latente, os exames sorológicos e/ou parasitológicos são positivos, porém não há presença de sintomas e/ou sinais da doença, o eletrocardiograma apresenta-se normal, assim como, a radiografia do coração, esôfago e cólon (PRATA, 2001; BRENER, 1987; ANDRADE, 1985).

A evolução das diferentes formas clínicas da fase crônica ocorre lentamente, cerca de 10 a 30 anos após a infecção, sendo que 30% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca, enquanto 8 a 10% dos casos caracterizam-se pela forma digestiva ou mista. Observa-se, nestes casos, reativação intensa do processo inflamatório com dano destes órgãos. Na cardiopatia chagásica crônica sintomática, o fato clínico principal é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), além da presença da cardiomegalia e dos fenômenos tromboembólicos, que podem levar à morte súbita. As manifestações digestórias são representadas pela falta de coordenação motora (aperistalse, discinesia), caracterizando o megaesôfago e megacólon (PRATA, 2001; BRENER, 1987; ANDRADE, 1985).

1.2. Processo inflamatório na doença de Chagas

A patogênese da doença de Chagas é caracterizada, então, por inflamação sustentada e difusa dos órgãos afetados com citólise e fibrose associadas. Estudos revelam correlação entre a presença do parasito e os processos inflamatórios. A descoberta de que células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas para o *T. cruzi* estão consistentemente associadas a infiltrados ricos em citocinas Th1, demonstrou que a persistência do parasito é uma condição suficiente para gerar e sustentar uma resposta inflamatória Th1 em tecidos infectados, o que pode incluir fenômenos autoimunes. Sendo assim, a doença de Chagas deve ser tratada principalmente como uma condição infecciosa e não autoimune (DUTRA *et al.*, 2014; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

A manutenção do processo inflamatório, de uma forma geral, é mediada principalmente por citocinas e quimiocinas que podem estimular ou inibir a resposta imune, bem como, induzir respostas do tipo Th1 e Th2. No entanto, o tipo de mediador

inflamatório é o que mais influencia a resposta a ser gerada (D'AMBROSIO & SINIGAGLIA, 2000).

Na doença de Chagas, a ativação do sistema imune inato pode estar envolvida na resistência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a qual é caracterizada por uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (IFN- γ e TNF) (DUTRA *et al.*, 2014; CUNHA-NETO *et al.*, 2006). A estimulação da síntese de IL-12 e TNF pelos macrófagos ativa as células NK que passam a produzir IFN- γ , este, por sua vez, induz a diferenciação dos linfócitos T no fenótipo Th1, que consiste na principal população celular produtora de IFN- γ mediada por IL-18. Os macrófagos ativados pelo IFN- γ e TNF passam, então, a produzir óxido nítrico (NO) que é o principal responsável pelo controle da replicação do parasito na fase aguda da doença (MACHADO *et al.*, 2012; HOLSCHER *et al.*, 1998; ALIBERTI *et al.*, 1996; VESPA *et al.*, 1994). No entanto, citocinas reguladoras, incluindo IL-10 e TGF- β , são associadas à suscetibilidade à infecção pelo parasito devido à sua ação inibitória da ativação de macrófagos mediada por IFN- γ (HOLSCHER *et al.*, 2000; TSUNAWAKI *et al.*, 1998).

Neste contexto, a presença de mecanismos imunoregulatórios é um fator importante na patogênese da doença de Chagas, uma vez que a transição da fase aguda para a fase crônica da doença é acompanhada pelo controle da resposta inflamatória (DUTRA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2012). Sabe-se que IL-10 é produzida em pacientes crônicos e o oposto é observado no início da infecção (PASSOS *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2004). Sendo assim, a produção dessa citocina não permite a elevação dos níveis de parasitemia apesar de imunossuprimir a resposta celular, além de ser capaz de controlar o estabelecimento da inflamação. No entanto, é sugerido que a perda desse controle sobre a resposta imune inflamatória pode acarretar na evolução para a forma clínica cardíaca (PASSOS *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2014).

Além disso, em resposta à infecção, quimiocinas induzidas ou “inflamatórias” também são produzidas. CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina, CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 são tipicamente induzidas *de novo* e recrutam células efetoras, incluindo monócitos, granulócitos e células T efetoras para o local de entrada do patógeno (MACHADO *et al.*, 2012; MOSER & LOETSCHER, 2001).

Estudos demonstram também que CCL2/MCP-1 estimulado por TNF pode aumentar a resposta inflamatória por induzir a produção de IL-1 β e IL-6, produzindo altos níveis de NO (DAMAS *et al.*, 2001).

Sendo assim, o NO desempenha várias funções fisiológicas, como por exemplo, a citotoxicidade mediada por macrófagos, sendo papel importante no sistema imunológico. No entanto, esta substância é uma espécie reativa de nitrogênio e, além de sua participação na resposta inflamatória, também apresenta ação no estresse oxidativo durante o desenvolvimento da doença de Chagas.

1.3. Estresse oxidativo na doença de Chagas

Em adição às citocinas pró-inflamatórias, os pró-oxidantes também afetam a patogênese chagásica. Radicais livres são pequenas moléculas instáveis formadas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio altamente reativo devido à ausência de um elétron da sua camada mais externa, sendo comumente denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO) (BUCHLI, 2002). As ERO incluem todos os radicais do oxigênio e os principais produtores destas espécies na doença de Chagas são a NADPH oxidase (NOX2) e a mitocôndria (MACHADO *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que a inibição de NOX ou uso de sequestradores de ERO bloqueiam de forma significativa a ativação e proliferação de fagócitos e mediadores inflamatórios, uma vez que essas espécies reativas desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias (DHIMAN & GARG, 2011). Esta ação resulta, portanto, em um aumento da susceptibilidade ao *T. cruzi* e sugere que o estado redox é um fator importante na ativação do sistema imune e controle parasitário (MACHADO *et al.*, 2012).

Além disso, o organismo humano também sofre ação constante de espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios. Nas ERN estão incluídos o peroxinitrito, o radical dióxido de nitrogênio, assim como, o NO. A síntese do NO é intermediada por um grupo de enzimas genericamente denominadas de óxido nítrico sintases (NOS). A iNOS (induzível) não é expressa em condições normais, sendo produzida em uma variedade de células por meio de citocinas e/ou endotoxinas como resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa (FRANCISCO *et al.*, 2010;

MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991). No caso da doença de Chagas, esse sistema é regulado positivamente por citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF) que induzem a iNOS e o contrário pode ser observado através de citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β e a IL-10 (MOORE *et al.*, 2001; DINARELLO, 2000; VODOVOTZ, 1997).

De uma forma geral, o NO possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais. No processo infeccioso, NO e ERO são secretados por células ativadas, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (MACHADO *et al.*, 2012; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003).

Dessa forma, os organismos vivos estão continuamente expostos às espécies reativas exógenas e endógenas ou radicais que causam diferentes danos celulares. O desequilíbrio entre a taxa de formação dessas substâncias e sua degradação conduz ao estresse oxidativo e é decorrente de uma produção acelerada de espécies reativas ou da deterioração dos mecanismos envolvidos na proteção contra essas moléculas. A partir desse processo inicia-se uma série de reações originando alterações em proteínas extracelulares e modificações celulares, sendo o maior dano a peroxidação dos ácidos graxos presentes na dupla camada lipídica das células e, por conseguinte, a morte celular (ANDRADE *et al.*, 2007; VICENTINO & MENEZES, 2007)

O NO e as ERO, quando produzidos em quantidades fisiológicas, desempenham papéis críticos em processos normais de desenvolvimento e mecanismos de controle de transdução de sinais que regulam a proliferação, diferenciação e morte celular. No entanto, quando essas espécies são produzidas em excesso ou por longos períodos com o intuito de combater o parasito na doença de Chagas, elas podem também exercer efeitos tóxicos que danificam as células e tecidos, e que resultam na disfunção dos processos fisiológicos (GUPTA, WEN & GARG, 2009).

Sendo assim, o estresse oxidativo pode ocorrer no curso da infecção pelo *T. cruzi* e durante o desenvolvimento da doença e como resultado leva à destruição do tecido por secreções tóxicas do parasito, por reações imunes mediadas por citotoxicidade ou por danos secundários nas mitocôndrias (FRANCISCO *et al.*, 2010; GUPTA, WEN & GARG, 2009). Neste sentido, estudos sobre o estresse oxidativo e a

doenças de Chagas, bem como, os mecanismos relacionados ao processo inflamatório e a produção de NO e ERO se fazem necessários.

1.4. Tratamento da doença de Chagas

O histórico da busca para o tratamento da doença de Chagas inicia-se desde a descoberta da infecção pelo *T. cruzi* e permanece até os dias atuais. Alguns compostos como atoxil (arsenical), fucsina (corante de rosanilina), tártaro emético (antimonial pentavalente) e cloreto de mercúrio foram utilizados para combater o parasito até 1935. Após essa data e até meados dos anos 60 foram utilizados os derivados de quinoleínas e vários outros fármacos antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsemicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e zinco, iodeto de sódio, violeta genciana, aminopterinas, ácido para-aminosalicílico, hidrazida do ácido nicotínico, sulfonamidas, anti-histamínicos, hormônio adrenocorticotrófico e cortisona, derivados da estilomicilina, anfotericina B, derivados azólicos e mais de 30 antibióticos (COURA & DE CASTRO, 2002). Apesar das inúmeras tentativas para o descobrimento de fármacos eficazes, apenas entre as décadas de 60 e 70, foram introduzidos o nifurtimox (NFX) e o benznidazol (BZ) que, apesar de serem baseados em uma terapêutica empírica, ainda são utilizados como medicamentos de primeira escolha (URBINA, 2002).

Em 1967, a Bayer lançou o NFX com o nome de Lampit[®] e atualmente é produzido em El Salvador (SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006). No entanto, alguns países como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai suspenderam a partir da década 80 a comercialização desse medicamento, o qual apresenta efeitos adversos maiores e mais intensos, além de uma eficácia reduzida quando comparado ao BZ (BERN, 2011; COURA & DE CASTRO, 2002). O BZ foi lançado em 1972 pela Roche com o nome de Rochagan[®] no Brasil e sua tecnologia de produção foi cedida ao país, sendo fabricada, atualmente, pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) (LAFEPE, 2007; SCHOFIELD, JANNIN & SALVATELLA, 2006). Diante desse contexto, em muitos países o BZ é o único fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas e nos países não endêmicos como Espanha, França e Portugal, apesar do BZ não possuir registro, o mesmo está disponível através de fontes governamentais (GASCON, BERN & PINAZO, 2010).

Devido à natureza empírica da descoberta e desenvolvimento do BZ e NFX, estes foram sendo utilizados sem uma compreensão clara dos mecanismos de ação. Sabe-se que o primeiro possui efeitos apenas contra as formas sanguíneas do parasito, já o segundo, as formas sanguíneas e parcialmente as formas teciduais são afetadas. Sugere-se que o grupo nitro do BZ sofra uma redução a grupo amino através da ação de enzimas do tipo nitroredutases, dando origem a radicais livres intermediários bem como em metabólitos eletrofílicos, que envolve a ligação covalente de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos e afeta o metabolismo da tripanotona do *T. cruzi* (RIBEIRO *et al.*, 2010; DOCAMPO, 1990; DOCAMPO & MORENO, 1986). No caso do NFX, a ação contra o parasito é associada à produção de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio. O grupo nitro é reduzido intracelularmente a radicais nitroânion instáveis, que por sua vez, reagem para produzir metabólitos de oxigênio reduzidos altamente tóxicos como superóxido - $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (DOCAMPO & MORENO, 1986). A eficácia desse tratamento se deve ao fato do parasito ser deficiente nos mecanismos de desintoxicação desses metabólitos de oxigênio, sendo assim, mais sensível ao estresse oxidativo do que as células de vertebrados (URBINA & DOCAMPO, 2003).

O uso desses compostos no tratamento da fase aguda da doença de Chagas reduz a letalidade dos indivíduos infectados, o agravamento do quadro clínico e pode levar à cura em cerca de 65 a 80% dos pacientes. No entanto, o mesmo não é observado na fase crônica, em que apenas 37% dos casos evoluem para cura. Embora sejam incapazes de erradicar o parasito, pode-se observar nesse caso uma redução da gravidade dos processos inflamatórios associados e da deterioração da condição clínica dos pacientes, sendo recomendado, portanto, o tratamento dos pacientes crônicos a fim de minimizar a evolução da doença (URBINA, 2009).

Por outro lado, ambos os fármacos provocam efeitos colaterais indesejáveis como consequência do dano oxidativo ou redutor nos tecidos do hospedeiro. Dentre eles, anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatite alérgica estão presentes e podem levar à interrupção do tratamento. A incidência desses efeitos é variável e pode depender da idade, região geográfica e da qualidade da supervisão clínica do tratamento. Além disso, acredita-se que os metabólitos gerados pela biotransformação dos mesmos

também provocam o surgimento de efeitos secundários tóxicos ao hospedeiro, devido à natureza química e reatividade desses compostos. Com isso, a disponibilidade apenas dos fármacos nitrofuranos e nitroimidazoles no uso clínico para o tratamento da doença de Chagas permanece insatisfatória devido à toxicidade frequente e limitação de sua eficácia, particularmente na forma crônica da doença (URBINA, 2009; CASTRO, MECCA & BARTEL, 2006; URBINA & DOCAMPO, 2003; URBINA 2002).

Diante das limitações significativas da atual quimioterapia disponível, outros mecanismos eficazes vêm sendo relatados, como os inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE), candidatos ao tratamento da doença de Chagas, uma vez que bloqueiam a produção *de novo* de 24-alquilesteróis, que são essenciais para a sobrevivência do parasito e não podem ser substituídos pelo próprio colesterol do hospedeiro. Entre estes compostos, podem-se destacar os derivados de triazol que inibem a lanosterol 14- α demetilase (CYP51) do parasito e demonstraram atividade contra cepas de *T. cruzi* resistentes ao NFX e BZ. Outros IBE específicos para este parasito incluem inibidores da esqualeno sintase, lanosterol sintase (oxidoesqualeno ciclase), esqualeno epoxidase, citocromo P-450, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase, D24(25) esterol metil transferase, bem como, compostos com mecanismos duplos de ação, ou seja, inibição da biossíntese de ergosterol e geração de radicais livres. Sendo assim, as principais vantagens desses compostos em relação às terapêuticas atualmente disponíveis são maior potência e seletividade em infecções agudas e crônicas, atividade contra cepas resistentes e melhores perfis de tolerabilidade e segurança (URBINA, 2009).

Estudos revelam também que o *T. cruzi* contém uma protease de cisteína semelhante à catépsina L, denominada cruzipaina (cruzain ou gp51/57), a qual é responsável pela maior atividade proteolítica de todos os estágios do ciclo de vida do parasito (MURTA *et al.*, 1990). Aos níveis celular e bioquímico, foi demonstrado que os inibidores seletivos desta protease bloqueiam a maturação da cruzipaina e seu transporte para os lisossomas, bem como, a quebra das proteínas do hospedeiro. Com isso, estes compostos inibem a proliferação de epimastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares, assim como, cessam a metaciclo gênese *in vitro* (transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos), indicando que a

enzima realiza funções essenciais para a sobrevivência e crescimento do parasito e sua inibição garantiria uma atividade antiparasitária (URBINA & DOCAMPO, 2003; URBINA, 2002; MURTA *et al.*, 1990).

Ademais, parasitos tripanossomatídeos são deficientes na biossíntese *de novo* de purinas, sendo a hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT) uma enzima chave dessa via, uma vez que está envolvida na captura de purinas do hospedeiro. Diante dessa realidade, inibidores da xantina oxidase atuam como análogos de purina e são incorporados, através da HGPRT, no DNA do parasito, interrompendo assim a síntese de RNA e proteínas. Outros potenciais alvos quimioterápicos também foram identificados, como os inibidores das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo redox da tripanotona, a qual é única para protozoários cinetoplastídeos e atua substituindo glutathione em glutathione reduzida no sistema tiol-redox intracelular destas células. Além disso, também são objetos de estudo os inibidores da di-hidrofolato redutase, enzima que catalisa uma etapa crucial na via *de novo* para síntese de nucleotídeos de DNA do parasito e os alquil-lisofosfolipídios, que bloqueiam seletivamente a biossíntese de fosfatidilcolina em *T. cruzi* e revelaram uma boa atividade oral e baixa toxicidade. Em adição, foi relatado ainda que o pirofosfato inorgânico e outros polifosfatos de cadeia curta são os principais compostos fosfatos de alta energia em tripanossomatídeo, sendo mais abundante que o ATP. A abundância destes compostos juntamente com a presença de enzimas que utilizam o pirofosfato em *T. cruzi* sugerem que estes podem desempenhar um papel primordial na sobrevivência do parasito e a inibição do metabolismo de pirofosfato, assim como os mecanismos acima citados, demonstram abordagens promissoras no desenvolvimento de novos agentes antiparasitários (URBINA & DOCAMPO, 2003; URBINA, 2002).

A existência de diferentes mecanismos de ação é uma excelente alternativa no tratamento da doença de Chagas, visto que a eficácia terapêutica dos fármacos está diretamente relacionada à variabilidade genética do *T. cruzi*, uma vez que há cepas mais resistentes que outras. Sendo assim, sugere-se que o tratamento escolhido deve considerar o tipo de cepa predominante em cada área endêmica e a erradicação do parasito em pacientes infectados possa ser um pré-requisito para deter a evolução da

doença e evitar suas consequências irreversíveis em longo prazo (URBINA, 2002; ANDRADE, 1985).

Neste contexto, um fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deve promover a cura parasitológica para casos agudos bem como crônicos, ser eficaz em dose única ou poucas doses, ser de baixo custo, não apresentar efeitos adversos e não induzir resistência (AZEREDO *et al.*, 2014; COURA & DE CASTRO, 2002). Apesar das limitações do tratamento com o BZ, este fármaco é o de primeira escolha devido à apresentação de resultados clínicos superiores a outros candidatos a fármacos, porém não é o ideal. Realidade esta que impulsiona a busca por novos princípios ativos ou novas formulações que contornem as desvantagens apresentadas pelo BZ e sejam mais eficientes. Outra alternativa que também tem sido avaliada é a associação dos fármacos convencionalmente utilizados entre si e com os novos compostos com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica.

Posto isto, o presente trabalho foi previamente dividido em três capítulos. O primeiro teve como objetivo principal a pesquisa de novos compostos com ação anti-*T. cruzi* obtidos a partir do metabolismo secundário de plantas medicinais. Em seguida, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo BZ e/ou os novos compostos foi realizado a fim de potencializar o efeito tripanocida dos fármacos, sendo, portanto, relatado nos dois últimos capítulos. Por fim, a avaliação da atividade anti-inflamatória foi proposta como um efeito complementar de uma nova terapia para a doença de Chagas e seus resultados foram expostos no apêndice.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uso de plantas medicinais no tratamento da doença de Chagas

1.1.1. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

As plantas de uso medicinal são de extrema importância para o tratamento, cura e prevenção de diversas doenças, além de representarem a única opção terapêutica para algumas comunidades e grupos étnicos (VEIGA JR., PINTO & MACIEL, 2005; MACIEL *et al.*, 2002). A partir de um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) esta realidade pôde ser retratada e revelou que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento, principais regiões acometidas pelas DTN, dependiam dessa tradição como forma de assegurar os cuidados básicos de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Assim, o uso de plantas e derivados como medicamento acompanhou todo o processo civilizatório e ainda representa uma fonte de recursos à moderna farmacologia (VEIGA JR., PINTO & MACIEL, 2005; MACIEL *et al.*, 2002). Dentre os compostos ativos utilizados no tratamento de doenças, cerca de 121 são de origem vegetal e representam 25% dos medicamentos prescritos mundialmente. Segundo a OMS, 252 fármacos são considerados essenciais para a população e 11% destes são exclusivamente obtidos a partir de plantas, além de um número significativo de ativos sintéticos ser derivado de precursores naturais (RATES, 2001).

As plantas e os metabólitos secundários podem representar, portanto, uma fonte rica de diversidade química com um potencial extremamente alto para produzir novas terapias das DTN. No cenário mundial, apenas uma pequena porcentagem dentre as 200.000 espécies de plantas existentes foi estudada quimicamente. O Brasil é o país detentor da maior biodiversidade do planeta, assim como, de uma diversidade étnica e cultural que proporciona conhecimentos do uso tradicional de plantas medicinais e o torna referência para o desenvolvimento de pesquisas associando-as a tecnologias e terapêuticas apropriadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SIMÕES & SCHENKEL, 2002). Apesar dessa grande diversidade, das cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas no país, apenas 8% apresentam estudos quanto à presença de compostos bioativos e 1.100 espécies têm suas propriedades medicinais estudadas, ou

seja, o conhecimento científico sobre as propriedades farmacológicas dessas plantas ainda é restrito e uma parcela ainda menor foi investigada quanto à atividade antiprotozoária (GUERRA & NODARI, 2001; PRANCE, 1977). O repositório de produtos naturais derivados de vegetais merece, assim, ser investigado de forma mais intensa do que até o presente momento (SCHMIDT *et al.*, 2012b).

Como dito anteriormente, a manutenção de novos casos em regiões endêmicas e a recente disseminação da doença de Chagas em regiões não endêmicas apontam para a necessidade do desenvolvimento de fármacos eficazes contra essa doença, principalmente na sua forma crônica (AZEREDO *et al.*, 2014). Sendo assim, o interesse da comunidade científica pelo uso de agentes terapêuticos naturais no combate da Tripanosomíase vem crescendo nas últimas décadas. Fato que se justifica por serem, geralmente, considerados seguros, acessíveis e demonstrarem serem mais eficazes do que produtos farmacêuticos sintéticos em doenças crônicas (BARROS *et al.*, 2016). Dessa forma, os fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos baixos riscos de seu uso, bem como, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO *et al.*, 2008).

Outro benefício dos medicamentos de origem vegetal é o sinergismo entre os componentes bioativos. A diversidade química ampla e complexa dos constituintes contribui para a existência de diferentes mecanismos de ação, revelando ser uma estratégia para proporcionar a máxima resposta farmacológica (AMPARO, 2016). Sendo assim, a verdadeira vantagem dos produtos naturais em comparação com um conjunto de produtos químicos é que sua diversidade está focada em propriedades químicas que aparentemente representa, naturalmente, compostos com características estruturais e físico-químicas bioativas e semelhantes a drogas (SCHMIDT *et al.*, 2012a).

Em revisão realizada por Schmidt *et al.* (2012a; 2012b) foi possível observar o potencial de produtos naturais no combate as DTN, em que foram compiladas quase 900 substâncias diferentes e seus dados de atividade. Esses compostos obtidos a partir do metabolismo secundário de plantas pertencem aos mais distintos grupos, como terpenoides, lignanas, cumarinas, derivados do ácido cafeico, quinonas de várias classes estruturais, flavonoides e compostos relacionados, cromenos, benzopiranos, benzofuranos, xantonas, acetogeninas, poliacetilenos, bem como, diversos alcaloides.

Apesar da grande diferença estrutural e funcional apresentada por esses metabólitos, todas as classes, de uma forma geral, apresentaram um papel importante no combate às formas parasitárias.

Neste estudo, foi relatado também o efeito antiprotozoário para mais de 230 espécies, pertencentes, principalmente, à cerca de 70 famílias distintas, sendo mais de 30 destas avaliadas especificamente à ação tripanocida, o que confirma o potencial anti-*T. cruzi* de substâncias provenientes de plantas (SCHMIDT *et al.*, 2012a; SCHMIDT *et al.*, 2012b).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), dentre os medicamentos fitoterápicos liberados no Brasil, a espécie *Mentha crispa* (Lamiaceae) já possui registro e tem como categoria terapêutica sua ação antiparasitária (CARVALHO *et al.*, 2008). Diante do potencial de ação contra protozoários, é incomum que outras espécies ainda não tenham sido regulamentadas, o que reforça a necessidade de continuar as pesquisas dos bioativos naturais para manejo terapêutico das DTN.

Dessa forma, vários fármacos para o tratamento de doenças parasitárias já foram extraídos de plantas ou sintetizados a partir de protótipos vegetais. Portanto, o estudo de extratos e compostos com atividade biológica isolados de plantas com uso na medicina popular pode fornecer informações úteis, bem como, ser uma fonte importante para o descobrimento de novos princípios ativos e desenvolvimento de antiparasitários potentes (BORGES *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2009; SANTORO *et al.*, 2007a,b,c).

1.1.2. Análise *in silico*

O *screening* virtual (*in silico*) também tem sido utilizado como alternativa nas pesquisas com plantas de uso medicinal por ser um meio conveniente e barato para estudar interações entre estruturas químicas e potenciais aplicações. As análises *in silico* podem ser usadas para classificar compostos, a fim de priorizar e direcionar para futuros experimentos, o que facilita e reduz os custos do processo de descoberta de novos fármacos (OGUNGBE & SETZER, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O programa “*Prediction of Activity Spectra for Substances*” (PASS) é uma das ferramentas *in silico* que tem sido utilizada para prever atividades biológicas de metabólitos secundários. O PASS permite analisar vários efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e efeitos tóxicos específicos com base na estrutura da substância

com 95% de acurácia, fato que deve ser validado, posteriormente por testes *in vitro* e *in vivo* (GOEL *et al.*, 2011).

PASS *online* também possibilita previsões simultâneas baseando-se em comparações da estrutura química com compostos já conhecidamente ativos. Dentre esses compostos estão fármacos, candidatos a fármacos, compostos em processos de registro, substâncias tóxicas, fitocomponentes, dentre outros, totalizando mais de 260.000 descritores incluídos no banco de dados. Os resultados das análises são fornecidos como as probabilidades do composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) (www.pharmaexpert.ru/passonline) (AMPARO, 2016).

Neste contexto, os produtos naturais oferecem importantes oportunidades complementares na descoberta de fármacos: a) ocupam diferentes regiões de espaço químico biologicamente relevante, incluindo abundantes funcionalidades contendo oxigênio (raramente nitrogênio) e altos graus de quiralidade e complexidade; b) provaram serem fármacos eficazes; c) foram otimizados para a atividade, incluindo o transporte ativo e d) servem como estruturas para modificação semisintética para melhorar a atividade, seletividade ou biodisponibilidade. Os estudos *in silico* tornaram-se, assim, um substituto ou um complemento ao rastreio destes compostos farmacologicamente ativos, permitindo selecionar alguns compostos ou classes para alvos de fármacos de protozoários específico, neste caso, para o parasito *T. cruzi* (OGUNGBE & SETZER, 2016).

1.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produzidos através do metabolismo secundário das plantas, apresentando-se principalmente como uma mistura complexa de terpenóides cíclicos e acíclicos. Os terpenos são biossintetizados a partir do ácido mevalônico (MVA) ou do metileritritol fosfato (MEP), os quais dão origem a duas unidades importantes, pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAP), que são os precursores imediatos dessa classe. As moléculas de IPP e DMAP contêm cinco carbonos (5C) cada e a formação de unidades maiores geralmente ocorre a partir da união destas através do modelo "cabeça-cauda" (Figura 2). Com isso, os terpenos são facilmente classificados, de acordo com o número de unidades de isopreno (5C), em: hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C),

triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) e politerpenos (unidades maiores) (CASTRO *et al.*, 2010; CSEKE, *et al.*, 2006; CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000).

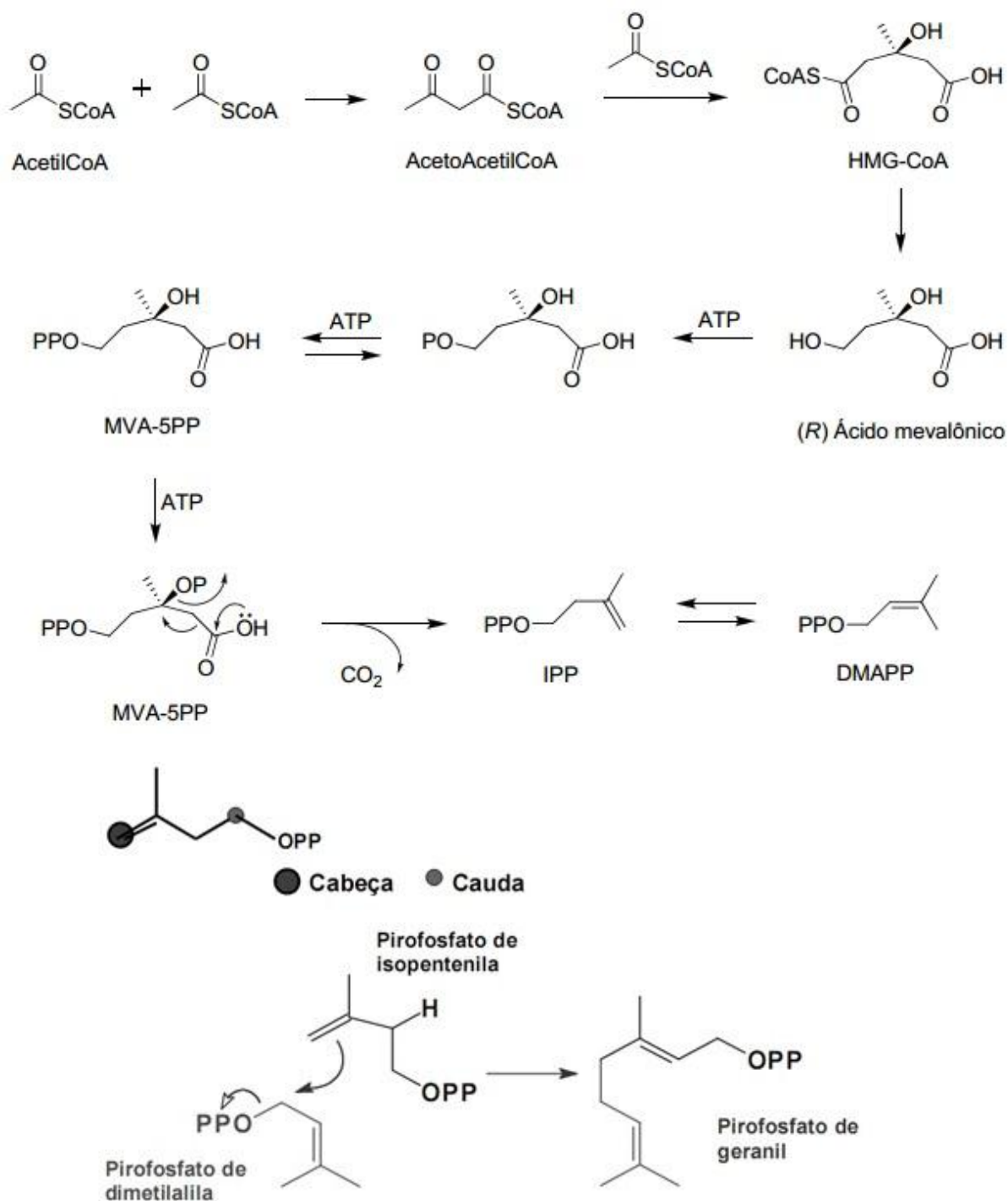


Figura 2: Formação de unidades de isopreno a partir do ácido mevalônico (MVA) e biossíntese de terpenóides a partir da ligação "cabeça-cauda" das unidades de isoprenos (Fonte: SEIBERT, 2015).

Os óleos essenciais e seus constituintes apresentam um amplo espectro de ação farmacológica, sendo usados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos, bem como, anti-helmínticos e antiprotozoários (AZEREDO *et al.*, 2014). Além de serem ativos para diversas ações biológicas, grande parte dos monoterpenos revelam baixa toxicidade para os mamíferos, sendo considerados como seguros pela *United States Food and Drug Administration* (USFDA) (CHAGAS *et al.*, 2002). Apesar do grande número de trabalhos nos quais se avaliam e comprovam algumas atividades biológicas dos óleos essenciais, poucos estudos foram realizados avaliando a atividade sobre parasitos e abordando o seu potencial citotóxico.

Não há certamente alguma regra dirigindo a escolha do extrato na busca de compostos com uma bioatividade particular. No entanto, uma vez que a maioria das moléculas semelhantes a fármacos são de polaridade média ou baixa e tamanho molecular pequeno, uma boa escolha são usualmente os óleos essenciais (SCHMIDT *et al.*, 2012a).

Estudos propõem que a atividade de óleos essenciais sobre tripanossomatídeos é devido principalmente à sua composição terpênica. Essa classe, principalmente os monoterpenos, é responsável pela característica hidrofóbica dos óleos, o que permite sua difusão através das membranas celulares, afeta vias metabólicas e organelas intracelulares do parasito (BORGES *et al.*, 2012).

Sendo assim, embora o uso de óleos essenciais para o tratamento de doenças parasitárias seja menos investigado, suas características como baixa densidade associada à sua rápida difusão através das membranas celulares como resultado da sua lipossolubilidade podem aumentar a integração dos seus componentes ativos nos parasitos, podendo, portanto, ser de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos (BARROS *et al.*, 2016).

Em uma revisão, Schmidt *et al.* (2012a) buscaram revelar o potencial antiprotozoário de produtos naturais provenientes de plantas. A discussão das várias classes desses produtos seguiu os critérios biossintéticos, sendo a primeira parte do trabalho subdividida nas principais sub-classes biogénicas de terpenos, nomeadamente, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos. Foi possível relatar a ação contra protozoários para mais de 300 compostos terpenóides, os quais, apesar de pertencerem ao mesmo grupo de metabólito secundário, apresentaram

variações quanto à eficácia. Os principais componentes monoterpênicos de óleos essenciais com atividade antiprotozoária são citral, linalol, terpinen-4-ol, timol, carvacrol, cânfora, 1,8-cineol, limoneno, α -pineno, γ -terpineno, α -felandreno e ρ -cimeno.

Os relatos anteriores comprovam, portanto, que vários óleos essenciais ou seus constituintes apresentam atividade inibitória contra protozoários tripanossomatídeos (AZEREDO *et al.*, 2014), fato este que impulsiona a análise da ação de diferentes óleos sobre o parasito *T. cruzi*.

1.3. Espécies em estudo

1.3.1. *Cymbopogon densiflorus*

A família Poaceae consiste em cerca de 700 gêneros e 12.000 espécies e é a de maior relevância para a economia humana dentre o grupo das Angiospermas. Pertencente a esta família está o gênero *Cymbopogon*, do grego *kumbe* (navio) e *pogon* (barba), referindo-se ao formato das inflorescências, o qual se constitui de espécies perenes ou raramente anuais, cespitosas, aromáticas, tolerantes ao estresse, bem como adaptadas às diversas condições climáticas e edáficas (WATSON & DALLWITZ, 1992; SOENARKO, 1977).

Este gênero é originário de regiões subtropical e tropical da África, Ásia e Austrália e compreende cerca de 180 espécies, sendo conhecido pela importância da utilização de seus óleos essenciais na culinária, na produção de perfumes, cosméticos, saneantes domissanitários e produtos farmacêuticos (AKHILA, 2010; KHANUJA *et al.*, 2005; SOENARKO, 1977).

A espécie *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf (Figura 3), conhecida popularmente como “capim-limão”, “capim-cabloco” ou “capim-santo”, foi introduzida e adaptada no Brasil no período colonial, apresentando folhas com característico cheiro de limão, lâminas foliares planas e glabras, seu colmo ereto mede em torno de 70 a 200 cm e pendulado devido à densa inflorescência (BARBOSA, 2007; WATSON & DALLWITZ, 1992; SOENARKO, 1977).



Figura 3: Exemplar da espécie *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf coletada na região de Ouro Preto/MG.

Na África, esta espécie é utilizada, popularmente, como um estimulante e estíptico. Além disso, há relatos de seu uso na medicina tradicional contra diversas doenças como reumatismo, asma, febre, resfriado, epilepsia, câimbras, cólicas, dores abdominais, tosse, bronquite, rouquidão e afecções catarrais (AKHILA, 2010; TAKAISI-KIKUNI *et al.*, 1996; MARTINS *et al.*, 1995; SOENARKO, 1977).

Os óleos essenciais obtidos a partir de espécies do gênero *Cymbopogon* compreendem, principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos, os quais garantem a capacidade de apresentar importantes atividades como antibacteriana, antifúngica, anticâncer, pesticida, repelente, anti-inflamatória, analgésica e hipoglicêmica (AKHILA, 2010). No cenário acadêmico, pesquisas do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *C. densiflorus* mostraram que o mesmo apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos (SEIBERT *et al.*, 2015; TAKAISI-KIKUNI, TSHILANDA & BABADY, 2000), no entanto, ainda não há relatos sobre a ação antiparasitária.

1.3.2. *Cymbopogon nardus*

Cymbopogon nardus (L.) Rendle, assim como a espécie anterior, pertence à família Poaceae e o gênero *Cymbopogon*. Denominada comumente como “capim-citronela”, esta espécie é originária da Índia e do Ceilão e cultivada especialmente nas

regiões tropicais e subtropicais. Os colmos dos espécimes medem aproximadamente 1 m de altura e apresentam-se eretos, glabros e lisos, sendo levemente pêndulos no ápice, além de ser uma planta perene e formadora de rizoma (Figura 4) (CASTRO *et al.*, 2010; BARBOSA, 2007; MARCO *et al.*, 2007; ROCHA, MING & MARQUES, 2000).



Figura 4: Exemplar da espécie *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.

Conhecida pela importância econômica na obtenção de óleo essencial a partir de suas folhas, até 1989 era o quarto óleo mais comercializado no Brasil (MARCO *et al.*, 2007; ROCHA, MING & MARQUES, 2000). O uso popular desta espécie baseia-se na sua ação como calmante, digestiva, repelente de insetos, principalmente em regiões litorâneas e populações ribeirinhas e no controle de fungos e ácaros (PEREIRA, 2009; ROCHA, MING & MARQUES, 2000).

A constituição química do óleo extraído de suas folhas é rica em monoterpenos oxigenados, como citronelal, geraniol e citronelol (MATTOS, 2000). O citronelal é utilizado para a síntese de vitamina A e de importantes compostos químicos denominados iononas (PERINI *et al.*, 2011). A presença deste composto proporciona ao óleo de citronela um aroma característico de limão e a capacidade de apresentar inúmeras atividades, como antimicrobiana, alelopática, antioxidante, herbicida, bem como, inseticida e repelente (TOMAZ *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2012; BRITO *et*

al., 2012a; CAVALCANTI, ALMEIDA & PADILHA, 2011a,b; CHAGAS *et al.*, 2002).

No caso do geraniol, este é utilizado em grande escala na fabricação de perfumes e como aromatizante de alimentos (BARNARD & XUE, 2004). Dentre suas propriedades farmacológicas pode-se citar ação inseticida e repelente, efeito anti-helmíntico, antimicrobiano, antioxidante e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, contra leucemia, hepatoma e células de melanoma (KHALLAAYPOUNE *et al.*, 2009; TIWARI & KAKKAR, 2009; HIERRO, 2004; CARNESECHI *et al.*, 2001).

Estudos recentes têm revelado, portanto, diversas atividades biológicas úteis dos óleos essenciais, no entanto, ainda não existem muitos relatos da ação tripanocida de ambas as espécies, *C. densiflorus* e *C. nardus*. Sendo assim, características como a fácil disponibilidade, propriedades olfativas agradáveis e baixa toxicidade dos óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*, bem como, a possibilidade de apresentar efeito antiparasitário tornam-as candidatas promissoras para o tratamento da doença de Chagas.

1.3.3. *Melaleuca leucadendron*

A família Myrtaceae ocorre tanto em regiões tropicais quanto subtropicais e pode ser dividida em duas subfamílias: Myrtoidea, a qual tem ampla ocorrência na América tropical e Leptospermoideae, que está presente, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia. Espécies desta família são empregadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos, doenças infecciosas, sendo que sua ação pode estar relacionada às propriedades adstringentes da planta. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos (VIEIRA *et al.*, 2004).

O gênero *Melaleuca* pertence à subfamília Leptospermoideae e inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico, conhecidas como árvores do chá e ricas em óleos voláteis. Estas essências são utilizadas na manufatura de cosméticos, germicidas e agentes antissépticos, bem como carminativos e para o tratamento de várias doenças (FARAG *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004).

A espécie *Melaleuca leucadredon* (L.) L. (Figura 5) é popularmente denominada como cajuputi e caracteriza-se por ser uma planta lenhosa com distribuição na Austrália e sudoeste da Ásia, sendo nativa de regiões pantanosas e florestas tropicais (TANAKA *et al.*, 2011).



Figura 5: Exemplar da espécie *Melaleuca leucadendron* (L.) L., coletada na região de Ouro Preto/MG.

Esta árvore é muito versátil e se desenvolve em uma grande variedade de ambientes, como solos pobres em nutrientes ou degradados, áreas úmidas ou parcialmente inundadas, além de ser tolerante á solos ácidos e água salobra. Sendo assim, é uma espécie de fácil adaptação e pode ser utilizada para inúmeros fins: obtenção de óleo essencial com atividade biológica, lenha, madeira de construção civil e carvão vegetal (BRINKMAN & XUAN, 1991).

Portanto, a espécie vegetal *M. leucadendron* foi selecionada para o estudo devido às inúmeras aplicações dos óleos essenciais deste gênero, assim como, pela ausência de relatos sobre seu uso contra infecções causadas por parasitos, o que a torna, dessa forma, alvo para pesquisas de novos antiparasitários provenientes de produtos naturais.

1.3.4. *Microlícia graveolens*

A família Melastomataceae tem distribuição tropical e possui aproximadamente 4.570 espécies e cerca de 170 gêneros. No Brasil, esta é a sexta maior família de

Angiospermas com 68 gêneros e mais de 1.500 espécies que se distribuem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, estando presente em praticamente todos os tipos de vegetação com um número variável de espécies (CASSIANO *et al.*, 2010).

Esta família pode ser dividida em duas subfamílias: Kibessioideae Naudin e Melastomatoideae Naudin, as quais apresentam uma e oito tribos, respectivamente. Neste último caso, pode-se encontrar a Microlicieae que possui ocorrência restrita à América do Sul e compreende 6 gêneros e cerca de 250 espécies (FRITSCH *et al.*, 2004; RENNER, 2004).

O gênero *Microlicia* (*micro* = pequeno, *elikia* = estatura) é nativo no Brasil e apresenta aproximadamente 170 espécies, caracterizando-se por apresentar hipanto globoso, cálice com cinco lacínias persistentes, cinco pétalas, dez estames, anteras oblongas, obliquamente deiscentes por poro simples, e conectivo longamente filiforme com base calcarada (TOUDAHL *et al.*, 2012; ROMERO, 2003). Os estudos sobre as características anatômicas deste gênero são escassos e o polimorfismo existente entre as espécies é muito comum, sendo esta a razão das espécies serem de difícil identificação (WURDACK, 1973).

No Brasil, as espécies de *Microlicia* ocupam, preferencialmente, os campos rupestres e adjacências, campos de altitude e campos limpos associados a cerrado formando, na maioria das vezes, grandes populações. Além disso, apresentam grande diversidade de hábitos, desde herbáceo até arbustivo, ocorrendo muitas espécies arbóreas, e mais raramente trepadeiras e epífitas, que permitem a ocupação de ambientes distintos e diversificados (CASSIANO *et al.*, 2010; ROMERO, 2003).

Microlicia graveolens DC (Figura 6) tem o nome popular de "roxinha" e apresenta nos ramos, folhas, hipanto e lacínias do cálice, tricomas glandulares pedicelados, com glândulas translúcidas e amarelas. Esta espécie também apresenta o indumento denso, constituído por tricomas glandulares sésseis, e as glândulas com um forte odor de terebentina. O epíteto específico refere-se à margem crenulada e ciliada das folhas, formadas de tricomas glandulares pedicelados longos (ROMERO, 2010).



Figura 6: Exemplar da espécie *Microlicia graveolens* DC, coletada na região de Ouro Preto/MG.

Esta planta é principalmente utilizada para ornamentação, mas devido ao odor de terebentina, há relatos de seu uso para tratamentos tópicos de algumas doenças como dermatites e micoses. Entretanto, poucos estudos etnomedicinais, fitoquímicos e farmacológicos existem sobre essa importante família, o que justifica a pesquisa, pela primeira vez, do potencial anti-*T. cruzi* apresentado por esta espécie.

Em síntese, há um interesse crescente em encontrar fármacos alternativos provenientes de plantas para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas em uma tentativa de substituir ou complementar aqueles em uso corrente. Atualmente, os fitoquímicos estão sendo sintetizados ou modificados quimicamente para garantir maior potência contra esses patógenos humanos. Como pré-requisito para a identificação e isolamento de componentes ativos a partir de plantas, o conhecimento das suas atividades biológicas é requerido, sendo, portanto, alvo de estudo do presente capítulo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar quimicamente diferentes óleos essenciais obtidos a partir das espécies *C. densiflorus*, *C. nardus*, *M. leucadendron* e *M. graveolens*, assim como, avaliar a atividade anti-*T. cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar os materiais botânicos e obter os óleos essenciais a partir das folhas e flores de *C. densiflorus* e *M. leucadendron* e somente das folhas de *C. nardus* e *M. graveolens*.
- Caracterizar a composição química dos óleos essenciais obtidos através de técnica cromatográfica associada à espectrometria de massas.
- Analisar *in silico* o potencial para efeitos e mecanismos de ação anti-*T. cruzi* dos principais constituintes de cada óleo essencial.
- Avaliar *in vitro* a atividade anti-*T. cruzi* dos óleos essenciais.
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade destes óleos.
- Avaliar a ação do óleo mais ativo sobre a membrana plasmática do *T. cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material botânico e obtenção dos óleos essenciais

Neste estudo foram utilizadas quatro diferentes espécies para obtenção de óleos essenciais: *C. densiflorus*, *C. nardus*, *M. leucadendron* e *M. graveolens*.

Folhas e flores de *C. densiflorus* e *M. leucadendron* foram coletadas no bairro Bauxita, Campus Morro do Cruzeiro/UFOP (20°23'51"S; 43°30'40"W), onde ocorrem. Já a coleta das folhas de *C. nardus* foi realizada no bairro Vila dos Engenheiros (20°24'06"S, 43°30'55"W). Por fim, foram coletadas folhas de *M. graveolens* na região do Morro Santana (20°22'36"S; 43°29'20"W). Todas as localidades citadas anteriormente encontram-se no município de Ouro Preto/MG.

As exsiccatas de *C. densiflorus*, *C. nardus*, *M. leucadendron* e *M. graveolens* foram depositadas no Herbário Prof. José Badini do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente (DEBIO) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB/UFOP), sob o número OUPR 28122, OUPR 29756, OUPR 29495 e OUPR 29335, respectivamente. Além disso, foi realizado o cadastro destas espécies no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), obtendo os códigos AC902F3 para *Cymbopogon*, A2CC35F para *Melaleuca* e A4AA3E9 para *Microlicia*.

O processo de extração dos óleos essenciais utilizado foi a hidrodestilação das partes aéreas, folhas ou flores, através do hidrodestilador (Linax) por um período de aproximadamente 4 horas. Após a coleta de cada espécie, o material botânico de interesse foi rasurado a fim de se reduzir o seu tamanho e obter uma maior superfície de contato e, em seguida, foram pesados e acondicionados em um compartimento denominado dorna. No hidrodestilador, o vapor de água ao passar pelo material vegetal extrai os compostos voláteis da planta. O vapor condensa ao chegar ao sistema de condensação, sendo possível coletar o óleo extraído no sistema de decantação. Os óleos essenciais, assim que obtidos, foram coletados e centrifugados para que houvesse uma separação minuciosa da água através da diferença de densidade e imiscibilidade das fases. Os óleos foram então recolhidos e pesados para cálculo do rendimento. O acondicionamento foi realizado em vidro âmbar, ao abrigo de luz e mantido a 4° C em refrigerador (SEIBERT *et al.*, 2019).

3.2. Caracterização da composição química dos óleos essenciais

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Shimadzu, modelo QP2010 com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) na Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (DDTF/DPD – FUNED) pela Prof^ª. Dr^ª. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues.

As amostras foram preparadas a partir de 20 µL de cada óleo essencial e 980 µL de acetato de etila e injetadas sob as seguintes condições de uso: temperatura inicial da coluna: 60 °C, Split 1:50, pressão: 79,7 kPa, temperatura do injetor: 250 °C; gás de arraste: Hélio; temperatura inicial do forno: 60 °C, aumentando até 240 °C na taxa de 3 °C/min, com tempo total de análise de 60 minutos por uma velocidade linear de 41,6 cm/s, temperatura na fonte: 250 °C, temperatura na interface: 290 °C, tempo de *cut off*: 3,8 minutos, *scan* de 4-60 minutos e velocidade de *scan* de 1666 e faixa de m/z 20-500. O banco de dados utilizado foi o *Wiley Mass Spectral Database* (SEIBERT *et al.*, 2019).

Hidrocarbonetos de 9 a 25 carbonos foram utilizados como padrão e, em seguida, realizou-se o cálculo do índice de Kovats (IK) de acordo com a fórmula abaixo:

$$IK = 100 \times \{n + (N - n)[(tr \text{ amostra} - tr n)/(tr N - tr n)]\} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, IK é o índice de Kovats, n é o número de átomos de carbonos no n-alcano menor, N é o número de átomos de carbonos no n-alcano maior e tr é o tempo de retenção.

A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massa e por comparação com espectros de massa de banco de dados, com dados da literatura e pelo índice de Kovats (ADAMS, 1989).

3.3. Avaliação *in silico* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os compostos majoritários identificados por meio da CG-EM de cada óleo essencial obtido a partir de folhas e/ou flores das espécies *C. densiflorus*, *C. nardus*, *M. leucadendron* e *M. graveolens* foram analisados *in silico* utilizando PASS online

(*Prediction Activity Spectra of Substances*), com auxílio da Msc. Tatiane Roquete Amparo. Os resultados das análises por PASS *online* são fornecidos como probabilidade do composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) (www.pharmaexpert.ru/passonline) (AMPARO, 2016).

Visando avaliar o potencial para a atividade anti-*T. cruzi* dos constituintes majoritários de cada óleo essencial, foram analisados os resultados de Pa e Pi para os efeitos biológicos: antiparasitário (1); antiprotozoário (2); antiprotozoário (*Trypanosoma*) (3) e potencializador da atividade antiparasitária (4);

Também foram analisados os resultados relacionados aos mecanismos de ação com potencial anti-*T. cruzi* relatados anteriormente: inibição da lanosterol 14- α demetilase (5); inibição do CYP51 (6); inibição da esqualeno epoxidase (7); inibição da tripanotiona disulfetoreductase (8); inibição da proteína dissulfeto redutase (Glutathione) (9); inibição da glutathione redutase (10) e inibição da biossíntese de purinas (11).

Os resultados das análises foram expressos pela diferença (Pa-Pi) e foram classificados como: Pa-Pi < 0,2: baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: moderado potencial; Pa-Pi \geq 0,5: alto potencial.

3.4. Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

*3.4.1. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi**

Considerando os muitos problemas que surgem na busca por medicamentos contra a doença de Chagas, o estabelecimento de protocolos padronizados de triagem e de um painel com etapas e portas de decisão para avaliar a eficácia e seletividade de um composto, bem como, os critérios mínimos para a transição de estudos *in vitro* aos ensaios pré-clínicos foi o principal objetivo de Romanha *et al.* (2010). Dessa forma, os experimentos foram realizados conforme protocolo descrito por este modelo, no âmbito da Plataforma de Ensaios Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-*Trypanosoma cruzi* (PlaBio Tc) do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) sob supervisão do Dr. Policarpo Ademar Sales Junior.

Para manutenção das células e das cepas para posterior plaqueamento, inicialmente culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo foram semeadas em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2mM de glutamina,

em garrafas de cultivo celular e, então, incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após um período de aproximadamente 24 horas, as culturas foram infectadas com formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Tulahuen transformada para expressar o gene da β-galactosidase (BUCKNER *et al.*, 1996), 20 parasitos por célula. Os parasitos que não penetraram nas células foram retirados por lavagem após 24 horas e a cultura foi incubada novamente.

Para o teste da atividade anti-*T. cruzi* uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células L929 por poço em 80 μL de RPMI com vermelho de fenol suplementado e a placa foi incubada *overnight* em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram infectadas com 40.000 tripomastigotas por poço, diluídos em 20 μL de RPMI com vermelho de fenol suplementado e a placa foi incubada por 2 horas. Os parasitos que não penetraram foram, então, retirados por substituição com 200 μL por poço de RPMI sem vermelho de fenol e suplementado. A placa foi novamente incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas para o estabelecimento da infecção.

Após esse período, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos para determinação da CI₅₀. Para isto, foi preparada uma solução estoque de cada óleo essencial em meio RPMI sem vermelho de fenol e suplementado com concentração equivalente a 10 mg/mL. Em seguida, através da diluição seriada 1:2 em meio foram obtidas as demais concentrações, as quais variaram de 5000 a 37 μg/mL. Em quadruplicata, foram adicionados 200 μL de cada concentração dos óleos essenciais sobre as células infectadas. Adicionalmente, o controle negativo foi obtido através da adição de 20 μL de solução de DMSO 10% e 180 μL de meio (DMSO 1%), já o controle positivo foi composto por 20 μL de solução de BZ 10 μg/mL e 180 μL de meio (BZ 1 μg/mL). Por fim, foi adicionado somente 200 μL de meio de cultura sem adição de tratamento em células não infectadas por parasitos para obtenção do controle de viabilidade celular e em células infectadas pelo parasito para o controle da viabilidade da infecção. A placa foi incubada nas mesmas condições por 96 horas.

Posteriormente, foram adicionados 50 μL por poço do substrato CPRG (*Chlorophenol red beta-D-galactopyranoside*) 500 μM com nonidet p40 0,5% e após 16 a 20 horas da adição do substrato foi realizada a leitura da placa, em leitor de microplacas com filtro de 570 nm. A análise dos resultados foi realizada considerando a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida promovida pelos óleos essenciais

testados, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de tratamento através do cálculo da CI_{50} , ou seja, a concentração que induz a morte de 50% dos parasitos. Neste caso, as leituras da absorbância do controle de viabilidade celular (células L929 sem tratamento) e viabilidade da infecção (células L929 infectadas e sem tratamento) foram utilizadas para construção da equação da reta ($y = -0,021x + 2,565$; $R^2 = 1$) e, posteriormente, foi realizado o cálculo da atividade dos óleos essenciais.

3.4.2. Citotoxicidade

Na avaliação *in vitro* da citotoxicidade, uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células L929 em 200 μ L por poço de RPMI com vermelho de fenol suplementado e incubada em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 72 horas. Após incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 μ L das soluções dos óleos essenciais nas mesmas concentrações do teste anterior. Controle com células não tratadas foi utilizado em paralelo.

Em seguida, a placa foi incubada em estufa nas mesmas condições por 96 horas. Foram, então, adicionados 20 μ L de alamarBlue™ (Invitrogen) por poço, a placa incubada por 4 a 6 horas e a leitura realizada a 570 e 600 nm (ROMANHA *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{(117,216)(Abs_{570} \text{ CT}) - (80,586)(Abs_{600} \text{ CT})}{(117,216)(Abs_{570} \text{ CNT}) - (80,586)(Abs_{600} \text{ CNT})} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Finalmente, a curva de porcentagem da viabilidade celular pela concentração foi obtida e os resultados foram expressos a partir do cálculo da CI_{50} através da equação da reta, ou seja, a concentração necessária para inibir 50% das células viáveis após o equilíbrio da reação.

Uma vez que o índice de seletividade (IS) tem sido utilizado para recomendar ensaios *in vivo* subsequentes, este valor foi calculado através da razão de citotoxicidade: atividade antiparasitária (CI_{50} sobre célula hospedeira: CI_{50} sobre o parasito).

3.5. Teste de permeabilidade de membrana

3.5.1. Citometria de fluxo

Com o intuito de investigar o mecanismo de ação do óleo essencial mais ativo sobre o parasito *T. cruzi*, foi realizado o teste de permeabilidade de membrana através do iodeto de propídio (CHOPRA *et al.*, 2015). Em placa de 96 poços foram adicionados 8×10^4 formas tripomastigotas do parasito diluídos em 100 μL de meio de cultura RPMI com vermelho de fenol e suplementado. Em seguida, foi adicionado 100 μL de óleo essencial a fim de obtê-lo a partir da diluição seriada 1:2 nas concentrações finais de 240 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Esse volume foi substituído por apenas meio de cultura para a obtenção do controle negativo. A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 .

Após esse período, a amostra de cada poço foi transferida para tubo de citometria e 2 mL de PBS foram adicionados. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As amostras foram, então, ressuspendidas em 100 μL de PBS e adicionou-se 1 μL de iodeto de propídio (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Posteriormente, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 30 minutos para as aquisições em citômetro de fluxo a partir do canal FL2 (BD FACS Calibur - BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram obtidos em triplicata e analisados utilizando o software *FlowJo* e os gráficos obtidos através do software *GraphPad Prism 5.0*.

3.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Para essa análise foi selecionada uma das concentrações de óleo essencial que apresentou diferença estatística em relação ao controle com as células não expostas ao tratamento no teste de permeabilidade de membrana, a fim de visualizar o efeito na membrana celular do parasito. Para isso, 8×10^6 formas tripomastigotas do parasito diluído em 500 μL de meio de cultura RPMI com vermelho de fenol e suplementado foram adicionados em eppendorf. Em seguida, adicionou-se 500 μL do óleo essencial, obtendo-o na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. Esse volume foi substituído por meio de cultura para obtenção do controle negativo. As amostras foram, então, incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 .

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, 1 mL de uma solução de PBS 0,1M pH 7,3 foi adicionado aos tubos e centrifugados novamente. Essa etapa foi repetida três vezes. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de fixador glutaraldeído a 3% em PBS 0,1M pH 7,3 e as amostras armazenadas por 6 a 8 horas em geladeira, sendo centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Por fim, descartou-se o sobrenadante e a amostra foi lavada mais uma vez com a solução de PBS e mantida em 1 mL dessa solução sob refrigeração até análise.

Para a análise no microscópio eletrônico de transmissão (MET), as amostras foram incubadas por 90 minutos em tetróxido de ósmio a 1%, serialmente desidratadas em etanol e embebidas em resina epóxi. Cortes finos foram obtidos e corados com 2% de acetato de uranilo e 2% de citrato de chumbo (MARTINEZ *et al.*, 2009). Em seguida, as amostras foram observadas em MET (Tecnai G2-12 - SpiriBiotwin FEI) operando a 120 kV no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.6. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram representados pelas médias \pm desvio padrão. A comparação entre os controles e as amostras foi realizada a partir do teste One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$, através do programa *GraphPad Prism 5.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Material botânico e obtenção dos óleos essenciais

A tabela 1 apresenta o número das exsicatas, o período de coleta, assim como, o rendimento do óleo essencial obtido para cada espécie.

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron* e *Microlicia graveolens* de acordo com o período da coleta.

Material botânico	Número da exsicata	Período da coleta	Rendimento (%)
Folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	OUPR 28122	Março/2015	0,114
Flores de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	OUPR 28122	Julho/2015	1,243
Folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>	OUPR 29756	Maior/2015	1,093
Folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	OUPR 29495	Agosto/2014	0,293
Flores de <i>Melaleuca leucadendron</i>	OUPR 29495	Março/2015	0,150
Folhas de <i>Microlicia graveolens</i>	OUPR 29335	Junho/2015	1,928

O rendimento do óleo essencial extraído a partir das folhas e flores de *C. densiflorus* foi em torno de 0,1% e 1,2%, respectivamente (Tabela 1). De acordo com as características organolépticas, os óleos apresentaram-se como um líquido amarelado para folhas e um pouco mais claro no caso das flores, viscosos e com forte odor característico de limão.

Em um estudo da variação do rendimento do óleo das folhas desta espécie de acordo com a sazonalidade realizado por Seibert *et al.* (2019), foi encontrado um valor de 0,116% para o mesmo período de coleta, resultados estes que se equivalem, uma vez que a obtenção do material botânico ocorreu na mesma região. Além disso, neste trabalho foi indicada que a quantidade de óleo obtida dobrou nos meses com maiores proporções de chuvas (novembro a março) quando comparada com o período de estiagem (maio a setembro). Este fato pode ser justificado devido à contribuição das precipitações para o desenvolvimento vegetativo superior da espécie, em que o mesmo não pode ser observado na época de seca, visto que seu crescimento é limitado (MARQUES & OLIVEIRA, 2004).

No entanto, rendimentos para folhas marcadamente superiores, 1,7% e 1%, foram encontrados por Chisowa (1997) em Zâmbia e Takaisi-Kikuni *et al.* (2000) no Congo. Visto que o metabolismo vegetal pode ser alterado devido a variações do tempo e espaço e como ambas as localidades situam-se na África, continente com características ambientais bem distintas daquelas do nosso estudo, pode ser justificada a

diferença encontrada no rendimento do óleo essencial. O mesmo também pode ser dito sobre o teor de 8,3% obtido através das flores por Chisowa (1997), o que equivale a cerca de sete vezes mais do que aquela observada no nosso estudo.

De forma análoga, Barbosa (2007) encontrou uma média de rendimento igual a 0,45% para duas coletas na região de Goiás, valor relativamente alto quando comparado ao presente trabalho, visto que essas coletas ocorreram entre os meses de junho a setembro, característico de estiagem. No entanto, a obtenção do óleo ocorreu após o processo de moagem das folhas, o que pode ter contribuído para o aumento desta proporção, uma vez que o uso de pó aumenta a superfície de contato e torna o processo de destilação mais eficiente.

Assim como a espécie anterior, o óleo essencial de *C. nardus*, revelou-se como um líquido claro e de odor significativamente cítrico. Essas características são pertinentes aos membros do gênero *Cymbopogon* devido à presença majoritariamente de monoterpenos, os quais são incolores, lipofílicos, voláteis e responsáveis pelos odores característicos de aromas de muitas plantas (CASTRO *et al.*, 2010; GANJEWALA, 2009).

Em relação ao rendimento do óleo de *C. nardus*, foi observado um valor de quase 1,1% (Tabela 1), número bem superior quando comparamos com as folhas de *C. densiflorus*. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero e as coletas ocorrerem em regiões próximas, o teor destes óleos foi marcadamente variado entre as espécies, uma vez que também sofre influência pelas condições genéticas de cada vegetal (GANJEWALA, 2009).

Além disso, a produção dos metabólitos secundários é uma resultante química da interação das plantas e o ambiente onde ocorre, o que pode justificar a diferença de rendimento (0,6%) encontrada para três exemplares diferentes de *C. nardus* coletados na Índia (KHANUJA *et al.*, 2005). O mesmo foi observado por Barbosa (2007), o qual obteve um rendimento de 0,5% para duas coletas em localidades distintas, Goiás e Distrito Federal, bem como, por Toledo *et al.* (2016) com rendimento de 0,7% em São Paulo. Por outro lado, uma proporção superior (3%) foi obtida por Wei e Wee (2012) na extração do óleo a partir de coletas realizadas na Malásia e dado equivalente foi demonstrado por Kandimalla *et al.* (2016) na Índia.

No entanto, um teor de óleo de 1,12% para esta espécie foi encontrado por Hsu *et al.* (2013) em Taiwan e apesar da distância dos locais de coleta, esse resultado equivale ao nosso estudo, assim como, o relatado por Millezi *et al.* (2014) equivalente a 1,2% a partir de amostras coletadas em Lavras/MG e 1,15% revelado por Castro *et al.* (2007) no estado do Tocantins. Por fim, o cultivo de *C. nardus* nas condições edafoclimáticas desta última região, proporcionou um rendimento de óleo variando entre 1,10 a 0,65% para cinco coletas diferentes, o que confirma a dependência do teor obtido com a variação das condições ambientais (CASTRO *et al.*, 2010).

Além desses fatores, o método de obtenção destes compostos voláteis também pode influenciar no rendimento alcançado, o que pôde ser comprovado pelo estudo feito por Silva *et al.* (2011), que ao utilizar diferentes valores de pressões e temperaturas na extração com gás carbônico (CO₂) supercrítico encontrou teores de óleo com intervalos entre 0,1 a 2,2%. Em contrapartida, apesar das condições do solo ser outro fator determinante, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de rendimento deste óleo essencial para plantas cultivadas com distintas doses de adubo orgânico (VELOSO *et al.*, 2012).

Na tabela 1 foi possível observar também que a espécie *M. leucadendron* revelou um rendimento para o óleo essencial das folhas e flores de aproximadamente 0,3 e 0,15%, respectivamente, sendo ambos caracterizados por uma coloração límpida, viscosa e de odor floral. Fall *et al.* (2017) ao extrair este mesmo óleo encontrou uma aparência verde clara e um teor de 1,28% para folhas coletadas no Senegal, valor que destoa devido principalmente as diferenças ambientais das localidades onde a espécie foi cultivada. O mesmo pode ser dito para o estudo feito por Farag *et al.* (2004) que proporcionou a obtenção de níveis de óleo de folhas de *M. leucadendron* que variaram de 1,2% a 1,6% para diferentes estações de coletas na região do Cairo. Embora esta diferença tenha sido relativamente baixa e se equivalha ao resultado anterior, de uma forma geral, estes valores foram cerca de quatro vezes mais rentáveis do que no presente trabalho.

Sabe-se, portanto, que as espécies vegetais respondem às variações climáticas ao longo das estações do ano, o que propiciou que Quintão (2013) encontrasse uma alteração de rendimento para o óleo das folhas desta espécie entre 4% e 2%, respectivamente, para o período de seca (junho) e chuvoso (janeiro) em Ouro Preto

(MG). Apesar de que a região da coleta tenha sido a mesma, esses valores foram significativamente superiores ao do nosso estudo, bem como, não retratam de forma real os fatores ambientais apresentados por essa região, visto que o esperado seria o maior desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, rendimentos mais elevados para o segundo período, onde a chuva auxiliaria nesse processo. Sugere-se então que essa diferença tenha ocorrido devido a fatores hereditários (composição genética) ou ontogênicos (estágio de desenvolvimento) presentes no material botânico utilizado e que podem influenciar na quantidade de óleo a ser obtido (BARBOSA, 2007; GOBBONETO & LOPES, 2007).

Já em relação à obtenção do óleo das flores de *M. leucadendron*, nenhum artigo foi encontrado para comparação dos resultados, o que reforça o interesse no estudo deste material botânico.

Por fim, o óleo essencial de *M. graveolens* quando extraído apresentou-se como um líquido viscoso, incolor a amarelado e de odor agradável e conforme Tabela 1, o rendimento obtido foi próximo a 2%, quando coletada em junho. Toudahl *et al.* (2012) também caracterizaram este óleo com um cheiro leve e agradável que poderia ter valor comercial como essência de cosméticos ou produtos de limpeza, obtendo-o com rendimento de 4,8%, porém para o mês de outubro na mesma região. Dado que seria previsto, uma vez que este mês seria o início do período chuvoso e proporcionaria maior teor de óleo.

No entanto, nosso resultado está em desacordo com o encontrado por Quintão (2013), o qual ao fazer duas coletas, em dezembro e agosto, obteve um rendimento de 3,5% e 6%, respectivamente. Esta realidade não condiz com as características climáticas da região de Ouro Preto onde se encontra a espécie, visto que foi obtido o maior teor de óleo no período de estiagem, quando na verdade sua produção é aumentada nos meses com maiores proporções de chuvas (novembro a março). Com isso, é sugerido que essa variação ocorreu devido ao menor teor de umidade nas folhas no tempo seco, obtendo-se assim um maior rendimento quando comparado à massa de material botânico utilizado para a extração do óleo.

De uma forma geral, pode-se observar que os rendimentos de óleos essenciais, independente da espécie, oscilam significativamente, isto porque os mesmos são obtidos a partir do metabolismo secundário das plantas, o qual sofre influência constante de

diversos fatores bióticos e abióticos. Dentre os principais fatores físico-químicos podem ser evidenciados os diferentes níveis sazonais e diários, temperatura, índice pluviométrico, altitude, composição atmosférica, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica e nutricional, ou seja, características do ambiente onde a planta se desenvolve. Em adição, o metabolismo vegetal também poder ser alterado devido a elementos biológicos como ataque de patógenos, espécie, composição genética, ontogenia (estágio de desenvolvimento), bem como os diferentes órgãos vegetais onde são produzidos os metabólitos (CASTRO *et al.*, 2010; GOBBO-NETO & LOPES, 2007; BORELLA *et al.*, 2006; BULBOVAS *et al.*, 2005; MARQUES & OLIVEIRA, 2004; KÖNIG *et al.*, 2002).

4.2. Caracterização da composição química dos óleos essenciais

Os dados contidos nas tabelas 2 a 7 informam a caracterização da composição química de cada óleo essencial obtido de acordo com a espécie e a parte utilizada.

Na caracterização do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* foram identificadas mais de 90% das substâncias presentes, sendo principalmente monoterpenos oxigenados (Tabela 2). Análises dos cromatogramas revelaram como componentes majoritários *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (Figura 7).

Tabela 2: Caracterização química do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1*	6,789	1005,28	-	-	0,55
2	7,383	1022,53	1024	<i>p</i> -cimeno	1,25
3	7,536	1026,98	1029	Limoneno	1,04
4*	8,959	1068,31	-	-	0,18
5	9,684	1089,36	1085	meta-cimeno	0,27
6	10,920	1121,69	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	13,73
7*	11,000	1123,68	-	-	0,07
8	11,486	1135,80	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	9,72
9	12,234	1154,45	1158	Óxido nerol	0,39
10*	12,732	1166,86	-	-	0,97
11*	13,310	1181,27	-	-	0,16
12	13,586	1188,15	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	15,90
13*	13,895	1195,86	-	-	0,16
14	14,090	1200,68	1196	<i>cis</i> -piperitol	12,13
15	14,235	1204,08	1200	<i>trans</i> -diidrocarvona	0,20
16	14,349	1206,76	1200	<i>cis</i> -4-caranona	6,89
17*	14,419	1208,40	-	-	0,95
18	14,587	1212,35	1205	Verbenona	0,80
19	14,804	1217,44	1208	<i>trans</i> -piperitol	3,60
20	14,874	1219,09	1216	<i>trans</i> -carveol	2,09
21*	15,172	1226,09	-	-	0,10
22	15,346	1230,17	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	14,97
23*	15,441	1232,40	-	-	0,41
24	15,909	1243,40	1243	Carvona	4,84
25	16,196	1250,14	1249	Hexanoato de isoamila	0,38
26	17,229	1274,40	1271	Aldeído perilla	0,63
27	17,731	1286,19	1283	2-octinoato de etila	0,33
28*	17,965	1291,68	-	-	0,23
29	24,463	1446,59	1445	Octanoato de isoamila	0,63
30	32,030	1638,90	1642	Hexanoato de 2-fenil etila	0,21
31*	49,277	2154,91	-	-	3,60
32	49,527	2163,30	2149	Albienol	0,67
33*	49,999	2179,15	-	-	0,10
34*	52,100	2251,91	-	-	1,85
Monoterpeno hidrocarbônico					2,56
Monoterpeno oxigenado					86,60
Sesquiterpeno oxigenado					0,84
Diterpeno oxigenado					0,67
Total					90,67

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, *Não foi possível à identificação do composto.

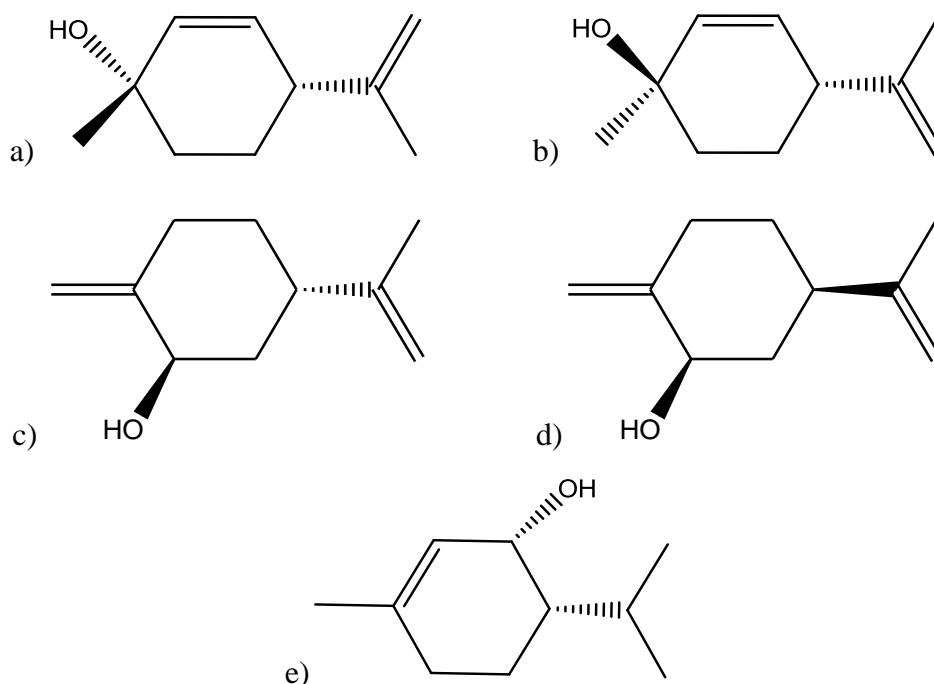


Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*. a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis-p*-piperitol.

Chisowa (1997), ao caracterizar este mesmo óleo coletado na região de Zâmbia, identificou 17 componentes, sendo que aproximadamente 53% equivalem aos do nosso estudo, observando monoterpênos oxigenados e hidrocarbônicos em destaque. Fato este que também pôde ser confirmado por Barbosa (2007) que, ao identificar os constituintes presentes neste óleo, encontrou como majoritários o *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *trans-p*-menta-2-8-dien-1-ol, *cis*-carveol e *cis-p*-menta-2-8-dien-1-ol, dentre as 24 substâncias, as quais se igualam em mais de 66% aos nossos resultados. Além disso, Akhila (2010) reuniu em uma revisão os monoterpênos de maior ocorrência relatados por diferentes autores, *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol e *cis-p*-mentha-1-(7)-dien-2-ol, os quais também podem ser identificados neste trabalho, bem como, verbenol e álcool perillil, ausentes neste caso.

Segundo estudo sazonal deste óleo feito por Seibert *et al.*, (2019), foi demonstrado que a diferença entre os óleos extraídos em épocas diferentes para uma mesma região é mínima qualitativamente, sendo que mais de 90% de sua constituição é preservada durante todo o ano. Dessa forma, foi revelado que todos os constituintes aqui presentes também foram encontrados por Seibert *et al.*, (2019), bem como, a relação dos componentes majoritários.

O óleo essencial obtido a partir das flores de *C. densiflorus* foi identificado em mais de 94% de sua composição, revelando ser constituído apenas por monoterpenos (Tabela 3). Em relação aos principais compostos estão limoneno (Figura 8), *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol (Figura 7).

Tabela 3: Caracterização química do óleo essencial de flores de *Cymbopogon densiflorus*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1*	7,432	1004,91	-	-	0,24
2*	8,068	1022,69	-	-	0,59
3	8,274	1028,45	1029	Limoneno	38,64
4	11,686	1120,67	1122	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	12,86
5	12,073	1130,07	1136	<i>cis</i> -óxido de limoneno	0,37
6	12,265	1134,73	1137	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	7,76
7*	13,440	1163,25	-	-	0,69
8	14,447	1187,69	1189	<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	10,06
9	14,767	1195,46	1196	<i>trans</i> -4-caranona	0,80
10	14,931	1199,44	1196	<i>cis</i> -piperitol	3,02
11	15,033	1201,84	1200	<i>cis</i> -4-caranona	0,84
12	15,421	1210,91	1205	Verbenona	0,43
13	15,666	1216,64	1208	<i>trans</i> -piperitol	1,81
14	15,778	1219,26	1216	<i>trans</i> -carveol	2,30
15*	15,944	1223,14	-	-	0,34
16	16,202	1229,17	1230	<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	11,57
17	16,328	1232,11	1229	<i>cis</i> -carveol	0,67
18	16,689	1240,55	1243	Carvona	3,16
19*	19,659	1310,09	-	-	2,59
20	20,220	1323,35	1327	<i>p</i> -menta-1,4-dien-7-ol	0,47
21*	20,738	1335,60	-	-	0,78
Monoterpeno hidrocarbônico					38,64
Monoterpeno oxigenado					56,12
Total					94,76

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, * Não foi possível à identificação do composto.

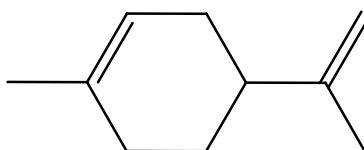


Figura 8: Fórmula estrutural do limoneno, constituinte majoritário do óleo essencial de flores de *Cymbopogon densiflorus*.

Segundo Akhila (2010) este óleo é realmente composto somente por monoterpenos, sendo limoneno (52%), *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol (10%), verbenol (9%) e álcool perilil (7%) os mais relatados, o que, em parte, está de acordo com o nossos resultados, onde a diferença está na ausência dos dois últimos compostos. O mesmo foi observado na caracterização do óleo das flores feita por Chisowa (1997),

onde foram encontrados 12 constituintes, os quais equivalem a mais de 58% a constituição apresentada no presente trabalho.

Folhas de *C. nardus* apresentaram um óleo essencial constituído principalmente por monoterpenos oxigenados, como citronelal, citronelol e geraniol (Figura 9), sendo possível a identificação da maior parte de seus compostos (99,61%) (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização química do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon nardus*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1	8,403	1027,96	1029	Limoneno	2,83
2	10,942	1098,33	1096	Linalol	0,58
3	13,096	1150,46	1153	Citronelal	56,46
4	13,360	1156,83	1159	Isopulegol	0,21
5	16,340	1227,65	1225	Citronelol	14,42
6	16,670	1235,32	1238	Neral	0,26
7	17,383	1251,90	1252	Geraniol	12,46
8	17,941	1264,88	1267	Geraniol	0,27
9	21,453	1347,10	1352	Acetato de citronelila	1,18
10	21,638	1351,45	1359	Eugenol	0,72
11	22,659	1375,48	1381	Acetato de geraniol	0,61
12	23,256	1389,52	1390	β -elemeno	0,97
13	26,979	1480,04	1481	Germacreno D	2,57
14	27,748	1498,82	1500	α -muuroleno	0,29
15*	28,005	1505,32	-	-	0,31
16	28,282	1512,38	1512	δ -amorfeno	0,28
17	28,554	1519,31	1523	δ -cadineno	1,32
18	29,665	1547,62	1548	Hediacariol	1,97
19	30,750	1575,28	1575	Germacreno D-4-ol	1,50
20	32,889	1631,28	1631	Eremoligenol	0,13
21	33,764	1654,69	1654	α -cadinol	0,58
22*	34,344	1670,21	-	-	0,10
Monoterpeno hidrocarbônico					2,83
Monoterpeno oxigenado					87,17
Sesquiterpeno hidrocarbônico					5,43
Sesquiterpeno oxigenado					4,18
Total					99,61

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, *Não foi possível à identificação do composto.

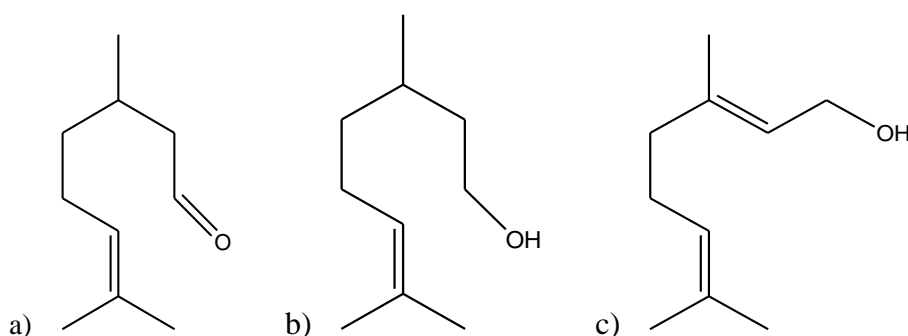


Figura 9: Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Cymbopogon nardus*. a) Citronelal; b) Citronelol; c) Geraniol.

O estudo da composição do óleo essencial destas espécies de *Cymbopogon*, *C. densiflorus* e *C. nardus*, bem como o realizado por Ganjewala (2009) revelaram os

monoterpenos como sendo os principais constituintes, no entanto, foi possível observar que a composição destes é marcadamente variada entre as espécies, uma vez que, o teor e a constituição do óleo são influenciados tanto por fatores intrínsecos ao vegetal quanto aos externos presentes no ambiente.

Akhila (2010) realizou uma revisão caracterizando os principais exemplares do gênero *Cymbopogon*, como o *C. nardus*. Esta espécie teve a composição química do seu óleo essencial revelada por diferentes autores onde, resumidamente foram encontrados 15 terpenos com maior ocorrência. Dentre esses compostos, podemos citar o limoneno (9-28%), geraniol (20-30%), citrionelol (8-20%) e citrionelal (5-16%), que apesar de apresentarem variações diferentes, qualitativamente também foram os principais no presente trabalho.

Mahalwal e Ali (2003) ao trabalharem com o óleo desta espécie encontraram 35 componentes, dos quais 29 foram identificados, correspondendo a 92,7%. O óleo continha monoterpenos (79,8%), sesquiterpenos (11,5%) e outros compostos (1,4%), proporção esta que corrobora com os nossos resultados. Outro fato que está de acordo é a presença proeminente de citrionelal (29,7%) e geraniol (24,2%), embora outros terpenos diferentes também tenham sido relatados. Da mesma forma, Trindade *et al.* (2015) caracterizaram quimicamente o óleo de *C. nardus*, sendo citrionelal (38%) o composto de maior quantidade, seguido do geraniol (19%) e citrionelol (14%), sequência esta que muito se aproxima aos dados obtidos na tabela 4, totalizando uma semelhança de 12 substâncias das 18 identificadas. Esta semelhança foi superada por Aguiar *et al.* (2014), em que todos os terpenos identificados também se encontram nos nossos dados, com exceção apenas da presença de elemol, bem como, os dados relatados por Andrade *et al.* (2012), dos quais apenas três compostos dos 17 identificados estão ausentes.

No entanto, as concentrações de citrionelal (28%), geraniol (23%), geranial (15%), citrionelol (12%) e neral (11%) em *C. nardus* no estudo feito por Toledo *et al.* (2016) destoam das encontradas neste trabalho, embora todas estejam presentes. Sendo assim, a diferença observada é dita como quantitativa e pode ocorrer devido a condições genéticas, ambientais ou geográficas, determinantes na composição dos óleos. Similarmente, a partir de uma amostra desta espécie coletada na Malásia foi possível obter um óleo essencial contendo 24 compostos, sendo identificados 93,1%. Nesta composição estavam incluídos citrionelal (29%) e citrionelol (5%), dentre outros

compostos também presentes aqui, no entanto, as proporções destes diferem nos dois estudos, além da não observação do geraniol, um dos terpenos de maior ocorrência (WEI & WEE, 2012). Resultado diferente também foi demonstrado por Kandimalla *et al.* (2016), em que citral (39%) e 2,6-octadienal,3,7-dimetil (31%), ausentes neste trabalho, foram os majoritários, além de citronelal, geraniol e citronelol, juntos somarem menos de 11% da constituição, o que de forma clara está bem distante da proporção de 83% no presente estudo. Outro dado distinto foi a presença de citral (28%) e mirceno (14%) dentre os compostos principais relatados por Hsu, Yen e Wang (2013), sendo ambos ausentes em nosso estudo.

Pesquisa realizada por Barbosa (2007) permitiu avaliar a constituição química do óleo essencial para duas amostras de *C. nardus*, em que na primeira, coletada no Distrito Federal, foram detectados 13 constituintes, os quais 11 foram identificados, o que corresponde a 93,59%. Os constituintes majoritários presentes foram geraniol (32,53%), citronelol (23,69%), elemol (8,13%) e citronelal (8,02%). Já no óleo da segunda amostra coletada em Goiás, foram detectados 11 constituintes, sendo identificados 10 compostos, correspondendo a 99,24%. Geraniol (20,27%), citronelol (14,64%) e citronelal (53,95%) foram os principais, entretanto, o elemol não foi encontrado nessa amostra. Apesar dos exemplares serem de regiões distintas, estas são relativamente próximas, o que se esperaria um maior número de constituintes compartilhados, apenas 7 estão presentes em ambos. Quando comparados aos resultados do presente estudo é possível perceber que a amostra 1 e 2 equivalem a 54% e 82%, respectivamente, apresentando o último caso maiores semelhanças tanto nos constituintes presentes quanto na sua proporção.

Além disso, na avaliação do teor e composição deste óleo essencial em diferentes épocas de colheita, a partir de uma mesma amostragem, foi possível observar que ocorreu uma variação no número de compostos nas cinco coletas. Isto porque a composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é alterada acentuadamente durante as fases de crescimento, embora em todas as amostras o geraniol se manteve o composto predominante (CASTRO *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2007).

De acordo com os constituintes verificados no óleo essencial de *C. densiflorus* e *C. nardus*, pôde-se perceber a diferença marcante entre eles, isto porque algumas

espécies se relacionam mais quimicamente com outras dentro do mesmo gênero. Sendo assim, as análises da composição de óleos essenciais podem ser importantes como subsídios para a quimiotaxonomia, uma vez que o gênero *Cymbopogon* apresenta espécies diferentes que se assemelham morfológicamente (BARBOSA, 2007).

Em seguida, as análises da caracterização química do óleo essencial de folhas de *M. leucadendron* permitiu a identificação de 99,73% de seus constituintes, os quais são predominantemente monoterpenos (Tabela 5). Limoneno (Figura 8), α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol e viridiflorol (Figura 10) foram os compostos majoritários.

Dentre os compostos de maiores proporções encontrados por Quintão (2013), corrobora com os nossos resultados a presença de viridiflorol (38%) e α -pineno (7%), por outro lado, o eucaliptol (17%) não foi identificado. Além disso, a ausência de outras substâncias que foram significativas neste estudo, como β -pineno, limoneno e 1,8-cineol reforçam as diferenças encontradas pelos autores, apesar das coletas de ambos os materiais botânicos terem ocorrido na mesma região.

No perfil cromatográfico deste óleo obtido no Senegal, Fall *et al.* (2017) identificaram 43 compostos, representando 99,47% de sua composição. Os compostos majoritários encontrados foram 1,8-cineol (29%), epiglobulol (23%), α -pineno (12%), limoneno (12%), α -terpineol (7%), β -pineno (4%) e ledol (2%), os quais se aproximam quali e quantitativamente com os dados apresentados na tabela 5, excetuando apenas a ausência do epiglobulol e a presença do viridiflorol. Além disso, mais de 53% de ambas as composições são equiparáveis, com predominância de monoterpenos.

No trabalho realizado por Farag *et al.* (2004), maiores níveis de 1,8-cineol (64%), α -terpineol (11%) e valenceno (4%) foram encontrados. Por outro lado, o oposto ocorreu para limoneno (7%) α -pineno (4%) e β -pineno (2%). Dessa forma, os perfis bioquímicos do óleo obtido na região do Cairo e deste estudo foram semelhantes em cerca de 74%, apesar da diferença quantitativa observada entre os maiores constituintes.

Sendo assim, de uma forma geral, estas variabilidades relatadas no óleo essencial extraído a partir das folhas de *M. leucadendron* podem ocorrer devido a influências bióticas e abióticas, como a diversidade genética, o habitat, além dos tratamentos culturais, que interferem na composição química destes óleos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Tabela 5: Caracterização química do óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1	5,322	925,31	930	α -thujeno	0,17
2	5,558	934,00	939	α -pineno	9,06
3	5,916	947,19	952	α -fencheno	0,06
4	5,968	949,11	954	Camfeno	0,44
5	6,285	960,79	960	Benzaldeído	0,30
6	6,782	979,10	979	β -pineno	7,74
7	6,884	982,86	985	6-metil-5-hepten-2-ona	0,07
8	7,027	988,13	990	Mirceno	0,15
9	7,957	1016,60	1017	α -terpineno	0,10
10	8,285	1025,56	1024	ρ -cimeno	1,08
11	8,565	1033,21	1029	Limoneno	32,00
12	8,643	1035,34	1031	1,8-cineol	17,32
13	8,959	1043,97	1037	(Z)- β -ocimeno	0,21
14	9,402	1056,07	1059	γ -terpineno	1,24
15	10,405	1083,47	1088	Terpinoleno	0,26
16	10,769	1093,41	1090	Metilbenzoato	0,10
17	10,966	1098,79	1096	Linalol	0,67
18	11,728	1117,33	1116	Fenchol	0,16
19	11,847	1120,20	1122	<i>trans</i> - ρ -menta-2,8-dien-1-ol	0,06
20	12,437	1134,45	1137	<i>cis</i> - ρ -menta-2,8-dien-1-ol	0,06
21	12,605	1138,50	1139	<i>trans</i> -pinocarveol	0,12
22	12,931	1146,37	1148	neo-isopulegol	0,34
23	13,175	1152,26	1149	Hidrato de camfeno	0,03
24	13,343	1156,32	1149	Isopulegol	0,09
25	13,843	1168,39	1166	δ -terpineol	0,15
26	13,905	1169,89	1169	Borneol	0,12
27*	14,200	1177,01	-	-	0,15
28	14,287	1179,11	1177	Terpinen-4-ol	1,05
29	14,596	1186,57	1189	<i>trans</i> - ρ -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,34
30	14,973	1195,67	1188	α -terpineol	3,68
31*	15,132	1199,51	-	-	0,09
32*	16,205	1224,22	-	-	0,04
33	16,285	1226,06	1125	Citronelol	0,08
34	16,369	1228,00	1230	<i>cis</i> - ρ -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,18
35	24,420	1415,13	1419	E-cariofileno	1,14
36	25,880	1450,53	1454	α -humuleno	0,19
37	26,067	1455,06	1460	allo-aromadendreno	0,41
38	27,259	1483,97	1490	β -selineno	0,33
39	27,368	1486,61	1496	Viridifloreno	0,48
40	27,560	1491,27	1498	α -selineno	0,22
41	28,259	1508,55	1513	γ -cadineno	0,14
42	28,488	1514,33	1523	δ -cadineno	0,07
43	30,491	1564,90	1568	Palustrol	0,37
44	30,951	1576,52	1583	Óxido cariofileno	1,36
45	31,619	1593,38	1592	Viridiflorol	14,89
46	31,903	1600,58	1602	Ledol	2,48
47	32,046	1604,38	1608	Epóxido humuleno II	0,14
48	33,286	1637,30	1640	epi- α -cadinol	0,08
Monoterpeno hidrocarbônico					52,51
Monoterpeno oxigenado					24,92
Sesquiterpeno hidrocarbônico					2,98
Sesquiterpeno oxigenado					19,32
Total					99,73

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, *Não foi possível à identificação do composto.

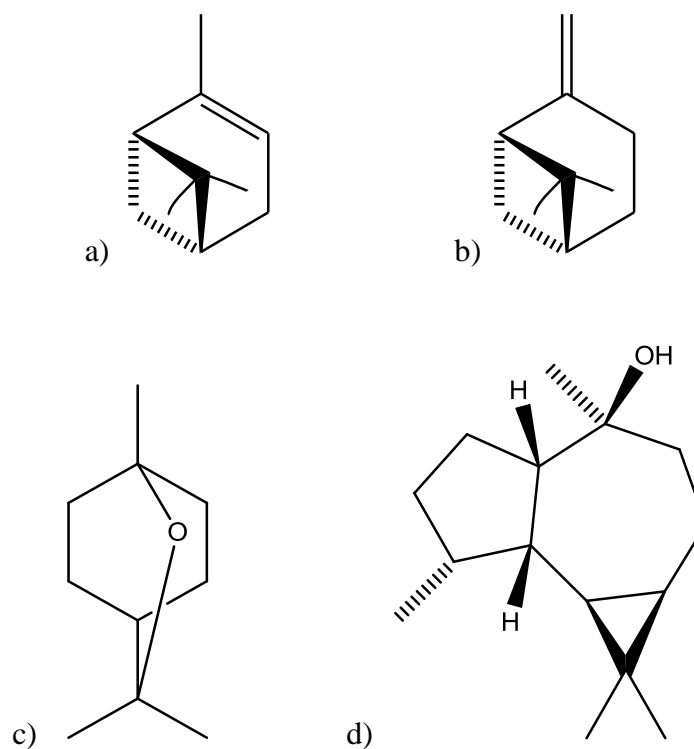


Figura 10: Fórmulas estruturais dos principais constituintes presentes no óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*: a) α -pineno; b) β -pineno; c) 1,8-cineol; d) Viridiflorol.

Cerca de 99% da composição química do óleo essencial de flores de *M. leucadendron* foram identificados, sendo relatada a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 6). Dentre os 31 compostos, limoneno, α -pineno e viridiflorol (Figuras 8 e 10) foram os principais. Como relatado anteriormente, nenhum trabalho com objetivo de obter e caracterizar esse óleo essencial foi publicado até o momento, fato que justifica a escolha desse material botânico para a aquisição de maiores informações químicas e biológicas, bem como, pela relevância desse conhecimento.

Tabela 6: Caracterização química do óleo essencial de flores de *Melaleuca leucadendron*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1	5,587	933,22	939	α -pineno	17,13
2	5,991	948,15	954	Camfeno	0,10
3	6,773	977,05	979	β -pineno	2,38
4	7,051	987,32	990	Mirceno	0,28
5	7,974	1016,07	1017	α -terpineno	0,08
6	8,418	1028,38	1029	Limoneno	9,07
7	8,956	1043,29	1050	(E)- β -ocimeno	0,69
8	9,424	1056,26	1059	γ -terpineno	0,15
9	10,477	1085,44	1088	ρ -menta-2,4(8)-dieno	0,35
10	10,944	1098,39	1096	Linalol	0,23
11	14,843	1192,57	1188	α -terpineol	0,86
12	22,699	1376,42	1376	Isoledeno	0,21
13	24,006	1407,44	1409	β -gurjuneno	0,25
14	24,463	1418,60	1419	E-cariofileno	3,16
15	25,350	1440,26	1441	Aromadendreno	0,31
16	25,890	1453,45	1454	α -humuleno	0,62
17	26,136	1459,46	1466	9-epi-(E)-cariofileno	0,69
18*	27,334	1488,71	-	-	0,57
19	27,511	1493,04	1496	Viridifloreno	4,01
20*	28,275	1512,20	-	-	0,34
21	28,531	1518,73	1523	δ -cadineno	0,49
22*	30,524	1569,52	-	-	0,56
23	31,153	1585,55	1590	Globulol	0,35
24	31,588	1596,63	1592	Viridiflorol	47,01
25	31,899	1604,78	1602	Ledol	5,74
26	32,770	1628,09	1631	Eremoligenol	0,30
27	32,883	1631,12	1632	γ -eudesmol	0,39
28	33,244	1640,78	1640	epi- α -cadinol	0,58
29	33,653	1651,72	1650	β -eudesmol	1,02
30	33,757	1654,50	1653	α -eudesmol	1,34
31	34,148	1664,97	1671	Bulnesol	0,74
Monoterpeno hidrocarbônico					30,23
Monoterpeno oxigenado					1,09
Sesquiterpeno hidrocarbônico					9,74
Sesquiterpeno oxigenado					57,47
Total					98,53

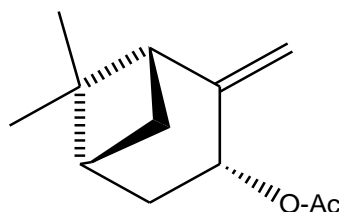
TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats, * Não foi possível à identificação do composto.

A tabela 7 mostra a composição química completa do óleo essencial obtido a partir de folhas de *M. graveolens*. Como pode ser visto, 11 diferentes substâncias foram identificadas, sendo representada majoritariamente por monoterpenos oxigenados. Baseado nesses resultados foi demonstrado também que os maiores constituintes foram β -pineno (Figura 10) e *cis*-acetato de pinocarvil (Figura 11).

Tabela 7: Caracterização química do óleo essencial de folhas de *Microlicia graveolens*.

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1	5,445	931,94	939	α -pineno	0,85
2	6,471	970,49	975	Sabineno	0,31
3	6,632	976,55	979	β -pineno	6,70
4	6,907	986,88	990	Mirceno	2,94
5	8,246	1027,66	1029	Limoneno	1,25
6	8,300	1029,17	1031	1,8-cineol	0,88
7	14,415	1186,91	1184	<i>cis</i> -pinocarveol	0,53
8	14,661	1192,88	1188	α -terpineol	0,46
9	18,930	1292,94	1298	<i>trans</i> -acetato de pinocarvil	1,66
10	19,639	1309,62	1312	<i>cis</i> -acetato de pinocarvil	83,57
11	31,164	1593,01	1592	Viridiflorol	0,86
Monoterpeno hidrocarbônico					12,05
Monoterpeno oxigenado					87,10
Sesquiterpeno oxigenado					0,86
Total					100,01

TR = Tempo de Retenção, IK= Índice de Kovats.

**Figura 11:** Fórmula estrutural do *cis*-acetato de pinocarvil, constituinte majoritário do óleo essencial de folhas de *Microlicia graveolens*.

Segundo Quintão (2013) dentre as substâncias de maior ocorrência neste óleo essencial estão (+)-*trans*-acetato de pinocarvil (48%) e β -pineno (25%), dados estes que também foram obtidos por Toudahl *et al.* (2012), nas proporções de 79% e 4%, respectivamente. No entanto, o mesmo não foi observado em nosso estudo, onde se apresenta apenas traços deste terpeno tido como principal e uma proporção semelhante de β -pineno apenas para o segundo autor. Esta diferença pode ter ocorrido devido à semelhança dos espectros de massas e a dificuldade de identificação dos compostos, uma vez que o *cis*-acetato de pinocarvil, composto majoritário do presente estudo, difere apenas na conformação geométrica, ou seja, é esteroisômero do *trans*-acetato de pinocarvil.

Em síntese, de acordo com as tabelas anteriores, podemos verificar que todos os óleos em questão são constituídos por terpenos, principalmente mono e sesquiterpenos. Segundo Borges *et al.* (2012), esta classe de compostos é a responsável pela ação antiparasitária dos óleos essenciais, atuando a partir da indução de danos celulares no parasito. Este relato juntamente com a caracterização química obtida nesse estudo,

reintegra a capacidade desses óleos essenciais apresentarem um efeito terapêutico contra o agente etiológico da doença de Chagas.

Dessa forma, os principais componentes monoterpenoides que têm sido relatados por apresentar ação específica sobre *T. cruzi* são citral, geranial, linalol, γ -terpineno, limoneno, carvona, ρ -cimeno, timol e carvacrol (SCHMIDT *et al.*, 2012a). Comparando-se com os constituintes identificados nas espécies em estudo, é possível verificar que seis dessas estruturas estão presentes em pelo menos um dos óleos essenciais estudados, com destaque para o limoneno relatado para todas as espécies e cuja concentração é significativa para *C. densiflorus* (flores) e *M. leucadendron* (folhas e flores). Outra substância importante é o geraniol, devido à presença relevante no óleo de *C. nardus*.

Em estudos realizados por Santoro *et al.* (2007c), o óleo essencial de *C. citratus* foi ativo contra cepas de *T. cruzi*, atividade esta que também foi relatada para o seu componente principal, citral. Esta substância é um exemplo de monoterpeno oxigenado e de acordo com as tabelas anteriores, esta classe está presente majoritariamente nos óleos essenciais das outras espécies do gênero *Cymbopogon* em estudo, bem como, em *M. graveolens*. Com isso, podemos observar significativas semelhanças na estrutura química do citral e os principais constituintes destes óleos, o que indica que estes podem reproduzir a atividade relatada para *C. citratus*.

Além disso, outros monoterpenos também tiveram seu potencial antiparasitário revelado, no entanto, sobre diferentes protozoários. Dentre eles, pode-se citar geraniol, terpinoleno, terpinen-4-ol, isopulegol, 1,8-cineol, sabineno, α -pineno, β -pineno e verbenona, que de forma análoga foram encontrados no presente trabalho. Salientam-se as estruturas 1,8-cienol, α -pineno e β -pineno, as quais se apresentaram majoritariamente para as espécies *M. leucadendron* (folhas e flores) e *M. graveolens*. Por outro lado, substâncias como α -felandreno, óxido limoneno, álcool perila, piperitona, tujona, δ -3-careno, mirtenal, cânfora e piretrinas, apesar de ausentes nas tabelas anteriores, corroboram o efeito danoso dos monoterpenos sobre os parasitos (SCHMIDT *et al.*, 2012a).

No caso dos sesquiterpenos, subclasse formada por três unidades de isopreno, estes são aparentemente responsáveis pela inibição da cruzaina, protease essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*. Segundo Schmidt *et al.* (2012a) foram encontrados valores

baixos de CI_{50} sobre o parasito para β -cariofileno, α -copaeno, zingibereno, germacreno D e α -humuleno, sendo os dois últimos identificados, respectivamente nas espécies *C. nardus* e *M. leucadendron*. Além disso, em pesquisa feita por Biavatti *et al.* (2001) foi possível quantificar o potencial inibitório do germacreno D contra tripomastigotas de *T. cruzi* (61% de inibição a 100 $\mu\text{g/mL}$), o que reforça a possibilidade desses óleos apresentarem efeito anti-chagásico.

Martínez-Díaz *et al.* (2015) demonstraram que *E*-cariofileno exibe efeito antiparasitário potente contra *T. cruzi*. Visto que no óleo essencial tanto de folhas quanto de flores de *M. leucadendron* também foi identificada essa substância, mesmo que em concentrações menores, espera-se que essa espécie apresente ação contra o parasito. Além disso, o presente composto é um sesquiterpeno oxigenado e como citado anteriormente, esta foi a principal classe de terpeno identificada no óleo das flores desta espécie, sugerindo que estes compostos podem ser pelo menos em parte, responsáveis pela atividade antiparasitária.

Por fim, os triterpenóides, lupeol e o éster do ácido 3-hidroxitetradecanóico do lupeol, também demonstram atividade inibitória da protease cruzipáina (SCHMIDT *et al.*, 2012a). Embora esta subclasse seja encontrada em concentrações reduzidas nos óleos essenciais, esses dados reforçam a importância dos terpenos na defesa das plantas e ação contra os parasitos.

4.3. Avaliação *in silico* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os óleos essenciais são uma mistura complexa, isolados do metabolismo secundário de várias plantas e que podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais. Nessas misturas existem entre 20 a 60 constituintes em diferentes concentrações, porém, geralmente, somente 2 a 3 constituintes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (AZEREDO *et al.*, 2014). Sendo assim, a avaliação *in silico* da atividade anti-*T. cruzi* (Tabela 8) foi analisada somente para as substâncias que apresentaram maior porcentagem em cada óleo essencial em estudo e muito provavelmente seriam os responsáveis pelos efeitos apresentados por esse produto natural, seja sob formas isoladas ou em ação sinérgica com outros constituintes.

Tabela 8: Previsões *in silico* dos potenciais efeitos biológicos e mecanismos de ação anti-*Trypanosoma cruzi* dos compostos majoritários de cada óleo essencial utilizando a ferramenta PASS *online*.

Constituinte	Potencial efeito biológico e mecanismo de ação*										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>											
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,502	0,301	-	0,012	0,075	-	-	-	0,291	-	-
<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,502	0,301	-	0,012	0,075	-	-	-	0,291	-	-
<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,463	-	0,153	-	0,015	-	-	-	0,383	-	-
<i>cis</i> -piperitol	0,426	-	0,114	0,005	0,106	0,002	0,045	-	0,625	0,054	-
<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,463	-	0,153	-	0,015	-	-	-	0,383	-	-
Flores de <i>Cymbopogon densiflorus</i>											
Limoneno	0,605	0,159	-	-	0,100	-	0,003	0,045	0,335	0,038	-
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,502	0,301	-	0,012	0,075	-	-	-	0,291	-	-
<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,502	0,301	-	0,012	0,075	-	-	-	0,291	-	-
<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,463	-	0,153	-	0,015	-	-	-	0,383	-	-
<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,463	-	0,153	-	0,015	-	-	-	0,383	-	-
Folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>											
Citronelal	0,407	0,209	0,328	-	-	-	0,158	-	0,881	-	0,012
Citronelol	0,548	0,247	0,357	-	0,053	-	0,214	-	0,829	-	0,060
Geraniol	0,651	0,360	0,490	-	0,030	-	0,242	-	0,816	-	0,132
Folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>											
α -pineno	0,394	0,221	-	0,009	-	0,003	0,038	-	0,418	0,035	-
β -pineno	0,215	0,054	0,086	0,008	-	-	-	-	0,389	0,005	-
Limoneno	0,605	0,159	-	-	0,100	-	0,003	0,045	0,335	0,038	-
1,8-cineol	0,687	0,719	-	0,044	0,062	-	0,023	-	0,471	0,052	-
Viridiflorol	0,303	0,375	-	0,023	-	-	-	-	0,326	-	-
Flores de <i>Melaleuca leucadendron</i>											
α -pineno	0,394	0,221	-	0,009	-	0,003	0,038	-	0,418	0,035	-
Limoneno	0,605	0,159	-	-	0,100	-	0,003	0,045	0,335	0,038	-
Viridiflorol	0,303	0,375	-	0,023	-	-	-	-	0,326	-	-
Folhas de <i>Microlícia graveolens</i>											
β -pineno	0,215	0,054	0,086	0,008	-	-	-	-	0,389	0,005	-
<i>cis</i> -acetato de pinocarvil	0,275	0,141	0,127	0,036	-	-	-	-	0,451	-	-

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$). 1- Antiparasitário; 2- Antiprotozoário; 3- Antiprotozoário (*Trypanosoma*); 4- Potencializador da atividade antiparasitária; 5- Inibição da lanosterol 14- α demetilase; 6- Inibição do CYP51; 7- Inibição da esqualeno epoxidase; 8- Inibição da tripanotona disulfetoreductase; 9- Inibição da proteína dissulfeto reductase (Glutathione); 10- Inibição da glutathione reductase; 11- Inibição da biossíntese de purinas.

De acordo com a tabela anterior, todos os óleos essenciais apresentaram um ou mais constituintes com alto potencial antiparasitário (1), com exceção do óleo de *M. graveolens*, em que este efeito foi moderado. Uma vez que o *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado, também foi avaliada a atividade antiprotozoária (2), a qual variou de baixa a moderada para representantes de todos os óleos, com destaque para 1,8-cineol presente nas folhas de *M. leucadendron* que foi o único com potencial alto.

Os óleos essenciais ricos em monoterpenos fenólicos geralmente apresentam atividade antiprotozoária. Em revisão feita por Schmidt *et al.* (2012a) foi relatada a ação antiparasitária de diferentes metabólitos secundários, dentre eles, o composto geraniol, presente em *C. nardus*, que revelou uma CI_{50} sobre *Plasmodium falciparum* equivalente a 8 $\mu\text{g/mL}$ (OLAGNIER *et al.*, 2007). Já os monoterpenos α -pineno e β -pineno demonstraram em distintos estudos efeito contra *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (MIKUS *et al.*, 2000) e a ação de 1,8-cineol sobre *T. brucei* e *P. falciparum* também pôde ser quantificada (83 $\mu\text{g/mL}$ e 120 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (NIBRET & WINK, 2010; SU *et al.*, 2008). Visto que as substâncias citadas estão presentes de forma considerável nas espécies *C. nardus*, *M. leucadendron* e *M. graveolens*, bem como os parasitos sobre os quais demonstraram atividade são exemplos de protozoários, esses dados confirmam o potencial 1 e 2 demonstrado na análise *in silico* destes óleos essenciais.

Além disso, analisou-se essa ação especificamente para o gênero *Trypanosoma* (3), onde foi possível observar também uma variação de baixa a moderada atividade, no entanto, nenhum efeito foi demonstrado para os constituintes das flores de *M. leucadendron*. Este resultado pode ser contrariado devido o limoneno, presente nas espécies *M. leucadendron* e *C. densiflorus*, apresentar ação sobre *T. cruzi* tanto para formas epimastigotas quanto amastigotas, revelando valores de CI_{50} entre 30 a 211 $\mu\text{g/mL}$ (ESCOBAR *et al.*, 2010), além de outros parasitos como *T. brucei*, *L. chagasi*, *L. amazonenses* e *P. falciparum* (ESCOBAR *et al.*, 2010; NIBRET & WINK, 2010; ARRUDA *et al.*, 2009; OLAGNIER *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2004). Dessa forma, diversos trabalhos já comprovaram a potencialidade contra parasitos dos compostos tidos como majoritários para os óleos essenciais em estudo, realidade esta que justifica a pesquisa para a obtenção de maiores informações.

Ademais, em caso da utilização desses óleos essenciais juntamente com outras substâncias eficazes para o tratamento da doença de Chagas, também foi analisado o efeito potencializador da atividade antiparasitária (4), o qual não foi revelado apenas o óleo de *C. nardus*. Essa alternativa tem sido avaliada com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica da quimioterapia atual, por meio da associação dos fármacos convencionalmente utilizados entre si e com os novos compostos.

Além dos efeitos biológicos, supostos mecanismos de ação contra *T. cruzi* foram previstos. O ergosterol está presente em membranas do parasito, atuando com um modulador de fluidez. Quimicamente, é classificado como um esteroide de membrana altamente lipofílico e qualquer ação dos óleos essenciais nesta molécula pode desencadear um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática do parasito, levando alterações na homeostase intracelular (ANDRADE *et al.*, 2015).

Como demonstrado por Urbina (2009), inibidores específicos da biossíntese do ergosterol (IBE), como inibidores da esqualeno sintase, lanosterol sintase e esqualeno epoxidase apresentam potência *in vitro* e *in vivo* contra o parasito, no entanto são menos avançados em seu processo de desenvolvimento. Os resultados de inibição da lanosterol 14- α desmetilase (5) e da esqualeno epoxidase (7) não foram demonstrados apenas para a espécie *M. graveolens* enquanto a inibição do CYP51(6) foi apresentada por três óleos diferentes. Este fato impulsiona, portanto, pesquisas nessa área a fim de se obter maiores conhecimentos de um mecanismo que demonstra ser presente e viável nesses óleos essenciais, mas que ainda não foram totalmente elucidados.

Em adição, estudos realizados nas últimas duas décadas demonstram consistentemente que o *T. cruzi*, como a maioria dos fungos e leveduras, requer esteróis específicos para a viabilidade celular e proliferação em todas as fases do seu ciclo de vida. Com isso, vários IBE comercialmente disponíveis, que são altamente eficazes no tratamento de doenças fúngicas (tais como cetoconazol, itraconazol ou terbinafina) têm revelado efeitos supressivos, mas não curativos contra infecções por *T. cruzi* em humanos ou animais de experimentação e incapazes de parar a progressão da doença (URBINA, 2009; URBINA & DOCAMPO, 2003).

Dessa forma, os óleos essenciais exercem um papel importante na defesa do vegetal contra diversos agentes patológicos, em que, cerca de 60% desses óleos apresentam atividade antifúngica. Segundo diferentes literaturas, os óleos essenciais de

C. densiflorus (SEIBERT *et al.*, 2015), *C. nardus* (KANDIMALLA *et al.*, 2016; TOLEDO *et al.*, 2016; AGUIAR *et al.*, 2014; VELOSO *et al.*, 2012) e *M. leucadendron* (FARAG *et al.*, 2004) apresentam potente atividade contra fungos, no entanto, para *M. graveolens* foram encontrados relatos apenas sobre bactérias (QUINTÃO, 2013). Sendo assim, todos os óleos obtidos neste estudo já tiverem seu potencial antimicrobiano descrito o que pode ser correlacionado com a possível ação antiparasitária baseada nos IBE demonstrada no estudo *in silico* e reforça o interesse no desenvolvimento de novos antiparasitários provenientes desses metabólitos.

A eficácia contra o parasito também pode ser observada para compostos com mecanismos duplos de ação, ou seja, inibição da biossíntese de ergosterol e geração de radicais livres (URBINA, 2009). Esses radicais causam diferentes danos celulares e o desequilíbrio entre a taxa de formação dessas substâncias e sua degradação conduz ao estresse oxidativo. A principal defesa a esses danos é o sistema antioxidante, o qual atua por meio do desenvolvimento de uma resposta ao aumento da concentração de oxigênio. Visto que os óleos essenciais apresentam baixo potencial antioxidante devido à ausência de compostos fenólicos que são os principais responsáveis por essa atividade, neste caso, portanto, é possível que a concentração de radicais livres não seja reduzida, propiciando, assim, o mecanismo duplo de ação dos óleos essenciais (SEIBERT *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2012).

Em relação à síntese e metabolismo da tripanotona, antioxidante essencial para sobrevivência do parasito, mecanismos como inibição da tripanotona disulfetoreductase (8), inibição da proteína dissulfeto reductase (Glutathione) (9) e inibição da glutathione reductase (10) também foram avaliados. No primeiro caso, apenas o limoneno presente em três diferentes óleos de forma significativa demonstrou atividade. Já no segundo mecanismo, todos os óleos revelaram uma ação moderada, podendo destacar a espécie *C. nardus* em que o potencial foi alto. No entanto, o contrário foi observado para último resultado, em que todos os óleos, com exceção do *C. nardus*, apresentaram alguma ação.

O cinamaldeído, fenilpropanóide extraído principalmente do gênero *Cinnamomum*, tem como modo de ação contra *T. cruzi* a adição de um aldeído tiol nos componentes contendo enxofre nas enzimas chaves tripanotona e tripanotona reductase, o que levaria a um desequilíbrio redox (AZEREDO *et al.*, 2014). Todos os compostos

descritos na tabela anterior, exceto o viridiflorol (sesquiterpeno), apresentam estrutura que se aproxima ao cinamaldeído, sugerindo, assim, a possibilidade de reproduzirem o mesmo efeito e reforçando os valores obtidos através das análises *in silico*.

Dessa forma, a tripanotona redutase, estrutural e mecanisticamente relacionada à glutatona redutase, é uma flavoproteína chave no mecanismo de defesa dos tripanosomatídeos contra o estresse oxidativo (SCHMIDT *et al.*, 2012a; KRIEGER *et al.*, 2000). Outros fitoquímicos que também mostraram mesma atividade são o ajoeno extraído a partir do alho (*Allium sativum*) (GALLWITZ *et al.*, 1999) e a lunarina de *Lunaria* spp. (BOND *et al.*, 1999).

Por fim, devido à deficiência na biossíntese *de novo* de purinas (11) do *T. cruzi*, a inibição dessa via também demonstra ser um alvo terapêutico, o qual foi apresentado somente para a espécie *C. nardus*.

Embora não informado pelas análises *in silico*, outros mecanismos contra *T. cruzi* já foram revelados, como por exemplo, a inibição da cruzipaína, principal protease de cisteína do parasito e a qual tem sido foco de esforços recentes na descoberta de fármacos antichagásicos (SAJID *et al.*, 2011). Dessa forma, uma série de óleos essenciais revelou atividade inibitória de cruzipaína, dentre eles, o óleo de casca de *Croton draco* (CI₅₀ 16 µg/mL) (SETZER *et al.*, 2007), de folhas de *Eugenia* sp. (CI₅₀ 36 µg/mL) (STOKES *et al.*, 2007) e de *Ocotea* spp. (CI₅₀ ≤ 20 µg/mL) (SETZER *et al.*, 2006). Os sesquiterpenoides são aparentemente responsáveis por esta capacidade de inibição de cruzipaína dos óleos, como pôde ser comprovado pelos resultados encontrados para os compostos isolados dos mesmos: β-cariofileno (CI₅₀ 32 µg/mL), α-copaeno (CI₅₀ 5 µg/mL), germacreno D (CI₅₀ 22 µg/mL), α-humuleno (CI₅₀ 28 µg/mL) e zingibereno (CI₅₀ 8 µg/mL) (SCHMIDT *et al.*, 2012a; SETZER *et al.*, 2007; STOKES *et al.*, 2007). Visto que a espécie *Eugenia* sp. pertence a mesma família da *M. leucadendron* (Myrtaceae) juntamente com a presença do viridiflorol, sesquiterpeno majoritário, sugere-se então que o óleo desta espécie pode apresentar ação contra *T. cruzi* através do efeito sobre a cruzipaína.

A pesquisa de potenciais agentes antiparasitários por meio do direcionamento a alvos enzimáticos específicos tem a vantagem de identificar inibidores seletivos, os quais podem ser negligenciados devido a deficiências na entrega do fármaco ou de sua biodisponibilidade nos métodos *in vitro* e *in vivo*. Contudo, apenas algumas triagens

foram realizadas a partir de extratos de plantas ou fitoquímicos sobre proteínas alvo de parasitos (SCHMIDT *et al.*, 2012a). Sendo assim, de uma forma geral, todos os óleos em estudo demonstraram potencial anti-*T. cruzi*, podendo atuar sobre diferentes mecanismos de ação, o que de fato se torna vantajoso diante do surgimento de cepas resistentes.

4.4. Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

4.4.1. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

A análise dos resultados foi realizada considerando a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida promovida pelos óleos essenciais testados, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de tratamento.

A partir da leitura das absorbâncias do controle de viabilidade celular (contendo somente células L929 e sem tratamento) e do controle da viabilidade da infecção (contendo células L929 infectadas e sem tratamento) foram obtidos valores de 0,459 e 2,565 respectivamente. Visto que o primeiro caso refere-se a 100% da atividade, ou seja, 100% da redução do crescimento parasitário, uma vez que não há parasitos e o segundo a 0% de atividade, pois não há nenhum tratamento, foi possível calcular a atividade de cada concentração dos óleos essenciais testados ($y = -0,021x + 2,565$, $R^2 = 1$). Em seguida foi determinada a faixa de linearidade entre a concentração e a atividade do óleo para cálculo da CI_{50} sobre o parasito, ou seja, concentração que reduz 50% do crescimento parasitário.

De acordo com a tabela 9 pode ser observado que o óleo obtido por meio das folhas de *C. densiflorus* demonstrou a menor concentração com efeito sobre o parasito (CI_{50} 60 $\mu\text{g/mL}$), seguido do óleo das flores desta espécie (CI_{50} 120 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, uma concentração significativamente superior (CI_{50} 740 $\mu\text{g/mL}$) foi necessária para o óleo de *C. nardus* apresentar mesma atividade da espécie anterior, apesar de pertecerem ao mesmo gênero. Uma diferença também foi verificada entre a ação do óleo das folhas (CI_{50} 360 $\mu\text{g/mL}$) e flores de *M. leucadendron* (CI_{50} 1260 $\mu\text{g/mL}$), em que a atividade antiparasitária do primeiro caso se revelou cerca de quatro vezes maior quando comparada ao segundo. Por fim, o menor efeito contra o parasito foi demonstrado para o óleo de *M. graveolens* (CI_{50} 2300 $\mu\text{g/mL}$). Esta habilidade em inibir

o crescimento parasitário do *T. cruzi* foi avaliada pela primeira vez para a maior parte dos óleos descritos nesse estudo, exceto para *C. nardus*.

Tabela 9: Determinação da CI_{50} das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* e das células L929 sob ação dos óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Cymbopogon densiflorus*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca leucadendron* e *Microlicia graveolens* e determinação do índice de seletividade para atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Óleo essencial	CI_{50} sobre o parasito ¹ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CI_{50} sobre L929 ² ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Índice de Seletividade ³
Folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	60	230	3,8
Flores de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	120	<37	Inativo
Folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>	740	740	1
Folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	360	360	1
Flores de <i>Melaleuca leucadendron</i>	1260	<75	Inativo
Folhas de <i>Microlicia graveolens</i>	2300	<620	Inativo
Benznidazol	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	625

¹ Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário; ² Concentração do composto que induz 50% de morte celular; ³ CI_{50} do composto sobre as células dividido pelo CI_{50} do composto sobre o parasito.

Citral é um terpeno oxigenado encontrado no óleo essencial de *C. citratus* e possui atividade contra *T. cruzi*, possivelmente pela indução de lise das membranas celulares (SANTORO *et al.*, 2007c). Embora *C. densiflorus* e *C. nardus* sejam do mesmo gênero, a capacidade em inibir o parasito se mostrou diferenciada. De acordo com os resultados da constituição química dos óleos essenciais destas espécies, pode-se perceber uma diferença marcada entre eles, isto porque algumas espécies se relacionam mais quimicamente com outras dentro do mesmo gênero, bem como, a diferença existente entre partes distintas na mesma espécie (folhas e flores). De forma análoga pode ser dito quanto à capacidade de apresentar certos efeitos biológicos, em que neste caso as espécies *C. densiflorus* e *C. citratus* se assemelham (BARBOSA, 2007).

O óleo essencial de folhas de *Cinnamodendron dinisii* é composto principalmente por α -pineno (36%), β -pineno (18%) e sabineno (12%) e estudos de sua atividade anti-*T. cruzi* revelaram um baixo efeito inibitório (CI_{50} 283 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ANDRADE *et al.*, 2015). Este resultado corrobora com o encontrado em nosso estudo, pois tanto a espécie *M. leucadendron*, constituída majoritariamente por α -pineno e β -pineno, quanto a *M. graveolens*, a qual além desses compostos também está presente o sabineno, não demonstraram atividade de forma significativa sobre o parasito.

Em análises do óleo essencial de *Siparuna guianensis*, dentre os constituintes principais estão mirceno (13%) e germacreno D (8,68%), em que o primeiro composto também foi encontrado nos óleos de *M. leucadendron* e *M. graveolens*, já o segundo se

faz presente em *C. nardus*. Apesar de que as concentrações destes compostos sejam menores em nosso estudo, quando comparamos a avaliação da capacidade em inibir o crescimento de *T. cruzi* pelos óleos em questão, todos apresentaram baixo potencial. Este fato, também foi observado por Andrade *et al.* (2015), em que o óleo de *S. guianensis* obteve uma fraca inibição sobre o parasito (CI₅₀ 209 µg/mL).

Outro relato descreveu a análise fitoquímica de *Miconia fallax* e *M. stenostachya*, em que cinco triterpenos puros e duas misturas foram obtidas e testadas contra a cepa Y de *T. cruzi* (CUNHA *et al.*, 2003). Os compostos mais ativos demonstraram valores de CI₅₀ entre 20 a 80 µM e para a atividade fraca o valor foi acima de 300 µM. Apesar dessa distinção, pode-se considerar que todos os terpenos foram pouco ativos, bem como, o resultado obtido para óleo de *M. graveolens*, pertencente à mesma família das espécies acima (Melastomataceae).

Azeredo *et al.* (2014) realizaram em seu estudo uma triagem da atividade de oito diferentes óleos essenciais sobre *T. cruzi*. Em um primeiro momento, foi possível observar que os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* e *Corymbia citriodora* não revelaram nenhum efeito contra o parasito. Esta análise corrobora com a encontrada em nossa pesquisa para a espécie *M. leucadendron*, visto que esta, bem como, *E. globulus* e *C. citriodora* pertencem à mesma família, sugerindo assim, baixo potencial anti-*T. cruzi* para Myrtaceae.

Dentre as outras espécies analisadas por Azeredo *et al.* (2014), *Cinnamomum verum* foi a mais ativa, com valor de CI₅₀ cerca de 24 µg/mL, seguida pela *Myrocarpus frondosus* (CI₅₀ 61 µg/mL), *Eugenia uniflora* (CI₅₀ 70 µg/mL), *C. nardus* (CI₅₀ 94 µg/mL) e *Citrus limon* (CI₅₀ 107 µg/mL). Diante desses resultados podemos observar que todos os óleos que foram considerados ativos demonstraram números próximos ao encontrado para *C. densiflorus*, o que confirma o potencial antichagásico para esta espécie.

4.4.2. Citotoxicidade

Além da atividade sobre as formas parasitárias, também foi possível determinar a porcentagem de inibição da viabilidade celular após adição dos óleos essenciais com base na equação 2. Em seguida, calculou-se a CI₅₀ sobre L929, ou seja, a concentração que induz 50% de morte das células hospedeiras a partir da faixa de linearidade obtida

($y = 568,75x - 82,312$, $R^2 = 1$). Por fim, o índice de seletividade foi revelado através da razão de citotoxicidade: atividade antiparasitária (CI_{50} sobre L929: CI_{50} sobre o parasito).

Baseado na tabela 9, a maior citotoxicidade foi encontrada para os óleos das flores de *C. densiflorus* ($CI_{50} < 37 \mu\text{g/mL}$) e *M. leucadendron* ($CI_{50} < 75 \mu\text{g/mL}$), além disso, esses valores são inferiores às concentrações que seriam necessárias de acordo com cada espécie para apresentar atividade contra o parasito, sendo considerados, portanto, inativos. Perfil semelhante foi demonstrado para *M. graveolens*, em que a CI_{50} sobre L929 ($CI_{50} < 620 \mu\text{g/mL}$) foi inferior a do parasito. Já os óleos das folhas de *C. nardus* ($CI_{50} 740 \mu\text{g/mL}$) e *M. leucadendron* ($CI_{50} 360 \mu\text{g/mL}$) foram citotóxicos nas mesmas concentrações para o parasito e para a célula hospedeira, o que indica uma ação antiparasitária inespecífica para estas espécies. Sendo assim, apenas o óleo de folhas de *C. densiflorus* foi ativo contra o *T. cruzi*, o qual inibiu o crescimento de 50% das células apenas na concentração de $230 \mu\text{g/mL}$.

Além disso, é importante relatar que grande parte dos trabalhos analisa primeiramente o efeito antiparasitário e somente após esse resultado, a citotoxicidade é avaliada. Com isso, é possível que as concentrações que são eficazes contra o *T. cruzi*, também provoquem um efeito nocivo às células hospedeiras. Fato este que foi observado concomitante em nosso estudo e, portanto, os compostos que ocasionaram morte tanto do parasito quanto das células hospedeiras foram considerados inativos (ANDRADE *et al.*, 2015).

Na avaliação da citotoxicidade sobre células Vero para os óleos pesquisados por Azeredo *et al.* (2014), foram encontrados valores variando em torno de 50 a $280 \mu\text{g/mL}$, respectivamente para as espécies mais e menos tóxicas. Apesar dessa grande variação em relação à toxicidade, valores de índice de seletividade muito próximos, entre 1,9 a 2,6, foram obtidos. Este índice é calculado através da divisão da concentração capaz de inibir o crescimento de 50% do parasito pela concentração de inibição de 50% das células viáveis, o que indica que as concentrações que foram eficazes contra o *T. cruzi* também foram tóxicas para as células do hospedeiro, visto que o índice apresentou valores baixos. Quando comparamos esse valor, pode-se perceber que o óleo de *C. densiflorus* também foi pouco seletivo ($IS = 3,8$), demonstrando uma margem pouco segura para seu uso.

Segundo Barros *et al.* (2016), o óleo essencial de *L. camara* revelou uma CI_{50} contra *T. cruzi* equivalente a $201\mu\text{g/mL}$ e uma toxicidade de $301\mu\text{g/mL}$ ($IS = 1,5$). Ao compararmos com os valores encontrados em nosso estudo, podemos presumir que a atividade tripanocida do óleo de *C. densiflorus* foi significativamente maior. No entanto, esta potencial ação pode estar relacionada ao efeito tóxico encontrado para este óleo, o qual foi mais atenuante do que para espécie *L. camara*. Sendo assim, uma melhor relação pode ser feita através dos valores do índice de seletividade, 1,5 e 3,8, respectivamente para as espécies *L. camara* e *C. densiflorus*, o que demonstra que ambos os óleos foram poucos seletivos.

É importante ressaltar, no entanto, que os dados *in vitro* e *in vivo* nem sempre revelam uma correlação direta, uma vez que outras propriedades farmacológicas dos compostos selecionados e/ou dos seus produtos metabólicos podem obscurecer a distinção entre eficácia e toxicidade quando são utilizados modelos experimentais (SCHMIDT *et al.*, 2012a). Dessa forma, têm sido demonstradas que altas concentrações de óleo essencial de *C. citratus* no tratamento de camundongos não produzem efeitos tóxicos (COSTA *et al.*, 2011). Isto indica que os óleos essenciais ou seus constituintes majoritários devem apresentar melhor atividade *in vivo* do que *in vitro*, revelando atividade sobre infecções parasitária e ausência de citotoxicidade (ARRUDA *et al.*, 2009). Sendo este exemplar pertencente ao mesmo gênero da espécie ativa em estudo, espera-se que o óleo de *C. densiflorus* apresente comportamento similar, ou seja, um menor efeito tóxico *in vivo* sobre as células hospedeiras.

Neste contexto, experimentos *in vivo* deixaram de ser realizados porque o composto apresentou alta citotoxicidade contra células de mamífero, quando normalmente avaliada em paralelo com os ensaios de atividade antiprotozoária. Deve-se enfatizar, entretanto, que os índices de seletividade são importantes para uma orientação geral, mas não devem ser vistos como um critério absoluto para decidir se um composto deve ser transferido para um modelo animal. Existem exemplos de compostos que apresentaram um índice de seletividade (IS) muito favorável *in vitro*, mas que se revelaram inativos ou mesmo tóxicos para os animais. Por outro lado, existem também exemplos de compostos com atividade *in vitro* e IS moderado que se revelaram ativos e menos tóxicos *in vivo*. Tal exemplo é a lactona sesquiterpênica, helenalina, que apresentou uma elevada atividade *in vitro* contra *T. brucei* (CI_{50} $0,05\ \mu\text{M}$) e um IS

moderado (IS = 20) (SCHMIDT *et al.*, 2002). No entanto, os testes *in vivo* com este composto mostraram que era tóxico para os animais e que também não havia efeito tripanocida. No caso da lactona cinaropicrina, esta apresentou uma CI_{50} *in vitro* menos impressionante (0,3 μ M) em comparação com a helenalina e um IS que foi ainda menor. Contudo, ensaios *in vivo* demonstraram que esta substância reduz eficazmente a parasitemia em animais infectados (ADAMS *et al.*, 2010). Dessa forma, uma elevada atividade e seletividade *in vitro* não são certamente o fator determinante, especialmente se apenas uma linha de células de mamífero foi utilizada para a determinação da citotoxicidade, como é frequentemente o caso (SCHMIDT *et al.*, 2012b). Posto isto, sugere-se a avaliação do potencial anti-*T. cruzi* *in vivo* do óleo de *C. densiflorus* para extrapolação do modelo utilizado e posterior comparação dos resultados obtidos.

Além disso, outra alternativa que seria possível para melhorar a segurança no uso deste óleo no tratamento da doença de Chagas é a veiculação do mesmo em sistemas nanoestruturados, os quais necessitam de doses menores para reproduzir um mesmo efeito biológico. Sendo assim, esta perspectiva também foi alvo de nosso estudo nos capítulos 3 e 4, com o intuito de comprovar as vantagens apresentadas pelas nanoformulações, bem como, demonstrar que este óleo é um candidato potencial na pesquisa para a quimioterapêutica tripanocida.

4.5. Teste de permeabilidade de membrana

4.5.1. Citometria de fluxo

Em relação ao modo de atuação, a atividade dos óleos essenciais pode estar associada à lipofilia de seus constituintes, característica que permite sua passagem através da membrana celular e uma vez dentro das células, pode interagir com uma variedade de proteínas, formando ligações covalentes com resíduos de aminoácidos, inativando enzimas e afetando certo número de atividades celulares (AZEREDO *et al.*, 2014). Além disso, já foi relatado anteriormente que IBE demonstram forte efeito contra o *T. cruzi* e qualquer ação dos óleos essenciais nesta molécula pode desencadear um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática do parasito, levando a alterações na homeostase intracelular (ANDRADE *et al.*, 2015). Sendo assim, a membrana plasmática revela ser um alvo de ação contra a célula parasitária e com o intuito de

identificar se o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* age nessa estrutura, foi realizado o estudo sobre a permeabilidade de membrana do parasito.

De acordo com a figura 12, um aumento dose-dependente na permeabilidade da membrana plasmática do parasito foi encontrado após tratamento com o óleo essencial e essa diferença foi estatisticamente significativa a partir de concentrações superiores a 30 µg/mL do óleo essencial em relação ao controle não tratado. Este resultado também foi demonstrado para o citral, composto encontrado no óleo essencial de *C. citratus* que possui efeito tripanocida possivelmente pela indução de lise das membranas do parasito (SANTORO *et al.*, 2007c). Afirmção semelhante pode ser dita sobre um terpeno derivado do ácido betulínico, adicionalmente à observação de perda da integridade da membrana e vacuolização citoplasmática, o que caracteriza a morte do parasito por necrose (MOREIRA *et al.*, 2016). Além disso, em estudo conduzido por Bombaça *et al.* (2018), um sesquiterpeno extraído de *Drimys winter* revelou uma permeabilização de epimastigota dose-dependente com aumento de mais de 50% de células marcadas positivamente pelo IP. Proporção similar de fluorescência foi quantificada para um diterpeno isolado de *Baccharis retusa* (UENO *et al.*, 2018), para diterpenos clerodanos proveniente de *Casearia sylvestris* (BOU *et al.*, 2014) e para o (-)-elatol, sesquiterpeno obtido através de microalgas vermelhas *Laurencia dendroidea* (DESOTI *et al.*, 2012).

Em contraste, Sülsen *et al.* (2016) encontraram um número de células apoptóticas aumentado, ou seja, elevada marcação por Anexina V em vez de IP, durante a ação de lactonas sesquiterpênicas sobre o parasito. Ademais, na pesquisa feita com geranilgeraniol, álcool terpênico extraído de *Pterodon pubescens*, foi observada a manutenção da integridade da membrana do *T. cruzi*, uma vez que as células não foram marcadas pelo IP (MENNA-BARRETO *et al.*, 2008). Permeabilização da superfície plasmática também não foi afetada pela lactona sesquiterpênica deoximikanolido (PUENTE *et al.*, 2019). Apesar da diferença entre a forma de ação, todos esses achados reforçam que os terpenóides podem ser agentes tripanocida potentes e seletivos.

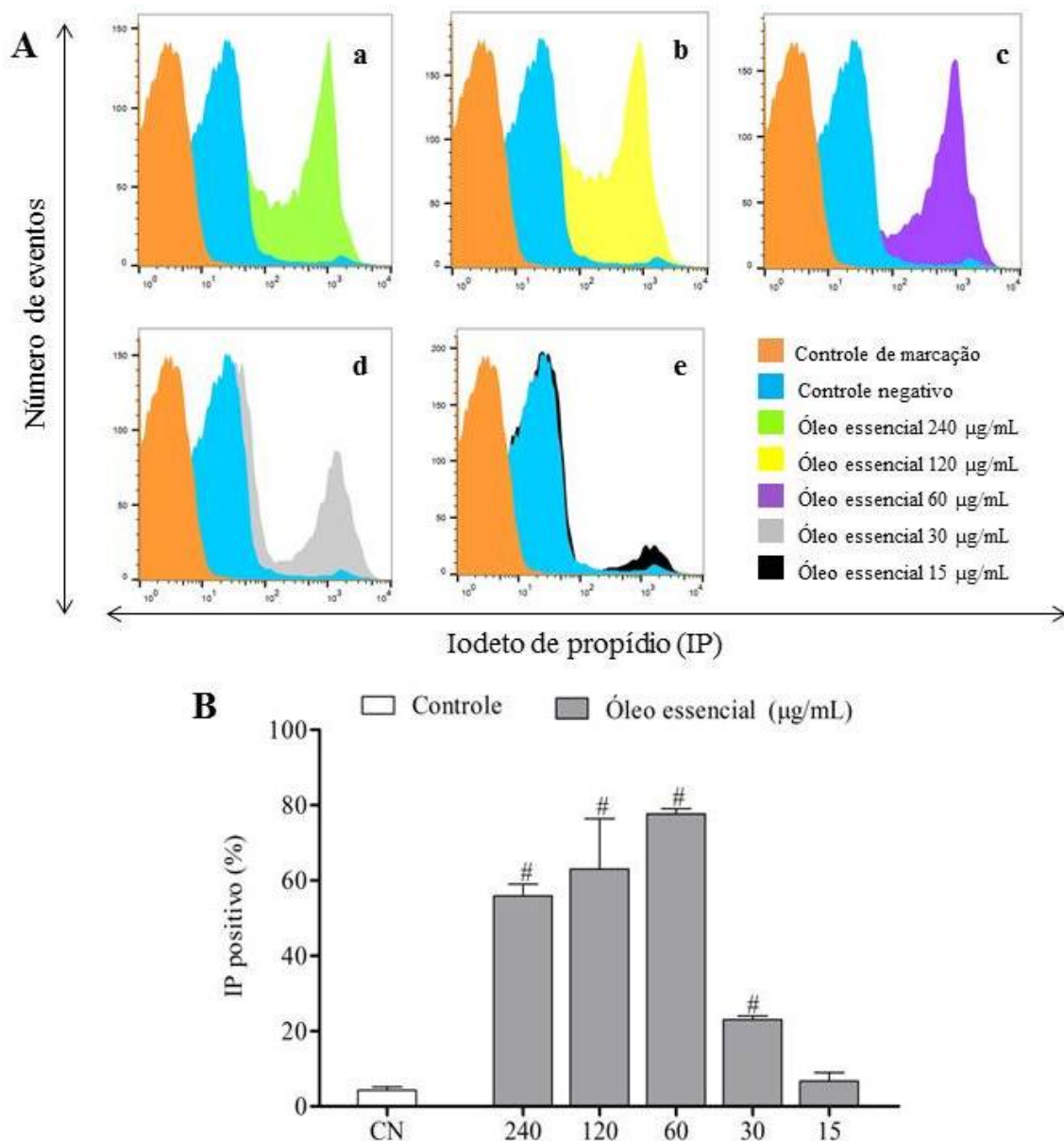


Figura 12: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática do parasito *Trypanosoma cruzi* após tratamento nas diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* representada por histogramas (A) e barras (B). a) OE 240 $\mu\text{g/mL}$; b) OE 120 $\mu\text{g/mL}$; c) OE 60 $\mu\text{g/mL}$; d) OE 30 $\mu\text{g/mL}$; e) OE 15 $\mu\text{g/mL}$; IP – Iodeto de propídio; CN – Controle negativo. [#]Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$.

Ação sobre a permeabilização da membrana plasmática também é induzida por compostos não terpênicos. Um estudo comparando a ação do nitrofurano clinicamente disponível, Nifurtimox, e compostos heterocíclicos contendo N-óxido revelou que todos os tratamentos elevaram o índice do marcador de integridade de membrana e, portanto, seriam capazes de induzir a necrose do parasito (BENÍTEZ *et al.*, 2014). Este resultado também foi previamente descrito para 1,4-cramoll, lecitina isolada a partir da *Cratylia*

mollis, quando comparada com a digitonina, a qual já tem descrito seu uso para permeabilizar a membrana plasmática de tripanossomatídeos (FERNANDES *et al.*, 2010). De forma semelhante, solumarina, cumarina obtida através de *Calophyllum brasiliense*, (REA *et al.*, 2013) e uma neolignana proveniente de *Nectandra leucanta* (GRECCO *et al.*, 2017) demonstraram permeabilidade dose-dependente da superfície plasmática, com um aumento significativo dos níveis de fluorescência.

O tratamento das formas tripomastigotas com naftofuranquinonas pode levar ao aumento do número de vacúolos citoplasmáticos, intensa dilatação do envelope nuclear e ruptura da membrana plasmática (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009a). Além disso, dados adquiridos através da citometria de fluxo demonstraram uma alta porcentagem de parasitos marcados com IP, fato este que também foi encontrado em nosso estudo e confirma a presença de danos na membrana plasmática. Similarmente, aumento desta marcação foi observado por Meira *et al.* (2015) em culturas tratadas com o extrato etanólico de *Physalis angulata* e por Cortes *et al.* (2015) após adição de derivados do ácido gálico, caracterizando a morte celular do parasito por necrose.

Diante desses relatos, pode-se sugerir que o modo de ação do óleo essencial de *C. densiflorus* está possivelmente relacionado à perda da integridade da membrana plasmática, induzindo, assim, a morte celular pelo processo de necrose.

4.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Formas do *T. cruzi* foram tratadas com o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, processadas e analisadas pela MET a fim de se verificar os resultados obtidos no teste de permeabilidade de membrana utilizando citometria de fluxo. Conforme pode ser observada na figura 13, formas amastigotas extracelulares redondas a partir de formas tripomastigotas metacíclicos foram obtidas, fato este que já foi descrito por outros autores (NAVARRO *et al.*, 2003; RONDINELLI *et al.*, 1988; KIMURA *et al.*, 1978, PAN 1978). Sendo assim, uma estrutura normal foi encontrada para as células não tratadas. Em contrapartida, o tratamento com o óleo provocou um intenso enrugamento da superfície do parasito, bem como, uma desorganização da membrana plasmática, levando ao rompimento dessa estrutura e disseminação do conteúdo intracelular da membrana. Esses efeitos podem ocorrer provavelmente devido a mudanças na composição química da membrana do parasito e já foram previamente

observados após tratamento com inibidores da biossíntese de esterol (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009; BRAGA *et al.*, 2005; SANTA-RITA *et al.*, 2005).

Além disso, verificou-se o aparecimento de vacúolos vazios nas células tratadas, os quais também se fizeram presentes em estudo realizado por Veiga-Santos *et al.* (2012) após tratamento com posaconazol. De acordo com os autores, estas estruturas são similares a autofagossomas, os quais são originados através de um processo de autofagia e ocorre provavelmente devido à reciclagem de membranas anormais durante o processamento de organelas. Esse mecanismo levou à morte celular a partir da degradação ativa dos componentes celulares necessários para sobrevivência do parasito. Outros estudos também descrevem a presença de vacúolos autofágicos em todas as formas do parasito tratadas com diferentes IBE e análogos de lisofosfolípídeo (BRAGA *et al.*, 2005; SANTA-RITA *et al.*, 2005; LAZARDI *et al.*, 1990).

Por outro lado, é sabido que a necrose causa perda do balanço osmótico, rompimento da membrana plasmática e aumento da vacualização citoplasmática, os quais são vacúolos claros provavelmente causados por autodigestão (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009a). Estas características também foram retratadas a partir do uso do óleo sobre o parasito, sugerindo, assim, a interação de ambos os processos de morte celular programada. Segundo Anjos *et al.* (2016), um derivado de β -lapachona desencadeiou a erradicação do *T. cruzi* com envolvimento tanto de apoptose quanto necrose induzida por autofagia, o que confirma a possibilidade da ocorrência concomitante de ambos os processos.

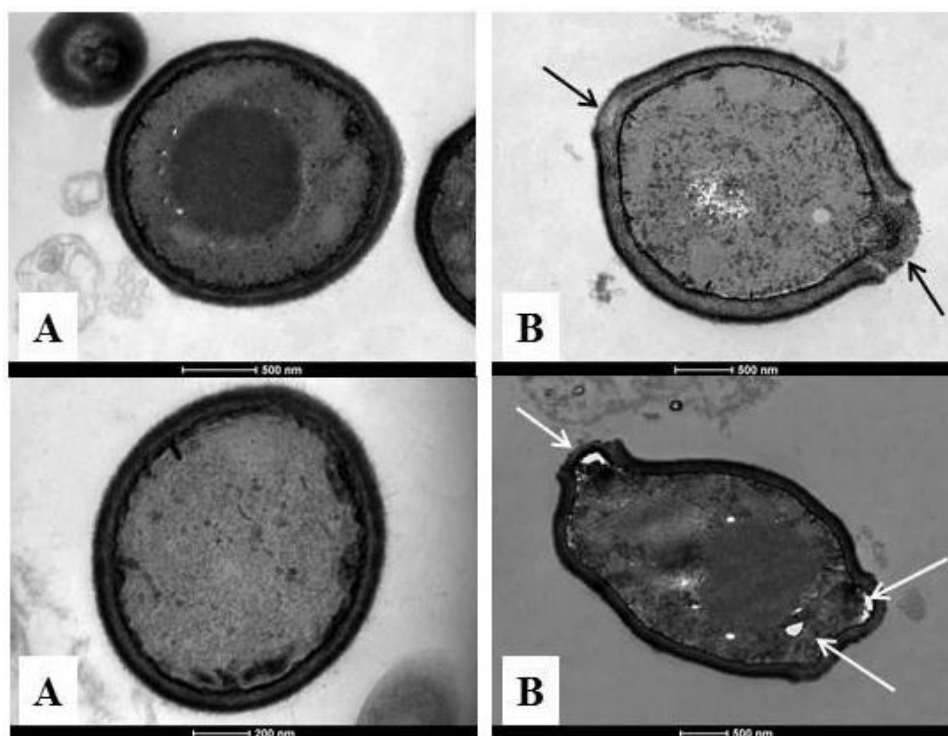


Figura 13: Análise através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) do parasito *Trypanosoma cruzi* sem tratamento (A - Controle negativo) e após tratamento com óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (B). Seta preta: ruptura da membrana plasmática; Seta branca: presença de vacúolos citoplasmáticos.

Adicionalmente, a análise por MET realizada por Ceole *et al.* 2018 demonstrou que análogos de quinina induziam uma marcada vacuolização do cinetoplasto de amastigotas intracelulares e tripomastigotas. No entanto, o surgimento dessas estruturas ocorreu próximo da membrana da bolsa flagelar, o que indica ser o vacúolo contrátil. Com isso, é possível que estes compostos estejam influenciando o sistema osmorregulatório do parasita.

Produtos naturais também vêm mostrando seu papel no combate à doença de Chagas. Epimastigotas tratados com a própolis brasileira sofreram alterações na membrana plasmática, edema mitocondrial, vacúolos alterados e formação de figuras de mielina. Em adição, mudanças no conteúdo dos reservossomas sugerem que o extrato de própolis compromete a biossíntese de lipídeos em *T. cruzi*, afetando, conseqüentemente, as propriedades biofísicas da membrana plasmática que podem levar a lise do parasito (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). Similar fenotipo morfológico foi observado após incubação do parasito com sesquiterpenóides extraídos a partir de *Drimys winter* e *Podanthus mitiqui* (BOMBAÇA *et al.*, 2018). Corroborando com estes resultados, deoximikanolido, lactona sesquiterpênica isolada de *Mikania* spp., induziu

uma intensa vacualização e formação de estruturas semelhantes a autofagossomas (PUENTE *et al.*, 2019).

Sendo assim, é notória a variedade de alterações descritas anteriormente e apesar de que o mecanismo de ação do óleo de *C. densiflorus* não esteja completamente elucidado, essas imagens juntamente com os dados da citometria de fluxo sugerem que o seu efeito antiproliferativo sobre o parasito pode estar relacionado a uma ação na sua membrana plasmática de forma semelhante ao observado para os IBE. Posaconazol assim como outros antifúngicos são exemplares dessa classe e atuam interferindo a biossíntese do ergosterol a partir do acúmulo de precursores de esterol metilado, os quais são caracterizados por desestruturar a integridade das bicamadas fosfolipídicas e tem revelado efeitos supressivos contra infecções por *T. cruzi* (URBINA, 2009; URBINA & DOCAMPO, 2003). Informação adicional pode ser dita de acordo com o estudo feito por nosso grupo de pesquisa (dado não publicado), o qual demonstrou a ação deste óleo na superfície plasmática de *Candida albicans*, fungo que, assim como o *T. cruzi*, possui o ergosterol como principal componente da membrana. Esses relatos indicam, portanto, que o óleo poderia atuar pelo mesmo modo de ação dos IBE, embora a análise *in silico* tenha revelado baixo potencial em inibir a síntese desse esterol. No entanto, estudos mais específicos quanto essa via de atuação se fazem necessários. Outra alternativa que também vem ganhando destaque é o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados com o intuito de aumentar a eficácia dos ativos a partir da melhora da biodisponibilidade e, conseqüentemente, da redução de dose e efeitos colaterais, sendo esta estratégia alvo de estudo dos capítulos seguintes.

5. CONSIDERAÇÕES

O rendimento dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas e flores de *C. densiflorus* e *M. leucadendron* e somente das folhas de *C. nardus* e *M. graveolens* variou entre 0,1 a 1,9%. De acordo com este estudo foi possível caracterizar em mais de 90% a composição química destes óleos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os constituintes majoritários.

Na análise da atividade anti-*T. cruzi* *in silico* foram relatados onze possíveis efeitos biológicos e mecanismo de ação das principais substâncias de cada óleo essencial, em que todos se revelaram ativos. Com destaque para a inibição da proteína dissulfeto redutase (Glutathione), que apresentou os maiores valores.

A triagem da atividade biológica *in vitro* contra o *T. cruzi* desses seis diferentes óleos essenciais demonstrou que somente o óleo obtido a partir de folhas de *C. densiflorus* apresentou ação antiparasitária eficaz, com CI_{50} igual a 60 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a citotoxicidade dessa amostra foi relativamente alta o que indica um baixo índice de seletividade ($IS=3,8$).

Avaliação do efeito deste óleo essencial sobre a integridade da membrana plasmática do parasito revelou um aumento significativo de permeabilidade em relação ao controle não tratado. Fato este que foi observado tanto pela análise por citometria de fluxo quanto pela microscopia eletrônica de transmissão, sugerindo que esta estrutura é um forte candidato alvo para o efeito antiparasitário apresentado pelo óleo.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência que trata do projeto, produção e aplicação de materiais em nanoescala (BLECHER, NASIR & FRIEDMAN, 2011; HUH & KWON, 2011). O uso da nanotecnologia como uma estratégia para combater diferentes patógenos tem ganhado importância e o foco de pesquisadores (Figura 14) (SANS-SERRAMITJANA *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2010).

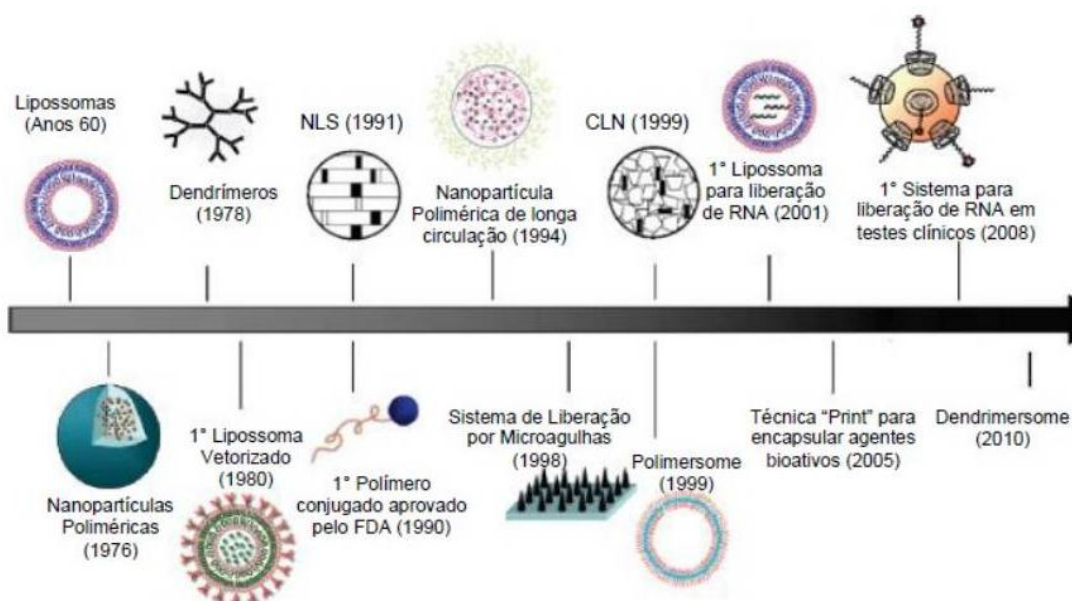


Figura 14: Linha do tempo de sistemas de liberação de fármaco obtidos através da nanotecnologia, destacando algumas formulações de escala nanométrica que foram marcos importantes ao longo da história (Traduzido de SHI *et al.*, 2010).

Esses sistemas apresentam vantagens sobre a medicina convencional, como proteção contra a degradação do ativo formulado, liberação do fármaco de forma gradual e controlada, tamanho reduzido, área superficial elevada, possibilidade de modificação estrutural e funcional do sistema, aumento da biodisponibilidade e redução dos efeitos colaterais (BLECHER, NASIR & FRIEDMAN, 2011; ZHANG, 2010; COUVREUR & VAUTHIER, 2006; ROCO, 2001; VERMA & GARG, 2001). Além disso, sabe-se que uma das características dos carreadores nanoestruturados é a interação significativa com microorganismos, o que favorece a passagem de ativos através de barreiras físicas produzidas pelos patógenos (SANS-SERRAMITJANA *et al.*, 2015).

Diferentes exemplos de sistemas de liberação de fármacos de tamanho nanométrico têm sido desenvolvidos como, por exemplo, nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas metálicas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas híbridas de polímeros lipídicos, sistemas micelares, nanoestruturas compostas de carbono puro (nanotubos, nanofolhas e nanobastões de carbono), entre outros (VOLPEDO *et al.*, 2019; KALHAPURE *et al.*, 2015; SAHARMA *et al.*, 2012; HUH & KWON, 2011; ZHANG, 2010)

Apesar dos diversos usos no combate de doenças, os óleos essenciais apresentam algumas limitações físico-químicas relacionadas à sua hidrofobicidade, volatilidade e reatividade. Sendo assim, produtos naturais encapsulados em sistemas nanoestruturados têm sido investigados como uma alternativa para melhorar a estabilidade e a eficácia destes ativos através da redução de dose e, por conseguinte, dos efeitos tóxicos (MOGHIMI *et al.*, 2016). Na literatura já estão descritos importantes estudos que comprovam o aumento do potencial biológico de ativos que utilizaram a tecnologia de nanoestruturas (LOPES *et al.*, 2016; BHAWANA *et al.*, 2011; LIOLIOS *et al.*, 2009). Além disso, em revisão realizada por El Asbahani *et al.* (2015) diferentes aplicações de nanopartículas carregadas com óleo essencial foram descritas, como potencial larvicida, antimicrobiana, antioxidante, inseticida, repelente, preservação de alimentos e tratamento de doenças digestivas. No entanto, neste caso nenhuma pesquisa investigando a atividade tripanocida para óleos nanoparticulados foi descrita, fato este que reforça a importância do presente estudo.

1.2. Sistemas nanoestruturados para o tratamento da doença de Chagas

No tratamento da doença de Chagas, o BZ permanece como o fármaco de escolha e, na América Latina, é a única terapia disponibilizada. Entretanto, este composto tem exibido atividade insuficiente na fase crônica da doença, o que requer um tratamento prolongado. Como consequência a esta condição, a incidência de reações adversas e efeitos tóxicos têm sido relatados, o que acarreta no abandono do tratamento em um percentual significativo de pacientes. Além disso, características físico-químicas, como baixa solubilidade em água e, portanto, biodisponibilidade reduzida intensificam a problemática do seu uso.

Com o objetivo de contornar essas barreiras, diversos sistemas nanoestruturados contendo BZ já foram obtidos (FERRAZ *et al.*, 2018). Complexação com ciclodextrinas é uma das mais frequentes estratégias aplicadas para encapsular este fármaco. Leonardi, Bombardiere & Salomon (2013) avaliaram a influência da inclusão de BZ em betaciclodextrina sobre sua solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade. Aumento da taxa de dissolução também foi observado para misturas contendo BZ em diferentes polímeros como polivinilpirrolidona (PVP K-30) e polietilenoglicol (PEG 6000) (LIMA *et al.*, 2011). Rambo, Britta & Nakamura (2015) desenvolveram nanopartículas de BZ a partir do copolímero polietilenoglicol e polilactídeo (PEO 2000-PLA 1400) usando o método de nanoprecipitação. Estudo feito por De Melo *et al.* (2013) uniu ambas tecnologias, estruturas ciclodextrinadas e poliméricas, para encapsular o BZ. Neste caso, o mecanismo de interação entre diferentes polímeros hidrofílicos (PEG 1500, 4000 e 10000; HPMC, PVA, PVP e Poloxamer 407) e trietanolamina em solução contendo betaciclodextrina foi avaliado. Outra inovação é a produção de estruturas orgânicas de metal (EOM), conforme descrito por Rolim-Neto *et al.* (2016). EOM pertence a uma nova classe de polímeros e tem sido utilizado como um adjuvante para modular e vetorizar a liberação de fármacos antichagásicos. Em adição, Morilla *et al.* (2002) avaliaram uma série de matrizes lipídicas para formular BZ em lipossomas. Carreadores lipídicos, nanopartículas lipídica sólida, lipossomas, quatsomas e ciclodextrinas foram desenvolvidos por Vinuesa *et al.* (2017) com o intuito de potencializar a atividade tripanocida do BZ.

Além do uso do fármaco de referência, outros princípios ativos também já foram encapsulados com o intuito de potencializar sua ação contra o *T. cruzi* (VOLPEDO *et al.*, 2019). Etanidazol foi encapsulado em lipossomas pH-sensíveis e foi demonstrada uma liberação seletiva para o citoplasma de células fagocíticas, o que aumentou sua eficácia (MORILLA *et al.*, 2005). Atividades *in vitro* e *in vivo* de formulações contendo anfotericina contra infecções do *T. cruzi* foram avaliadas por Yardley & Croft (1999). A interação de benzidrazida de 5-nitro-2-furfurililideno com soluções micelares mostrou ser mais ativa do que o fármaco de escolha (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2007). Carneiro *et al.* (2014) demonstraram que ditiocarbazato de S-benzilo carreado em nanopartículas lipídicas sólidas foi efetivo em reduzir a carga parasitária em animais infectados, bem como, amenizar o processo inflamatório. Ácido ursólico carreado em nanopartículas de

policaprolactona também revelaram eficácia *in vivo* similar ao padrão BZ (ABRIATA *et al.*, 2017). Além disso, o potencial de nanopartículas metálicas, particularmente de ouro e prata, contra diferentes espécies de *Trypanosoma* pode ser destacado (ADEYEMI *et al.*, 2018).

No entanto, a maioria desses estudos restringe-se apenas a avaliação das propriedades físico-químicas antes e após encapsulamento do BZ, o que dificulta a confirmação se o seu potencial tripanocida seria reproduzido. Sendo assim, apesar das inúmeras tentativas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para combater a doença de Chagas, até hoje nenhum produto foi efetivamente obtido e o BZ na forma de comprimido permanece como primeira opção para a terapêutica chagásica, embora suas desvantagens já sejam conhecidas. Esta realidade impulsiona, portanto, a pesquisa de novas nanoestruturas, bem como, o efeito sinérgico entre novos fármacos e os comercialmente disponíveis.

1.3. Nanoemulsão

Entre os sistemas de entrega de fármacos existe um grande interesse no desenvolvimento de nanoemulsões devido à sua estabilidade física maior do que as emulsões convencionais, além de biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de preparação (KALHAPURE *et al.*, 2015). Nanoemulsões são dispersões translúcidas com tamanho de partícula variando de 50 a 500 nm, além de serem termodinamicamente estáveis por longos períodos de tempo. Este fato ocorre devido à presença do movimento Browniano, o qual está relacionado ao movimento intrínseco das gotículas e é suficiente para superar a gravidade e evitar processos de instabilidade como coalescência ou floculação (VARGAS *et al.*, 2017; BAJERSKI *et al.*, 2016; DONSI & FERRARI, 2016; ANWER *et al.*, 2014).

Geralmente, nanoemulsões consistem em duas fases imiscíveis, em que uma das fases está dispersa em partículas nanométricas na outra, com o auxílio de um surfactante (DONSI & FERRARI, 2016; MCCLEMENTS, 2011). De acordo com a fase externa, esses sistemas podem ser classificados em O/A e A/O (Figura 15). A adição de surfactantes anfílicos atua como estabilizador e implica inúmeras vantagens. Em contrapartida, a concentração dessas estruturas é um fator crítico, uma vez que níveis altos podem causar citotoxicidade sistêmica e tópica (AZEEM *et al.*, 2009). Outro fator

importante é a seleção de um tensoativo com o valor correto do equilíbrio hidrofílico-lipofílico para manter a estabilidade do sistema (KOMMURU *et al.*, 2001). Sendo assim, os surfactantes podem ser divididos em não-iônicos e iônicos (catiônicos e aniônicos), sendo o primeiro considerado menos tóxico (LI *et al.*, 2015; ZIANI *et al.*, 2011; AZEEM *et al.*, 2009).

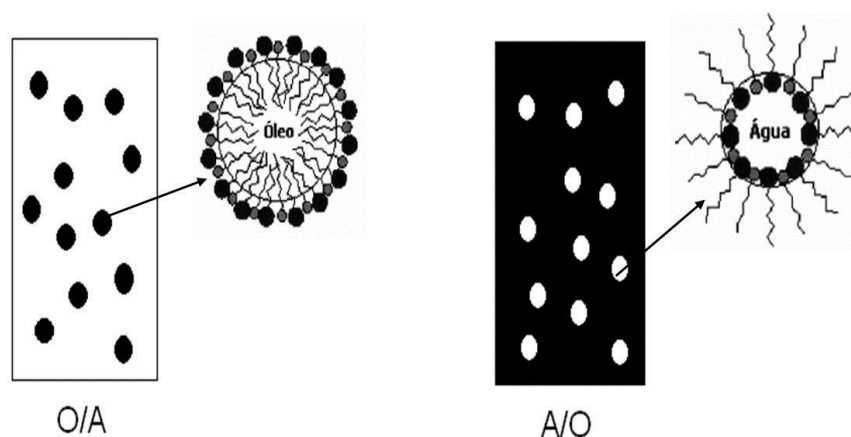


Figura 15: Representação esquemática de nanoemulsões do tipo O/A e A/O (Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A formação de nanoemulsões pode ser alcançada através de duas abordagens, a primeira inclui homogeneização de alta energia usando dispositivos mecânicos especializados, tais como misturadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, sonicadores ou micro fluidificadores, os quais têm a capacidade de gerar forças disruptivas intensas que quebram a fase oleosa em minúsculas gotas de óleo durante o processamento. A segunda opção é conhecida como método de baixa energia e inclui emulsificação espontânea, temperatura de inversão de fase, ponto de inversão de fase e composição de inversão de fase (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016; CHANG & MCCLEMENTS, 2014; MCCLEMENTS, 2011). Esses métodos são baseados na organização espontânea do surfactante em torno das moléculas de óleo essencial, impulsionadas por diferentes forças que tendem ao equilíbrio termodinâmico (DONSÌ & FERRARI, 2016). O tamanho e a estabilidade das gotas podem ser controlados por fatores de mudança, como temperatura, pH, força iônica e relação surfactante-óleo (RSO) (OH *et al.*, 2017; CHANG & MCCLEMENTS, 2014; MCCLEMENTS, 2011). Além disso, estudos anteriores mostraram que as condições de operação do homogeneizador (pressão e tempo de passagem), bem como, a composição da amostra

(tipo de óleo e concentração) também são importantes na abordagem de alta energia (QIAN & MCCLEMENTS, 2011).

Estudo feito por Restrepo *et al.* (2018) demonstrou que a média de distribuição do tamanho de partícula é altamente dependente dos valores da RSO, a qual diminui quando esta relação é aumentada. Sendo assim, gotículas menores tem uma área superficial maior e, portanto, requerem mais surfactantes (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016; OSTERTAG, WEISS & MCCLEMENTS, 2012). Em adição, o impacto da pressão do microfluidizador e o número de passos sobre o tamanho médio de partícula foi avaliado por Wan *et al.* (2019), sendo possível observar que os menores valores de tamanho estavam relacionados a maior quantidade de passos, bem como ao aumento de pressão de 5000 para 10000 psi.

Sendo assim, nanoemulsões são mais estáveis e tem apresentado atividades biológicas potencializadas do componente lipofílico encapsulado devido ao seu tamanho de partícula reduzido e ao aumento da solubilidade (DONSÌ & FERRARI, 2016). Nanoemulsões contendo óleo essencial de *C. flexuosus* exibiram propriedade antimicrobiana significativa, com valores de concentração inibitória mínima menor do que aqueles apresentados pelo óleo livre (GÜNDEL *et al.*, 2018; ROSSI *et al.*, 2017). A atividade inibitória de micotoxina foi consideravelmente potencializada pela forma nanoemulsionada dos óleos essenciais de tomilho, capim-limão, canela, pimenta-hortelã e cravo (WAN *et al.*, 2019). Uma significativa redução no número de formas de *Trypanosoma* foi observada em testes com nanoemulsões contendo óleo de *Carapa guaianiensis* e *Schimus molle* (BALDISSERA *et al.*, 2013). Forma nanoemulsionada do óleo de *Pterodon emarginatus* revelou atividade antiparasitária contra as espécies *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* (VALENTIM *et al.*, 2018).

1.4. Lipossoma

Os lipossomas são vesículas esféricas fechadas, organizadas em uma ou várias bicamadas fosfolipídicas concêntricas com uma fase aquosa interna. De acordo com o seu tamanho e lamelaridade podem ser classificados em: (1) vesículas multilamelares (MLV) com tamanho superior a 0,5 µm, (2) pequenas vesículas unilamelares (SUV) com um tamanho entre 20 nm e 100 nm e (3) grandes vesículas unilamelares (LUV)

com um tamanho maior de 100 nm (Figura 16) (SHERRY *et al.*, 2013). Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas capazes de se auto-organizar espontaneamente em meio aquoso. Além deste constituinte, os lipossomas convencionais também são compostos por lecitina e colesterol, os quais são naturais e considerados seguros. Sendo assim, estes sistemas apresentam vantagens por serem biodegradáveis, não tóxicos, não imunogênicos e biocompatíveis (ANWEKER, PATEL & SINGHAI, 2011).

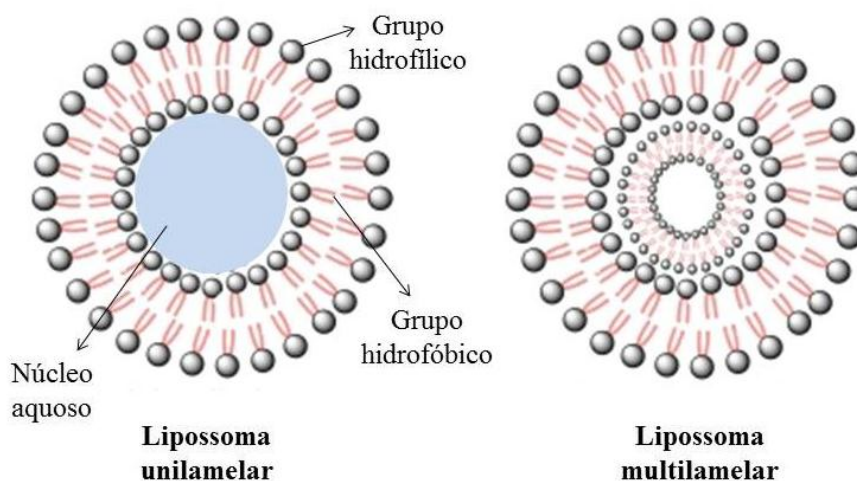


Figura 16: Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas, unilamelar e multilamelar (Traduzido de MISHARA *et al.*, 2011).

Em adição, esses sistemas são candidatos promissores para o encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água, uma vez que a estrutura das bicamadas lipídicas permite o carregamento de compostos lipofílicos e anfifílicos, bem como o de moléculas hidrofílicas no compartimento aquoso (COIMBRA *et al.*, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2010). Portanto, solubilização de compostos insolúveis e, conseqüentemente, aumento da biodisponibilidade e liberação de fármaco controlada também são características encontradas nesse sistema. No caso dos óleos essenciais, outras propriedades como redução da perda por volatilidade e instabilidade química na forma lipossomal tornam-se vantajosas (VALENTI *et al.*, 2001). Todos esses relatos fazem o encapsulamento de óleos essenciais em lipossomas uma alternativa para melhorar o potencial biológico devido principalmente ao seu tamanho subcelular que pode favorecer o mecanismo de absorção passiva das células (XIAO, YU & YANG, 2011).

Em revisão feita por Sherry *et al.* (2013) e El Asbahani *et al.* (2015) foram relatadas diversas técnicas para a preparação de lipossomas contendo óleo essencial, bem como, a caracterização desses sistemas. O método de hidratação do filme,

conhecido como o clássico método de Bangham, é usado para obter vesículas multilamelares com tamanho até poucos micrômetros (BANGHAM, DE GIER & GREVILLE, 1967). Entretanto, esta técnica produz vesículas grandes com distribuição de tamanho e lamelaridade heterogêneos. Com isso, várias propostas têm sido relatadas para obter lipossomas com tamanho uniforme e reduzido, através da conversão de MLV em SUV ou LUV. A sonificação e extrusão são os métodos mais comuns (PATIL & JADHAV, 2014). Metodologias empregando evaporação da fase reversa e a convencional tecnologia do fluido supercrítico também são descritas. O primeiro caso consiste na preparação de uma emulsão o/a através da mistura da fase orgânica fosfolipídica em uma fase aquosa e, posteriormente, o solvente orgânico é evaporado, dando origem as LUVs (DEAMER & BANGHAM, 1976). Já a segunda técnica não é aplicada diretamente para a obtenção de lipossomas, o que pode requerer várias modificações para o seu uso. Sendo assim, o método de hidratação do filme seguido por sonificação continua sendo a técnica mais utilizada para o propósito de encapsular óleos essenciais (SHERRY *et al.*, 2013).

O desempenho funcional dos lipossomas para diversas atividades biológicas já foi reportado na literatura. Cui *et al.* (2016) demonstraram que o óleo de canela exibe uma performance antibacteriana satisfatória sobre *S. aureus* MRSA e seu biofilme, sendo que a aplicação da forma lipossomal aumentou sua estabilidade e estendeu o tempo de ação. As vesículas lipídicas contendo óleo de *Thymus capitatus* foram altamente biocompatíveis e capazes de neutralizar o estresse oxidativo, bem como, favorecer o reparo de feridas em queratinócitos (MANCONI *et al.*, 2018). Carvacrol e timol, que são os compostos majoritários do óleo de *Origanum dictamnus*, revelou um aumento da atividade antimicrobiana após encapsulamento (SIVROPOULOU *et al.*, 1996). Esse efeito também foi indicado para o óleo de *Eucalyptus camaldulendis* na forma lipossomal em relação ao seu potencial antifúngico (MOGHIMIPOUR *et al.*, 2012). Óleo essencial de *Zanthoxylum tingoassuiba* contido tanto em estruturas multilamelares quanto unilamelares foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular de glioblastoma do que sua forma livre (DETONI *et al.*, 2012). Em adição, atividade anti-herpética do óleo de *Artemisia arborescens* foi potencializada quando incorporado em MLVs (SINICO *et al.*, 2005). No entanto, nenhum relato sobre as propriedades antiparasitárias de óleos essenciais encapsulados em lipossomas foi encontrado.

1.5. Micela

As micelas são outro tipo de nanomaterial que atraiu considerável atenção como potencial transportador de fármacos. Esses sistemas são geralmente agregados globulares, no entanto, também podem ser apresentados nas formas elipsoidais, cilíndricas ou em camadas. Além disso, essas estruturas podem ser baseadas em lipídios ou polímeros, como quitosana, condroitina ou polietilenoglicol (PEG) (WISSING, KAYSER & MÜLLER, 2004). A formação das micelas ocorre espontaneamente em soluções aquosas e são compostas de copolímeros anfipáticos (BLANKSCHTEIN, THURSTON & BENEDEK, 1986). A concentração de moléculas de surfactantes nas quais as micelas aparecem é denominada de concentração micelar crítica (CMC). O processo de micelização na água resulta de um delicado equilíbrio de forças intermoleculares, incluindo interações hidrofóbicas, estéricas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e van der Waals. A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado às cadeias do surfactante não polar, por outro lado, a força repulsiva está relacionada às interações estéricas e eletrostáticas entre as regiões polares (ISRAELACHVILI, 1991; TANFORD, 1980).

Pluronic[®] F127 ou Poloxamer 407 é um surfactante não iônico produzido através do bloco hidrofílico óxido de etileno e do bloco hidrofóbico óxido de propileno dispostos em uma estrutura tribloco (TAKÁTS *et al.*, 2001). Este copolímero foi selecionado para ser utilizado no presente estudo devido ao seu equilíbrio hidrofóbico-lipofóbico quando aliado a seus tamanhos reduzidos, além de ser considerado inerte para diversas vias de administração (Figura 17) (DE MORAIS *et al.*, 2019; ROWE *et al.*, 2005).

O método de preparação das soluções micelares depende da extensão da solubilidade do polímero em meio aquoso, sendo que copolímeros solúveis em água, como os Pluronic, são convertidos em micelas simplesmente dissolvendo-os em meio aquoso a temperatura normal ou elevada e em uma concentração acima do seu valor de CMC. Por outro lado, os surfactantes com baixa solubilidade em água são convertidos em micelas dissolvendo-os primeiro em um solvente orgânico miscível em água, com subsequente diálise ou evaporação do solvente orgânico (KORE *et al.*, 2014; ALLEN, MAYSINGER & EISENBERG, 1999; YOKOYAMA *et al.*, 1998). Além disso, o método de nanoprecipitação também pode ser aplicado, com posterior separação do

fármaco não encapsulado por centrifugação ou filtração, o qual é mais simples quando comparado com o processo de emulsificação (SCALISE *et al.*, 2016; GOU *et al.*, 2011; MONDON *et al.*, 2011). Recentemente, pesquisadores tem desenvolvido uma nova técnica para o preparo de micelas através da evaporação de fluido supercrítico usando dióxido de carbono (CHU *et al.*, 2009).

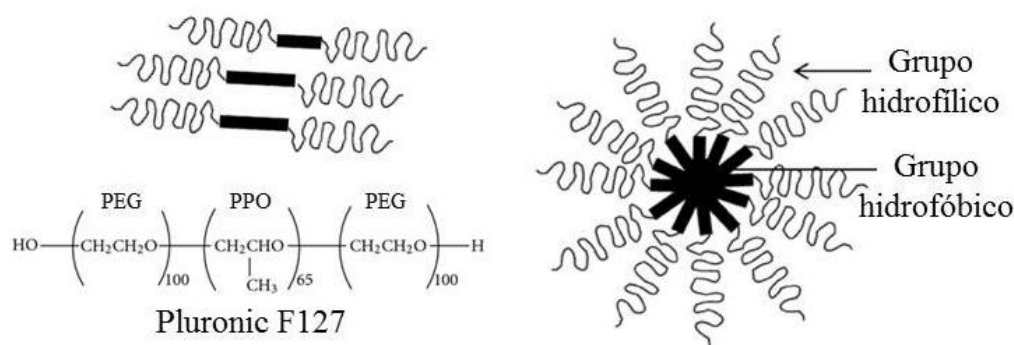


Figura 17: Representação esquemática da forma micelar a partir do polímero Pluronic F127 (Adaptado de JHAVERI & TORCHILIN, 2014).

A composição biocompatível dessa estrutura permite seu uso em alimentos, além de ser empregada como um sistema de entrega de fármacos (WANG *et al.*, 2018; MONTANHA *et al.*, 2017). Algumas formulações de terapia medicamentosa micelar já existem e possuem aprovação da *United States Food and Drug Administration* (USFDA) (KORE *et al.*, 2014; BERRY *et al.*, 1998). Sendo assim, estudos anteriores têm demonstrado a versatilidade e as vantagens de micelas para entrega de compostos hidrofóbicos, devido sua habilidade de aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água (RANGEL-YAGUI, PESSOA-JR & TAVARES, 2005; MALL, BUCKTON & RAWLINS, 1996). Além disso, o uso de soluções micelares pode ser vantajoso para fins de liberação de fármacos, com a possibilidade de melhorar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e outros efeitos colaterais, aumentar a permeabilidade através das barreiras fisiológicas e alterar a distribuição de fármacos (TORCHILIN, 2001).

No estudo de cicatrização de feridas cutâneas, observou-se que o tratamento com óleo essencial de *Croton zehntneri* na forma micelar reduziu o inchaço e o exsudado com uma magnitude semelhante ao tratamento com dexametasona. Além disso, uma aceleração do fechamento da ferida, com um número aumentado de fibroblastos e fibras

de colágeno também foi relatada (CAVALCANTI *et al.*, 2012). Formulação desenvolvida a partir de ftalocianina de zinco, óleo essencial de alho e Pluronic F127 foi efetiva na terapia fotodinâmica contra *Leishmania* spp. (DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA *et al.*, 2017). O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados a partir do Poloxamer 407 carregado de óleo essencial de alho e 8-methoxypsoralen é uma alternativa promissora ao tratamento de dermatoses quando comparada com sua formulação comercial (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

1.6. PLA-PEG

Os sistemas poliméricos incluem nanopartículas poliméricas, como nanocápsulas e nanoesferas, as quais são estruturas sólidas no estado coloidal. As nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica esférica, em que o composto ativo e o polímero são dispersos uniformemente. Por outro lado, as nanocápsulas têm uma morfologia composta por um núcleo oleoso ou aquoso e os compostos ativos são confinados por uma parede polimérica (Figura 18-A e B) (SÁNCHEZ, VILA-JATO & ALONSO, 1993; VERRECCHIA *et al.*, 1993). O método de preparação e a composição da fase orgânica podem favorecer a formação de uma ou de outra forma farmacêutica (CRUCHO, 2015). Sendo assim, a escolha de um método específico é geralmente determinada pelo tipo de polímero, pelas propriedades físico-químicas do fármaco e pelas características finais desejadas para esses sistemas.

Várias técnicas de preparação têm sido desenvolvidas com sucesso, sendo a precipitação dos polímeros um passo comum entre elas. De uma forma geral, esses métodos podem ser classificados em duas categorias: uma baseada na polimerização de monômeros e outra que utiliza polímeros pré-formados (ALLOUCHE, 2013). Dentre eles, podem-se destacar os sistemas baseados em emulsificação, que consiste basicamente na adição da solução orgânica polimérica em uma fase aquosa empregando técnicas de baixa ou alta energia como discutido previamente (CRUCHO & BARROS, 2017). Outra forma seria a aplicação do método de nanoprecipitação, também chamado de deslocamento de solvente, em que seu princípio é baseado na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento do solvente orgânico de uma solução lipofílica para a fase aquosa (FESSI *et al.*, 1989). Em contrapartida, essas técnicas utilizam solventes orgânicos que são nocivos se não eliminados completamente. Sendo assim,

flúidos supercríticos têm sido uma atrativa alternativa devido ao uso de uma tecnologia ambientalmente correta, fácil, reprodutível em larga escala, bom controle da uniformidade e alta pureza (ELIZONDO, VECIANA & VENTOSA, 2012).

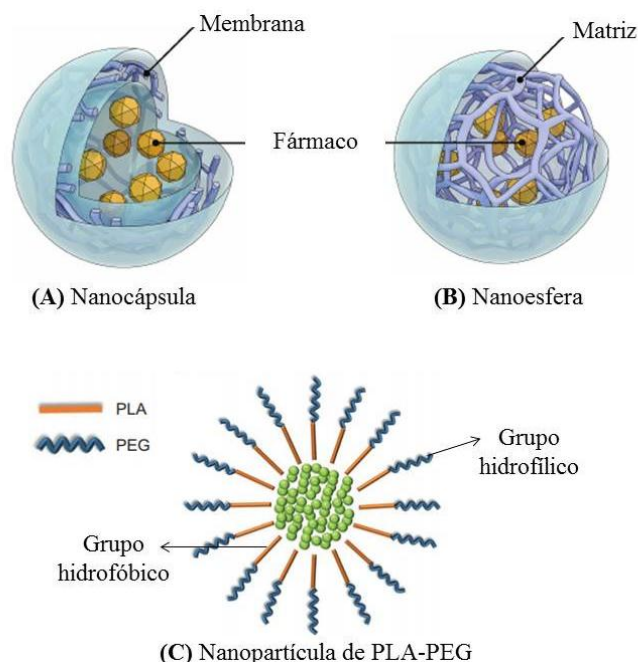


Figura 18: Representação esquemática de nanocápsula (A), nanoesfera (B) e nanopartícula formada pelos polímeros polilactídeo (PLA) e polietilenoglicol (PEG) (C) (Adapatado de SHALABY *et al.*, 2014; SUFFREDINI, EAST & LEVY, 2014).

No entanto, a maioria dos casos produz nanopartículas em uma forma de suspensão aquosa, a qual apresenta baixa estabilidade química e física. A liofilização tem sido o método de secagem mais comumente usado para superar essa problemática, melhorando sua estabilidade em longo prazo e facilitando o manuseio e armazenamento (ABDELWAHED *et al.*, 2006). Em adição, a purificação pós-síntese efetiva de nanopartículas também é uma etapa importante para controlar a qualidade e as características dos sistemas, bem como, para sua adequação em uma futura aplicação biomédica. Dependendo do método de preparação, várias impurezas como solventes orgânicos, sais, agregados de partículas e resíduos de reagentes estarão presentes. Esses resíduos são potencialmente tóxicos, sendo necessária a aplicação de técnicas de filtração, centrifugação, evaporação ou diálise para purificar as nanopartículas (DALWADI, BENSON & CHEN, 2005).

Alguns sistemas poliméricos já foram aprovados pelo FDA para serem usados no tratamento de uma ampla variedade de doenças (BALDISSERA *et al.*, 2016;

PRIOTTO *et al.*, 2009; BERRY *et al.*, 1998). Essa tecnologia de entrega de fármacos depende fortemente da biodegradabilidade e biocompatibilidade dos polímeros, o que permite serem completamente eliminados por vias metabólicas naturais (MARIN, BRICEÑO & CABALLERO-GEORGE, 2013). Poli-ε-caprolactona (PCL), poli(lactídeo) (PLA), polietilenoglicol (PEG) e poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) são exemplos de polímeros biodegradáveis que são frequentemente usados para a encapsulação de fármacos de baixa solubilidade (KHOEE & YAGHOUBIAN, 2009). Isto ocorre porque esses sistemas são compostos de uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, a qual permite a incorporação desses ativos no interior do seu núcleo (SHALABY *et al.*, 2014). Além disso, essas estruturas apresentam vantagens devido ao seu tamanho reduzido que possibilita sua circulação por um longo período de tempo e reduz a detecção e opsonização pelos macrófagos (GONG *et al.*, 2012; NISHIYAMA & KATAOKA 2006).

Sendo assim, partículas poliméricas são de grande interesse devido à diversidade de aplicabilidade e sua capacidade de agir como bio-condutores (GREINER *et al.*, 2006). Nanopartículas de PLA-PEG são um exemplo dessas estruturas e têm sido usadas como sistema de entrega de fármaco com alta eficiência de encapsulamento e pequeno tamanho de partícula (Figura 18-C) (GONG *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2009; VENKATRAMAN *et al.*, 2005). Rambo, Britta e Nakamura (2015) desenvolveram nanocápsulas de PEO (2000)-PLA (1400) contendo BZ e uma pequena concentração foi necessária para eliminar as formas tripomastigotas de *T. cruzi* em comparação com a substância livre. Licnofolida, lactona sesquiterpênica isolada de *Lychnophora trichocarpha*, encapsulada em nanopartículas de policaprolactona ou PLA-PEG apresentou maiores taxas de cura, reduziu a parasitemia e aumentou a sobrevivência de animais infectados por cepas de *T. cruzi* em concentrações até duas vezes menores do que as utilizadas para o BZ (BRANQUINHO *et al.*, 2014). Este mesmo perfil também foi demonstrado posteriormente por De Mello *et al.* (2016) a partir da administração oral desses sistemas de entrega de fármaco.

1.7. Alginato

Polímeros naturais são geralmente biocompatíveis, biodegradáveis, renováveis e não tóxicos (ABREU *et al.*, 2012; SENEL *et al.*, 2000). Além disso, assim como os

polímeros sintéticos, estas estruturas apresentam vantagens quanto ao aumento da estabilidade química dos fármacos, melhora da solubilidade em líquidos biológicos, controle da liberação e biodistribuição dos componentes ativos, bem como, melhora do tempo de circulação sanguínea e menor toxicidade sistêmica (MORRIS *et al.*, 2010; SUNDAR, KUNDU & KUNDU, 2010; RACOVITA *et al.*, 2009). Apesar de geralmente seu uso ser limitado devido às variações nas propriedades para lotes diferentes, além de poderem ser levemente imunogênicos, diferentes estudos já reportaram sua eficácia para carrear várias classes de fármacos (CRUCHO & BARROS, 2017; ANGSHUMAN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2007; AHMAD *et al.*, 2006; SARMENTO *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2005).

A técnica comum de preparação de nanopartículas a partir de polissacarídeos é baseada na emulsificação dessas estruturas em um solvente orgânico imiscível seguido da gelatinação do polímero (LETSUTTHIWONG & ROJSITTHISAK, 2011; MASALOVA *et al.*, 2013). Além disso, *spray-drying* tem sido amplamente usada para encapsular substâncias voláteis em matrizes poliméricas, dando origem tanto a micro quanto a nanopartículas (PAULA *et al.*, 2012; KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011; PAULA *et al.*, 2010a,b; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Dentre os polímeros naturais podemos destacar o alginato, o qual é extraído de várias espécies de algas marrons e possui propriedades únicas e notáveis, responsáveis por sua capacidade de formar géis, esferas, micro e nanopartículas (LI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012; ZHANG & SALSAC, 2012). Isto ocorre porque este composto é um biopolímero linear polianiónico constituído por blocos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico que podem interagir com os cátions divalentes, formando complexos (GRANT *et al.*, 1973) (Figura 19). Esses segmentos estão dispostos em um padrão de blocos ao longo da cadeia polimérica que varia de acordo com a composição e sequência. Além disso, este composto apresenta vantagens como alta porosidade e ausência de solventes orgânicos durante o processo de encapsulamento (GOMBOTZ & WEE, 1998).

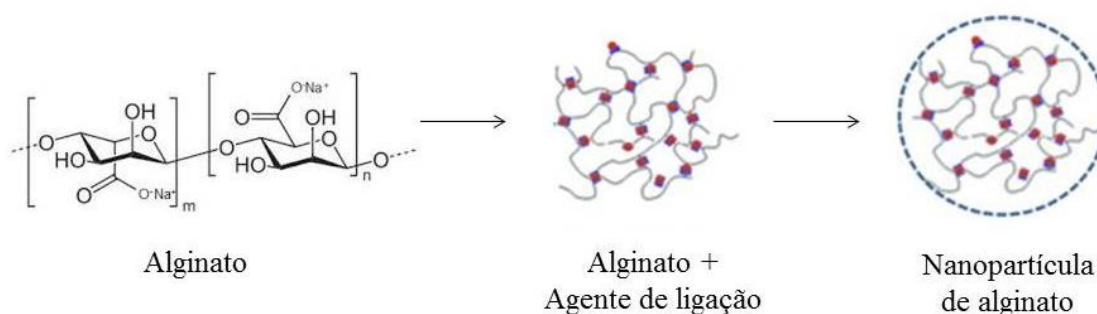


Figura 19: Representação esquemática de nanopartícula formada por alginato (Adaptado de SEVERINO *et al.*, 2015).

Estudos já demonstraram sua capacidade para encapsular compostos lipofílicos como os óleos essenciais (DE OLIVEIRA, PAULA & DE PAULA, 2014; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; VARONA *et al.*, 2010; PAULA *et al.*, 2010). Manuja *et al.* (2014) desenvolveram nanopartículas de alginato contendo sulfato de quinapiramina e os resultados mostraram que a forma nanoparticulada desse ativo foi menos tóxica e capaz de erradicar o parasito *T. evansi* em concentrações inferiores comparadas a sua forma livre. Em adição, um potencial antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial de *Satureja hortensis* foi observado quando encapsulado em micropartículas de alginato (HOSSEINI *et al.*, 2013b).

1.8. Quitosana

A quitosana também é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina, o principal componente do exoesqueleto de crustáceos (SAHOO *et al.*, 2010). Quitina é o segundo mais abundante polímero na natureza, estando atrás somente da celulose. Estruturalmente, quitosana é um polímero catiônico linear que consiste em unidades D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina acopladas por ligações β -(1-4)-glicosídicas (ROBERTS, 1992). As proporções relativas desses resíduos são responsáveis pela solubilidade, atividade e biodegradabilidade da quitosana (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Sob condições levemente ácidas, a quitosana tem uma natureza catiônica que permite interagir com superfícies carregadas negativamente e polímeros aniônicos (Figura 20) (LETSUTTHIWONG & ROJSITTHISAK, 2011).

Sendo assim, esse composto é caracterizado como biodegradável, biocompatível, renovável e não tóxico (ABREU *et al.*, 2012; SENEL *et al.*, 2000). Além disso, nanopartículas de quitosana são usadas para controlar a liberação de drogas, melhorar

sua solubilidade e biodisponibilidade (SINHA *et al.*, 2004; HEJAZI & AMIJI, 2003). Na literatura é largamente descrito seu efeito como mucoadesivo, aumento da absorção, inibição de peptidase e propriedades de proliferação celular (BONFERONI *et al.*, 2017).

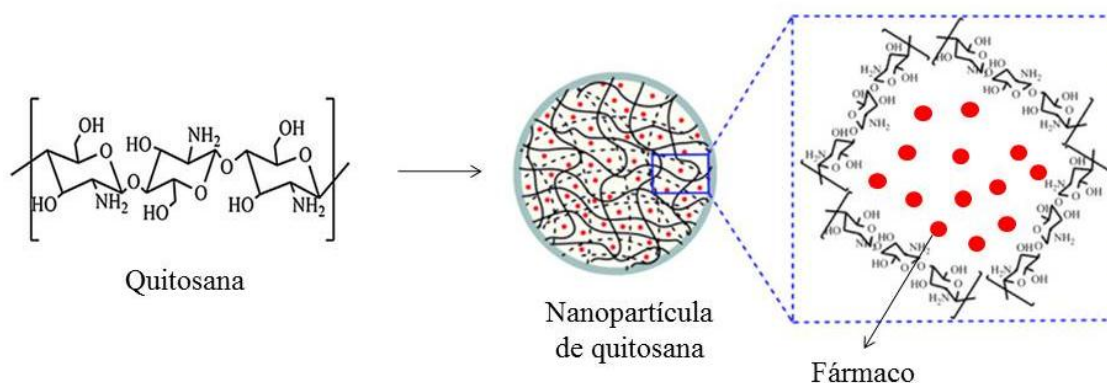


Figura 20: Representação esquemática de nanopartícula formada por quitosana (Adaptado de CHEN *et al.*, 2017).

Óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* inibiu o desenvolvimento de nematoides gastrointestinal de ruminantes de pequeno porte e esse efeito foi reproduzido por sua forma nanoparticulada de quitosana (RIBEIRO *et al.*, 2014). Resultados obtidos por Woranuch & Yoksan (2013) sugerem o uso de nanopartículas de quitosana carregada com eugenol como antioxidantes em plásticos bioativos para embalagens de alimentos, uma vez que este efeito foi potencializado em relação à forma livre do terpeno. Bioensaios também indicaram maior mortalidade de larvas *St. Aegypti* após tratamento com o óleo de *Lippia sidoides* encapsulado em sistemas poliméricos de quitosana do que ele livre (ABREU *et al.*, 2012). Em adição, a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Mentha piperita* livre e em nanopartículas de quitosana contra *Aspergillus flavus* foram 2100 e 500 ppm, respectivamente (BEYKI *et al.*, 2014).

Diante desses relatos é possível que o desenvolvimento de formulações nanométricas possa potencializar o efeito dos princípios ativos, óleo essencial e/ou BZ, sobre o *T. cruzi*, uma vez que seria uma alternativa eficaz para aumentar a biodisponibilidade desses componentes altamente hidrofóbicos. Sendo assim, o foco dos próximos capítulos foi a caracterização dos diferentes sistemas destacados anteriormente, bem como, a avaliação da atividade tripanocida a fim de se confirmar esta hipótese.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e/ou benznidazol, bem como, avaliar o potencial anti-*Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver os seguintes sistemas nanoestruturados: nanoemulsão, lipossoma e micela.
- Caracterizar os sistemas desenvolvidos quanto ao diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH.
- Avaliar a estabilidade dos sistemas nanoestruturados.
- Avaliar *in vitro* o potencial anti-*T. cruzi* dos sistemas desenvolvidos.
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade destes sistemas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados

3.1.1. Sistema nanemulsionado

As nanoemulsões foram preparadas em triplicata pelo método de emulsificação por inversão de fases (*Emulsion Phase Inversion* - EPI) (SEIBERT *et al.*, 2019). A técnica consistiu-se em aquecer as fases aquosa e oleosa separadamente em banho-maria (Britania Multi Grill) até uma temperatura de 75 ± 2 °C e, em seguida, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa sob agitação constante a 600 rpm através do agitador mecânico (Fisatom, modelo 713D) até resfriamento à temperatura ambiente.

Para obtenção das nanoemulsões foram utilizados os tensoativos não iônicos álcool estearílico etoxilado 2.OE (Brij 72[®] - Beraca Ingredients) (lipofílico) e PEG - 40 *Hydrogenated Castor Oil* (Croduret 50 Special[®]) (hidrofílico), a fase oleosa foi composta por óleo de girassol (comercial) e, no caso das formulações contendo princípios ativos, óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e BZ também foram adicionados. Por fim, água ultrapura (MilliQ - Millipore) foi usada como fase aquosa. A composição qualitativa e quantitativa final das formulações está descrita na tabela a seguir (Tabela10).

Tabela 10: Constituição qualitativa e quantitativa das nanoemulsões obtidas a partir da adição de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e/ou benznidazol.

Componente	Nanoemulsão			
	NE-CN	NE-OE	NE-OE+BZ	NE-BZ
Brij 72	4% p/v	4% p/v	4% p/v	4% p/v
PEG 40	6% p/v	6% p/v	6% p/v	6% p/v
Óleo de girassol	10% p/v	5% p/v	5% p/v	10% p/v
Óleo essencial	-	5% p/v	5% p/v	-
Benznidazol	-	-	0,008% p/v	0,008% p/v
Água	80% v/v	80% v/v	80% v/v	80% v/v

NE – Nanoemulsão; CN – Controle negativo; OE – Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ – Benznidazol.

3.1.2. Sistema lipossomal

Os lipossomas foram preparados em triplicata pelo método de hidratação do filme lipídico conforme descrito por Barichello *et al.* (2017) acrescidos de modificações. Inicialmente foram preparadas as soluções de Phospholipon[®] 90G (Lipoid[®]) e colesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a 10 mg/mL em

diclorometano (Impex[®], Varginha, Brasil). Em balão de fundo redondo, foram adicionados estas soluções estoques e, no caso das formulações contendo princípios ativos, também foram acrescidos óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e BZ. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório (Visatom) a 40°C, pressão de 180 atm e rotação constante de 90 rpm. O filme lipídico foi ressuscitado em 5 mL de água ultra pura (MilliQ - Millipore) sob agitação constante em vórtex (Mixer Vision Scientific LTD/KMC 1300v, Korea) até que o filme se dispersasse completamente. O tamanho das vesículas lipídicas foi reduzido e uniformizado sob homogeneização em ultra turrax[®] (IKA T25 digital, Staufen Germany) a 5000 rpm por 40 minutos utilizando ultrassom (Ultraclaner 1600 unique, Indaiatuba, SP Brasil). A composição qualitativa e quantitativa final das formulações está descrita na tabela 11.

Tabela 11: Constituição qualitativa e quantitativa dos lipossomas obtidos a partir da adição de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e/ou benznidazol.

Componente	Lipossoma			
	LIP-CN	LIP-OE	LIP-OE+BZ	LIP-BZ
Phospholipon	4% p/v	4% p/v	4% p/v	4% p/v
Coolesterol	0,5% p/v	0,5% p/v	0,5% p/v	0,5% p/v
Óleo essencial	-	0,6% p/v	0,3% p/v	-
Benznidazol	-	-	0,016% p/v	0,032% p/v
Água	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

LIP - Lipossoma; CN – Controle negativo; OE – Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ – Benznidazol.

3.1.3. Sistema micelar

As micelas foram preparadas em triplicata pelo método de dispersão a frio (ALMEIDA *et al.*, 2019). O polímero Pluoronic[®] F127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi adicionado em um becker contendo água ultrapura (MilliQ - Millipore), o qual foi mantido em banho de gelo sob agitação magnética (Velp Scientifica) moderada até completa dispersão do polímero. Em seguida, a solução foi armazenada em geladeira *overnight* para dispersão das bolhas formadas durante o processo de agitação. Após o período de incubação, os princípios ativos, óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e BZ, foram adicionados na solução polimérica sob agitação vigorosa usando agitador magnético a temperatura ambiente até incorporação completa dos mesmos. A composição qualitativa e quantitativa final das formulações está descrita na tabela 12.

Tabela 12: Constituição qualitativa e quantitativa das micelas obtidas a partir da adição de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e/ou benznidazol.

Componente	Micela			
	MIC-CN	MIC-OE	MIC-OE+BZ	MIC-BZ
Pluronic F127	10% p/v	10% p/v	10% p/v	10% p/v
Óleo essencial	-	1% p/v	0,5% p/v	-
Benznidazol	-	-	0,008% p/v	0,016% p/v
Água	90% v/v	89% v/v	89,5% v/v	90% v/v

MIC - Micela; CN – Controle negativo; OE – Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ – Benznidazol.

3.2. Caracterização dos sistemas nanoestruturados

3.2.1. Determinação do diâmetro médio de partícula e índice de polidispersividade

A distribuição do diâmetro médio de partícula dos sistemas desenvolvidos foi determinada a partir da espectroscopia de correlação de fótons, mais conhecida como espalhamento de luz dinâmico, utilizando o Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer Nano series - Nano ZS). As amostras foram preparadas em uma proporção 1:100, adicionando-se 20 µL das formulações em 2 mL de água ultra pura (MilliQ - Millipore) e adicionadas em cubeta de quartzo. As leituras para esta análise foram realizadas em triplicata e as medidas foram efetuadas a 25 °C sob o ângulo de espalhamento incidente de 90 °. Os resultados foram fornecidos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersividade (PDI) (SEIBERT *et al.*, 2019).

3.2.2. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pelas medidas de mobilidade eletroforética das partículas em suspensão. O equipamento utilizado, Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer Nano series - Nano ZS), dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada terminal de um tubo em forma de "U", onde as amostras previamente diluídas (1:100) foram adicionadas para análise. As leituras foram realizadas em triplicata a 25 °C e os resultados foram expressos em milivolts (mV) (SEIBERT *et al.*, 2019).

3.2.3. Determinação do pH

O valor do potencial Hidrogeniônico (pH) dos sistemas nanoestruturados foi determinado inserindo o eletrodo do peagâmetro (Lutron, modelo PH-221) diretamente

na amostra a uma temperatura de 25 °C. Os resultados foram expressos como média das três diferentes determinações (SEIBERT *et al.*, 2019).

3.3. Avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados

Na avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados, os parâmetros diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH, previamente descritos, foram avaliados em triplicata nos períodos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o preparo das formulações a fim de se observar a presença de sinais de instabilidade.

3.4. Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

3.4.1. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os sistemas nanoestruturados desenvolvidos a partir da adição de óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e BZ foram avaliados quanto ao potencial antiparasitário a fim de se confirmar a manutenção do efeito biológico após a incorporação dos princípios ativos. Formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Tulahuen transformada para expressar o gene da β -galactosidase foram utilizadas como descrito anteriormente nos materiais e métodos do capítulo 1 (ROMANHA *et al.*, 2010; BUCKNER *et al.*, 1996). As concentrações das amostras variaram de 50 a 0,78 mg/mL e a dosagem dos ativos foi determinada de acordo com suas porcentagens nas formulações desenvolvidas, uma vez que cada sistema apresenta uma concentração específica dos princípios ativos, óleo essencial e/ou BZ.

Além disso, para as formulações que continham óleo essencial (OE) juntamente BZ, foi calculado o índice da concentração inibitória fracionada (IFCI) a partir do somatório da concentração inibitória fracionada (CIF) de cada um desses ativos com o intuito de determinar se há um efeito sinérgico (< 1), indiferente (≥ 1 e ≤ 2) ou antagonista (> 2) de acordo com a equação a seguir (FRATINI *et al.*, 2017):

$$\text{IFCI} = \text{CIF (OE)} + \text{CIF (BZ)}$$
$$\text{IFCI} = \frac{\text{CI50 do OE+BZ}}{\text{CI50 do OE}} + \frac{\text{CI50 do OE+BZ}}{\text{CI50 do BZ}} \quad \text{Equação 4}$$

3.4.2. Citotoxicidade

Assim como a atividade anti-*T.cruzi*, os sistemas nanoestruturados também foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico em células L929 utilizando o reagente alamarBlue™, conforme detalhado previamente nos materiais e métodos do capítulo 1 (ROMANHA *et al.*, 2010). As concentrações das amostras variaram de 50 a 0,78 mg/mL e a dosagem dos ativos foi determinada de acordo com suas porcentagens nas formulações desenvolvidas, uma vez que cada sistema apresenta uma concentração específica dos princípios ativos, óleo essencial e/ou BZ.

3.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram representados pelas médias \pm desvio padrão. A comparação entre os controles e as amostras foi realizada a partir do teste One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$, através do programa *GraphPad Prism 5.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos sistemas nanoestruturados

4.1.1. Determinação do diâmetro médio de partícula e índice de polidispersividade

Dispersões O/A com tamanho de partícula variando entre 50 e 500 nm são consideradas nanoemulsões (FORGIARINI *et al.*, 2001). Os lipossomas são caracterizados por apresentarem diâmetros variados de acordo com sua classificação, sendo eles de 20 a 100 nm para SUV, maior que 100 nm para LUV e em torno de 0,5 µm para MLV (SHERRY *et al.*, 2013). Já as micelas são carreadores coloidais com tamanho entre 10 a 100 nm (KORE *et al.*, 2014). O pequeno tamanho de partícula dessas estruturas está diretamente associado com as vantagens apresentadas pelos sistemas coloidais, como uma cinética estável e aparência translúcida (BAJERSKI *et al.*, 2016).

Sendo assim, de acordo com a tabela 13, pode ser verificado que todos os sistemas desenvolvidos são caracterizados como nanométricos, uma vez que o diâmetro médio de partícula foi inferior a 1000 nm, no caso dos lipossomas um tamanho similar a LUV foi encontrado. As nanoemulsões apresentaram valores de tamanho de partícula abaixo de 160 nm, sendo que na presença do óleo essencial essa média foi reduzida pela metade. Redução ainda mais significativa foi demonstrada em relação ao lipossoma como controle negativo. Segundo Valenti *et al.* (2001), este fato pode ser justificado por uma maior interação entre os componentes do óleo e os excipientes e já foi relatado por outros autores (GÜNDEL *et al.*, 2018; ROSSI *et al.*, 2017). Por outro lado, todas as formas micelares revelaram um diâmetro superior ao controle da formulação.

O PDI é outro fator bastante importante na caracterização dos sistemas nanoestruturados. A distribuição do diâmetro de partícula pode ser monodispersa ou polidispersa, de acordo sua extensão entre 0 e 1. Estudos mostram que um PDI inferior a 0,3 está relacionado com a uniformidade da população de partículas na formulação (GÜNDEL *et al.*, 2018). Valores de PDI abaixo ou próximos do indicado para caracterizar um sistema monodisperso foram encontrados para todas as nanoemulsões, os lipossomas contendo óleo essencial e apenas para a MIC-OE+BZ. Os outros formulados, em contrapartida, foram identificados como polidispersos.

Tabela 13: Caracterização dos sistemas nanoemulsionados, lipossomais e micelares de acordo com o diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH.

Sistema Nanoestruturado	Caracterização			
	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	pH
NE-CN	156,90 ± 0,51	0,206 ± 0,01	-14,20 ± 0,45	6,03 ± 0,18
NE-OE	84,74 ± 0,49	0,211 ± 0,00	-4,68 ± 0,65	4,84 ± 0,20
NE-OE+BZ	84,47 ± 0,32	0,133 ± 0,02	-4,35 ± 0,27	6,62 ± 0,03
NE-BZ	138,50 ± 0,64	0,177 ± 0,02	-18,00 ± 1,12	5,29 ± 0,14
LIP-CN	354,70 ± 12,30	0,701 ± 0,06	-31,50 ± 0,73	4,03 ± 0,17
LIP-OE	131,10 ± 0,35	0,195 ± 0,01	-13,30 ± 1,15	3,04 ± 0,06
LIP-OE+BZ	117,40 ± 0,17	0,208 ± 0,01	-23,40 ± 0,06	2,27 ± 0,06
LIP-BZ	478,60 ± 20,85	0,752 ± 0,08	-33,80 ± 1,60	4,32 ± 0,02
MIC-CN	32,58 ± 3,97	0,486 ± 0,07	-35,40 ± 5,09	6,15 ± 0,09
MIC-OE	190,60 ± 72,67	0,415 ± 0,06	-15,00 ± 0,65	6,24 ± 0,17
MIC-OE+BZ	253,80 ± 9,47	0,306 ± 0,01	-25,30 ± 0,71	6,24 ± 0,05
MIC-BZ	91,12 ± 12,30	0,409 ± 0,16	-11,90 ± 2,06	6,49 ± 0,04

PDI – Índice de polidispersividade; CN – Controle negativo; OE – Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ – Benznidazol; NE – Nanoemulsão; LIP – Lipossoma; MIC – Micela.

Rossi *et al.* (2017) encontraram valores de diâmetro menor que 300 nm e PDI inferior a 0,25 para a nanoemulsão encapsulando o óleo essencial de *C. flexuosus*. A forma nanoemulsionada dos óleos essenciais de tomilho, capim-limão, canela, pimenta-hortelã e cravo também apresentaram tamanho inferior a 200 nm, independentemente do número de passos e da pressão do microfluidizador (WAN *et al.*, 2019). No estudo feito por Gündel *et al.* (2018), a formulação branca demonstrou tamanho em torno de 140 nm e este valor foi reduzido para 79 nm após adição do óleo de *C. flexuosus*. Em relação à polidispersividade, ambas foram monodispersas (PDI<0,3). Em adição, população uniforme foi revelada para as nanoemulsões contendo óleo de *Carapa guaianensis* e *Schimus molle*, além de tamanho inferior a 240 nm (BALDISSERA *et al.*, 2013). Todos esses relatos, bem como, os resultados para a nanoemulsão contendo o mesmo óleo do presente estudo (tamanho de 77 nm e PDI 0,09) (SEIBERT *et al.*, 2019) estão de acordo com o nosso trabalho.

A relação surfactante-óleo (RSO) pode influenciar na distribuição média do tamanho de partícula, sendo que quanto maior essa proporção menor será a partícula. Por exemplo, nanoemulsões contendo óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) apresentaram valores em torno de 600 nm no caso de uma RSO = 0,5, os quais foram reduzidos para 180 nm em uma RSO = 2. Perfil semelhante foi demonstrado para a nanoemulsão contendo óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), em que os valores variaram de 700 para 160 nm, nas prévias RSO. Além disso, o PDI também sofreu interferência na medida em que a proporção de tensoativo era aumentada, variando

entre 0,5 a 0,3 (RESTREPO *et al.*, 2018). No presente trabalho esta relação foi igual a 1 sendo suficiente para estabilizar os sistemas desenvolvidos e obter uma população ainda menos dispersa.

Nanoemulsões contendo BZ também foram desenvolvidas e apresentaram diâmetro médio entre 119 a 622 nm de acordo com o tipo e a concentração de surfactante utilizado (STRECK *et al.*, 2019). Nossos valores estão dentro dessa faixa e reforçam a importância de estabelecer uma relação ideal entre a fase oleosa e o tensoativo. Por outro lado, segundo Streck *et al.* (2016) o perfil de tamanho da maioria das nanoemulsões aumentaram após a adição do benzimidazol, o que difere dos nossos resultados. Entretanto, a variação do tamanho (80 a 170 nm) está mais próxima da nossa realidade e a redução de PDI também foi observada em ambos os trabalhos.

No caso dos lipossomas, uma larga faixa de tamanho e PDI tem sido obtida para encapsulamento de óleos essenciais devido as diferentes condições experimentais, como tipo de óleo, composição lipídica e a metodologia. Sendo assim, foi relatado que o método de hidratação do filme seguido por sonificação foi o mais utilizado para a preparação desses sistemas, permitindo uma obtenção eficiente de partículas com tamanho e PDI reduzidos (SHERRY *et al.*, 2013).

Segundo Sebaaly *et al.* (2015) lipossomas desenvolvidos a partir de Phospholipon 90H obtiveram tamanho em torno de 275 nm e PDI de 0,12. No entanto, esses valores aumentaram para o primeiro parâmetro após a adição do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*). Por outro lado, a dispersividade da população foi reduzida. Este fato está em partes de acordo com os nossos resultados, uma vez que ambas as características sofreram redução. Esse perfil foi também observado por Valenti *et al.* (2001) entre lipossomas branco (120 nm e PDI 0,21) e com óleo de *Santolina insularis* (63 nm e PDI 0,15) e por Sinico *et al.* (2005), em que lipossomas vazios e com óleo de *Artemisia arborescens* tiveram tamanho variando de 134 a 207 nm e de 78 a 123 nm, respectivamente. O oposto foi revelado no estudo de Manconi *et al.* (2018), uma vez que as vesículas vazias tinham tamanho de 71 nm e PDI 0,18 e as carregadas de óleo de *Thymus capitatus* 89 nm e PDI 0,22. Na preparação desse tipo de estruturas contendo diferentes concentrações do óleo de canela, um aumento de tamanho, variando entre 133 a 157 nm, e PDI de 0,229 a 0,245 também foi identificado (CUI *et al.*, 2016).

Interessantemente, foi observado que os lipossomas controle e contendo somente BZ demonstram valores médios de partícula acima de 350 nm e PDI próximo a 0,7. Essa ampla distribuição de tamanho poderia ser atribuída à formação de vesículas gigantes e podem estar relacionada a aglomerados ou agregados de lipossomas menores (DOMAZOU & LUIGI-LUISI, 2002). Além disso, existiam poucas expectativas de que o BZ era um fármaco ideal para ser encapsulado em lipossomas devido à sua baixa hidrossolubilidade, dificuldade de retenção nas bicamadas fosfolipídicas e o emprego de uma metodologia eficiente para obter uma alta razão fármaco/lipídio (MORILLA *et al.*, 2002). Morilla *et al.* (2004) encontraram valores para o diâmetro médio de vesículas multilamelares contendo benznidazol variando de 2 a 0,5 μm . Por outro lado, no estudo de Vinuesa *et al.* (2017) valores mais baixos, 122 e 118 nm, foram identificados para os lipossomas vazio e carregado, respectivamente. Além disso, ambos foram caracterizados por uma população monodispersa ($\text{PDI} < 0,2$).

Sendo assim, pode-se inferir que a presença do óleo essencial auxiliou na redução do tamanho e PDI para este tipo de sistema. Esta realidade difere do esperado, uma vez que o acúmulo de compostos lipofílicos na parte hidrofóbica da membrana perturba as interações entre as cadeias acílicas dos fosfolipídios, levando ao aumento da bicamada (SIKKEMA, DE BONT & POOLMAN, 1995). No entanto, já foi reportado que esta redução pode estar relacionada à capacidade dos óleos essenciais de causar maior coesão entre as cadeias apolares nas camadas das vesículas (VALENTI *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que os monoterpenos são capazes de reduzir o tamanho dos lipossomas forçando as camadas de fosfatidilcolina a aumentar sua curvatura superficial, sugerindo que estivessem localizados na região polar dessas estruturas (TURINA A DEL *et al.*, 2006).

Por fim, ao contrário do que tinha sido observado pelas estruturas anteriores, as micelas carregadas de princípio ativo sofreram um aumento de tamanho em relação ao controle, em contrapartida o PDI foi reduzido. Corroborando com esses resultados, no estudo feito por De Oliveira de Siqueira *et al.* (2017), formulações de Pluronic apresentaram tamanho em torno de 40 nm. No entanto, após adição de 1% do óleo essencial de alho, um aumento significativo foi encontrado (723 nm), embora esse efeito tenha sido reduzido à medida que mais óleo foi acrescido. Mesmo perfil foi descrito para os valores de PDI, os quais variaram inicialmente de 0,861 até 0,140 e sugerem que

o aumento da quantidade de óleo pode favorecer a redução de ambos os parâmetros. Por outro lado, o sistema otimizado obtido a partir do Poloxamer 407 carregado de óleo essencial de alho e 8-methoxipsoralen apresentou tamanho médio de 25 nm e baixo PDI (0,09), não sendo observada nenhuma diferença significativa com a formulação controle (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além disso, dados da análise de DLS indicaram que a incorporação de óleo essencial de *Artemisia arborescens* em sistemas de Poloxamer 188 levou uma distinta redução no tamanho de 294 para 199 nm. No entanto, assim como no presente trabalho, eles observaram um aumento na homogeneidade da formulação, com o decréscimo do PDI de 0,28 para 0,22 (LAI *et al.*, 2006).

Em relação ao encapsulamento do BZ, Scalise *et al.* (2016) encontraram valores de tamanho em torno de 63 nm para micelas de Poloxamer 188 a partir da técnica de nanoprecipitação. No entanto, uma população altamente polidispersa foi caracterizada para este sistema. Por outro lado, nanopartículas obtidas a partir de Eudragit e Pluronic F68 contendo BZ apresentaram um diâmetro médio variando de 201 a 250 nm e PDI de 0,15 a 0,3 (SEREMETA *et al.*, 2019). Estas variações podem ser justificadas devido ao uso de diferentes técnicas e surfactantes que dificultam a comparação dos resultados.

4.1.2. Determinação do potencial zeta

A magnitude do potencial zeta permite a avaliação da estabilidade das partículas em suspensão: se todas as partículas exibem um valor altamente negativo ou positivo desse potencial, elas se repelem e impedem a agregação. Quando o potencial zeta tem um valor próximo de zero, essa ausência de carga superficial pode facilitar as interações entre as partículas e promover, em alguns casos, processos de floculação ou agregação. Em geral, a fronteira entre as suspensões estáveis e instáveis é considerada para um valor de potencial zeta maior que $|30|$ mV, condição em que as gotículas são impedidas de se agregar por causa da repulsão eletrostática entre elas (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015; HEURTAULT *et al.*, 2003).

Como informado na tabela 13, todas as nanoemulsões apresentaram um potencial zeta com carga negativa, porém com valores abaixo do estabelecido, o que as considerariam instáveis eletrostaticamente. Segundo Fronza, Fields & Teixeira (2004) essa propriedade pode ser significativamente reduzida com valores de pH ácido como encontrado no presente estudo, o que poderia explicar os números baixos para esta

análise. Por outro lado, uma estabilização estérica pode ser observada para dispersões coloidais, sendo suficiente para estabilizar os sistemas desenvolvidos (CAPEK, 2002; FORGIARINI *et al.*, 2001). Interessantemente, uma redução em módulo desse valor foi revelada para os sistemas carregados com óleo essencial. Este perfil também foi demonstrado para as outras formas farmacêuticas.

Estes valores de potenciais dependem muito da carga do surfactante e quando são usados tensoativos não-iônicos (Brij 72, PEG 40, Pluronic F127) levaria à formação de formulações com potenciais próximos a 0 mV. No entanto, Ziani *et al.* (2011) relataram que as nanoemulsões desenvolvidas a partir de surfactantes sem carga podem apresentar um valor ligeiramente negativo, o qual é atribuído a impurezas aniônicas no surfactante, como ácidos graxos livres, ou a absorção de espécies aniônicas da água para a superfície das gotas. Mesmo os valores estando próximo da neutralidade, é possível que os sistemas permaneçam estáveis devido ao efeito estérico proporcionado pelos grupos de superfície volumosos dos surfactantes não-iônicos utilizados (RIBEIRO *et al.*, 2017; ATTAMA *et al.*, 2012).

Nanoemulsões contendo ou não o óleo essencial de *C. flexuosus* também demonstraram valores menores do que o estabelecido para este potencial, sendo, respectivamente, -10 e -6,5 mV de acordo com Gündel *et al.* (2018) e -8 mV para ambas as formulações no estudo feito por Rossi *et al.* (2017). Resultado semelhante foi observado para as nanoemulsões contendo óleo de capim-limão (*C. citratus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (RESTREPO *et al.*, 2018) e *C. densiflorus* (SEIBERT *et al.*, 2019). Por outro lado, valores bem superiores foram encontrados para as nanoemulsões contendo óleo de *Carapa guaianiensis*, *Schimus molle* e o controle negativo, -55, -30 e -27 mV, respectivamente, indicando que tanto o tipo quanto a concentração de surfactante utilizado pode interferir nesse potencial (BALDISSERA *et al.*, 2013). O mesmo pode ser dito sobre os resultados de potencial zeta para diferentes nanoemulsões contendo BZ, as quais apresentaram números (-60 a -96 mV) bem acima do nosso trabalho (STRECK *et al.*, 2016).

Em relação aos lipossomas, apenas os sistemas contendo óleo essencial estavam abaixo do estabelecido. Segundo Sebaaly *et al.* (2015) lipossomas desenvolvidos a partir de Phospholipon 90H obtiveram potencial zeta próximo a -4 mV, mesmo na presença do óleo de cravo. Apesar dos baixos valores encontrados no nosso trabalho,

estes foram superiores comparados a outros óleos o que garantiria uma maior estabilidade ao sistema. Em contrapartida, a forma lipossomal do óleo de canela apresentou números acima do desejado, em média -55 mV (CUI *et al.*, 2016). Perfil semelhante foi demonstrado para as vesículas carregadas de óleo de *Thymus capitatus* (-72 mV) (MANCONI *et al.*, 2018). No caso do encapsulamento de BZ na forma lipossomal, Vinuesa *et al.* (2017) encontrou valores de -18 e -10 mV, para a formulação controle e a carregada, respectivamente, sugerindo uma menor estabilidade quando comparados com o nosso trabalho.

As formas micelares também apresentaram um perfil de redução de potencial zeta após encapsulamento dos ativos. Segundo Lai *et al.* (2006), valor próximo a -15 mV foi demonstrado pelo sistema de Poloxamer 188 após a incorporação do óleo essencial de *Artemisia arborescens*, o que corrobora com os nossos achados. Além disso, formulação utilizando o mesmo polímero carregada de BZ apresentou potencial zeta próximo de -18 mV (SCALISE *et al.*, 2016). No entanto, nanopartícula obtida a partir de Eudragit e Pluronic F68 contendo BZ demonstrou um potencial zeta entre 24 a 37 mV, o qual pode ser justificado pela carga superficial positiva presente no polímero Eudragit devido aos grupos de amônio quaternário (SEREMETA *et al.*, 2019).

4.1.3. Determinação do pH

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) é um importante teste para monitorar a estabilidade de formulações, uma vez que mudanças de valores neste parâmetro pode indicar a ocorrência de reações químicas, as quais comprometem a qualidade do produto final. Todos os sistemas revelaram um pH acidificado, independentemente da presença dos princípios ativos, sendo portanto, uma característica intrínseca dos excipientes das nanoestruturas (Tabela 13). Além disso, já é demonstrado que os óleos essenciais contribuem para este caráter, uma vez que uma redução de pH pode ser resultado da hidrólise de ésteres de ácidos graxos que geram ácidos livres (FRONZA, CAMPOS & TEIXEIRA, 2004). No entanto, para futuras aplicações *in vivo*, o pH das formulações deve ser ajustado a um valor mais fisiologicamente relevante de acordo com a rota de administração desejada.

Valores de pH 5,6 e 3,7 foram encontrados para a nanoemulsão na ausência e presença do óleo essencial de *C. flexuosus*, respectivamente (ROSSI *et al.* 2017).

Mesmo perfil, 5,5 e 4,0, foi revelado por Gündel *et al.* (2018), o que se assemelha ao nossos resultados. Por outro lado, um caráter ainda mais ácido foi demonstrado pela nanoemulsão contendo o mesmo óleo do presente estudo, indicando, assim, que esta alteração está relacionada ao uso de diferentes surfactantes (SEIBERT *et al.*, 2019).

No caso de exemplos lipossomais, Cui *et al.* (2016) encontraram valores de pH próximos da neutralidade para as estruturas contendo óleo de canela. Esse mesmo perfil também foi revelado para lipossomas encapsulando óleo essencial de *C. densiflorus* (pH 7,1), o qual se assemelha ao presente trabalho e sugere que a diferença do fosfolípidio pode ser o responsável pela redução desses valores (BARICHELLO *et al.*, 2017).

Por fim, formulações desenvolvidas a partir de ftalocianina de zinco, óleo essencial de alho e Pluronic F127 apresentaram valores de pH em torno de 5, sendo considerado satisfatório se a intenção é usá-las topicamente (DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA *et al.*, 2017). Por outro lado, valores superiores (6,1-6,5) foram encontrados no presente trabalho, o que é vantajoso para outras vias de administração. Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2018), o qual encontrou um pH em torno de 6,5 para os sistemas nanoestruturados desenvolvidos a partir do Poloxamer 407 carregado de óleo essencial de alho e 8-methoxipsoralen. Em adição, amostras produzidas através de Poloxamer 188 e óleo essencial de *Artemisia arborescens* revelou um pH próximo a 6,2 (LAI *et al.*, 2006).

4.2. Avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados

Para a aplicação prática, é essencial assegurar a estabilidade a longo prazo dos sistemas desenvolvidos. Portanto, mudanças no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH foram medidos após 28 dias de armazenamento a 25 °C.

De acordo com a figura 21, não foi possível observar nenhuma alteração do tamanho das partículas nanoemulsionadas contendo somente o óleo essencial (NE-OE), embora uma redução deste parâmetro tenha sido descrito após 21 dias para as outras formas. Além disso, todas as nanoemulsões apresentaram um aumento no PDI, no entanto, este valor foi mantido após 14 dias, indicando uma estabilidade do sistema. Em relação ao potencial zeta, valores superiores ao inicial foram encontrados, exceto para a NE-BZ, o que confirma uma maior repulsão das partículas e, conseqüentemente, maior estabilidade ao longo do período analisado. Por fim, uma acidificação da formulação foi

revelada somente para a NE-OE+BZ, o que pode estar relacionada a uma reação entre os dois ativos. Apesar dessas diferenças, pode-se sugerir que as nanoemulsões exibiram uma boa estabilidade durante o período de estocagem, uma vez que a faixa nanométrica para o tamanho de partícula foi mantida, bem como, não ocorreu à separação de fases ou formação de aglomerados.

No estudo feito por Wan *et al.* (2019), nanoemulsões contendo óleos essenciais de tomilho, capim-limão, canela, pimenta-hortelã e cravo foram avaliadas quanto a estabilidade após armazenamento a 4 e 25 °C. De acordo com o autor, nenhuma variação entre o diâmetro de partícula foi observada na menor temperatura. No entanto, as formas contendo canela e cravo sofreram um aumento nesta medida após 30 dias a temperatura ambiente e mesmo assim foram consideradas estáveis. Na avaliação da estabilidade da nanoemulsão contendo óleo essencial de *C. flexuosus* em um período ainda maior (90 dias), o tamanho e o PDI das partículas foram mantidos quando armazenadas sob refrigeração, embora o potencial zeta e pH tenham sido reduzidos. Por outro lado, todos esses parâmetros foram alterados na manutenção destas formulações na temperatura de 25 °C (GÜNDEL *et al.*, 2018). Esse mesmo perfil também foi encontrado por Sonawane *et al.* (2015) para nanoemulsões carregadas de ácido linoleico. Em contrapartida, dados obtidos a partir do método de DLS demonstraram a estabilidade das nanoemulsões baseadas em óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) e andiroba (*Carapa guianensis*), uma vez que não houve mudança significativa no tamanho, PDI e potencial zeta durante 90 dias de estocagem a temperatura ambiente (DHORM PIMENTEL DE MORAES *et al.*, 2018).

Estes resultados esclarecem, portanto, que uma estocagem não adequada pode interferir nas características do sistema e que no caso das nanoemulsões a melhor opção seria mantê-las a baixas temperaturas. Sendo assim, é esperado que as nanoemulsões obtidas no presente estudo demonstrassem uma estabilidade ainda maior, caso tivessem sido mantidas sob refrigeração.

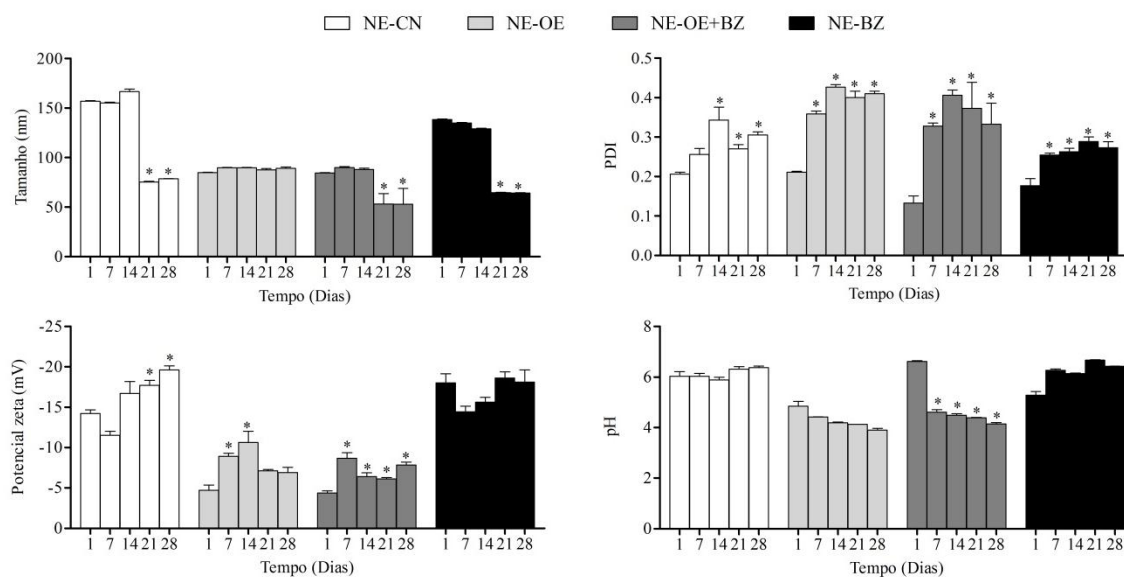


Figura 21: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas nanoemulsionados de acordo com o período analisado. NE-CN: Nanoemulsão como controle negativo; NE-OE: Nanoemulsão contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; NE-OE+BZ: Nanoemulsão contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e benznidazol; NE-BZ: Nanoemulsão contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$.

No caso dos lipossomas, o efeito sobre o tamanho foi oposto ao observado anteriormente, ou seja, valores elevados foram descritos para todas as formas, exceto para LIP-BZ (Figura 22). Além disso, a formulação contendo ambos os ativos (LIP-OE+BZ) apresentou características de instabilidade após 21 dias de armazenamento, sugerindo uma incompatibilidade dos mesmos na forma lipossomal. Variações drásticas no PDI também reforçam a presença de sinais de um sistema instável. Fato semelhante foi observado para os valores de potencial zeta, exceto para LIP-BZ. Em adição, as formulações na ausência do óleo essencial intensificaram a acidez dos sistemas. Diante desses resultados, pode-se dizer que a forma lipossomal não seria adequada para carrear uma grande quantidade de componentes hidrofóbicos.

Variações do tamanho e PDI também foram avaliadas para lipossomas contendo óleo de cravo após dois meses de estocagem a 4 °C (SEBAALY *et al.*, 2015). Neste caso, nenhuma mudança foi encontrada para a formulação contendo menor proporção de óleo. No entanto, à medida que esta quantidade foi aumentada, maiores sinais de instabilidade foram observados, o que está de acordo com a nossa prévia análise. No estudo de estabilidade realizado durante um ano para lipossomas do óleo de *Santolina insularis*, nenhuma mudança no tamanho e porcentagem de óleo encapsulado foi

relatada quando estocados a 4 °C (Valenti *et al.*, 2001). Além disso, em análise de um ano feita por Sinico *et al.* (2005), MLVs contendo óleo de *Artemisia arborescens* demonstraram estabilidade até 6 meses a 4 °C. Entretanto, após esse período ocorreu um aumento no tamanho devido à fusão de vesículas menores, o qual foi confirmado por imagens obtidas pela MET. Mesmo perfil foi encontrado por Ortan *et al.* (2009). Vesículas lipídicas carregadas de óleo de *Thymus capitatus* também foram instáveis após 60 dias mantidas em temperatura ambiente, em que um aumento de tamanho de 71 para 500 nm foi identificado (MANCONI *et al.*, 2018). Em adição, variação de 173 para 245 nm também foi demonstrada para lipossomas após seis meses mantidos a 25 °C (WEN *et al.*, 2010). Sendo assim, pode-se concluir que os lipossomas se mantêm mais estáveis quando armazenados a 4 °C, temperatura esta que difere do presente trabalho e justificaria os resultados de baixa estabilidade.

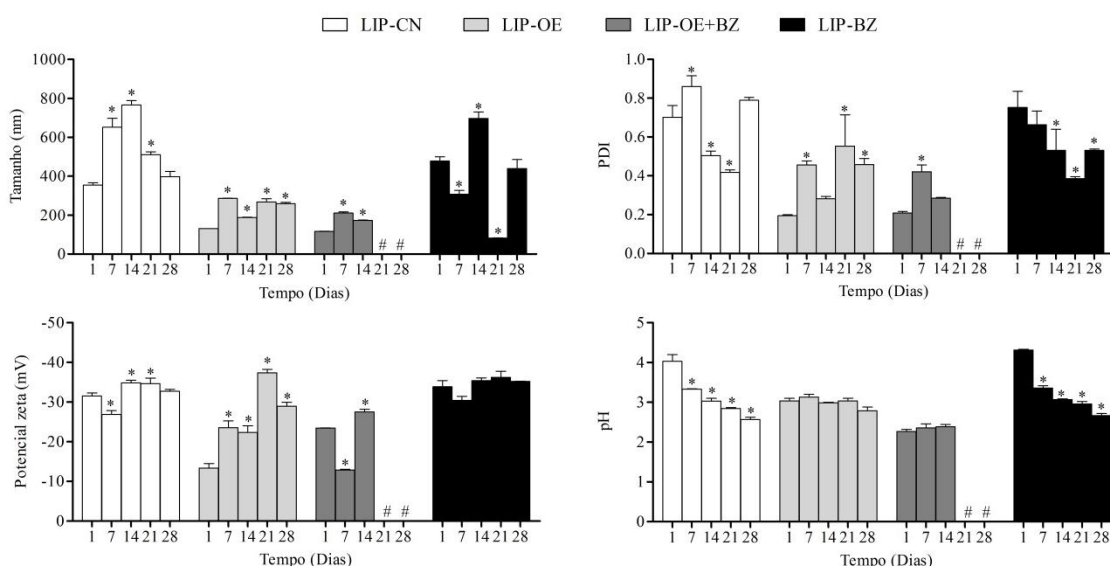


Figura 22: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas lipossomais de acordo com o período analisado. LIP-CN: Lipossoma como controle negativo; LIP-OE: Lipossoma contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; LIP-OE+BZ: Lipossoma contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e benznidazol; LIP-BZ: Lipossoma contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$. # Sistema instável.

Em relação às formas micelares, estas demonstraram ser mais estáveis, uma vez que um aumento de tamanho foi observado somente para a formulação controle, bem como, nenhuma alteração do PDI foi encontrada. Neste mesmo perfil, apenas MIC-CN apresentou uma redução do potencial zeta, o que configuraria um sistema instável, e o pH foi mantido para todas as micelas (Figura 23).

Formulações desenvolvidas a partir de ftalocianina de zinco, óleo essencial de alho e Pluronic F127 foram mantidas a temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (8 °C) por 60 dias e se mantiveram estáveis em ambas as condições, uma vez que não foi observada alteração no tamanho, PDI e pH durante o período analisado (DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA *et al.*, 2017). Manutenção da estabilidade e uniformidade também foi demonstrada para os sistemas nanoestruturados desenvolvidos a partir do Poloxamer 407 e óleo essencial de alho mantidos a temperatura ambiente, sendo esses resultados reproduzidos após a adição de 8-methoxipsoralen (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Portanto, para este tipo de sistema a manutenção da estabilidade não dependeu das condições de armazenagem, o que reforça ser mais vantajoso quando comparado com as formas farmacêuticas anteriores.

No entanto, dados do estudo de estabilidade do óleo essencial de *Artemisia arborescens* em sistemas de Poloxamer 188 indicou um leve aumento de tamanho e PDI após 60 dias de armazenamento a temperatura ambiente e a 40 °C e uma manutenção desses parâmetros foi detectada a baixas temperaturas (4 °C). Em adição, o potencial zeta foi reduzido para todas as condições de armazenamento (LAI *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que além da temperatura o tipo de surfactante também pode interferir na estabilidade dos sistemas, uma vez que conclusões controversas foram obtidas ao analisarmos os trabalhos citados anteriormente. É sabido que as regiões formadas pelo Poloxamer na superfície das partículas não atuam de maneira tão eficiente em temperaturas elevadas, uma vez que uma demasiada energia cinética entra no sistema e pode levar a desestabilização (FREITAS & MÜLLER, 1999). Essa informação somada aos dados experimentais sugere que a melhor forma para manter o sistema micelar estável é acondicionando-o sob refrigeração, assim como descrito para as outras formas farmacêuticas desenvolvidas no presente trabalho.

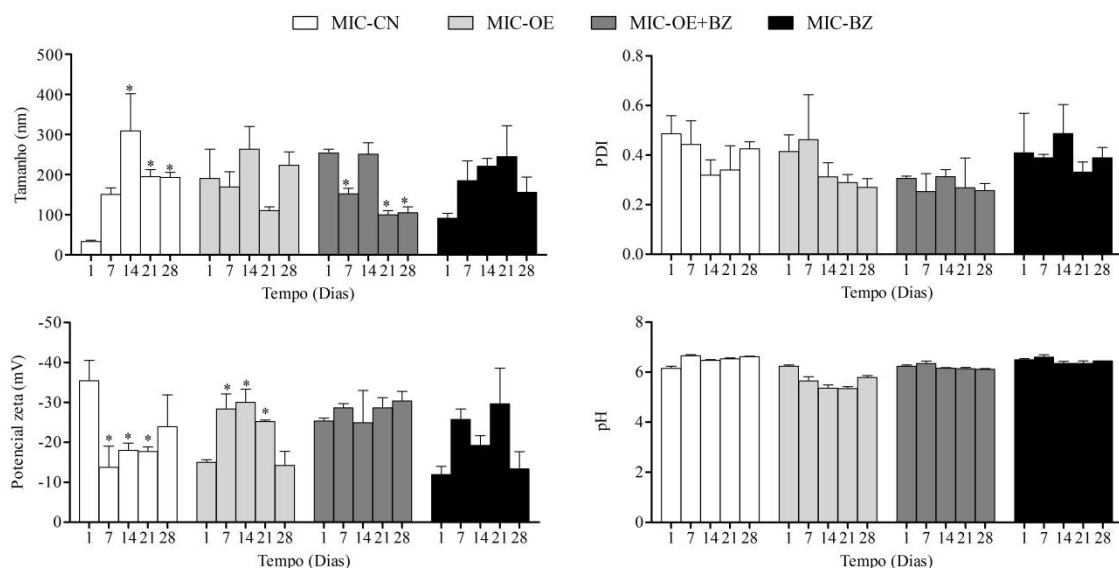


Figura 23: Avaliação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH dos sistemas micelares de acordo com o período analisado. MIC-CN: Micela como controle negativo; MIC-OE: Micela contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; MIC-OE+BZ: Micela contendo óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e benznidazol; MIC-BZ: Micela contendo benznidazol. *Diferença estatística em relação ao período inicial (Tempo 1 dia), $p < 0,05$.

4.3. Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

4.3.1. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

O óleo essencial de *C. densiflorus* apresentou atividade contra *T. cruzi*, mas a eficácia não atingiu os níveis requeridos terapeuticamente para um ensaio *in vivo* (IS>50) (ROMANHA *et al.*, 2010). Portanto, o encapsulamento deste óleo, bem como do fármaco de referência foram desenvolvidos como alternativa para potencializar o efeito tripanocida sem provocar danos às células do hospedeiro. Um efeito dose-dependente sobre as formas parasitárias do *T. cruzi* foi demonstrado para todos os sistemas nanoestruturados desenvolvidos. Este fato ocorre devido a um conjunto de fatores como carga superficial e tamanho médio de partícula reduzido, que permitem o transporte eficiente de óleo e BZ através da membrana celular, bem como, facilita a interação com múltiplos sítios moleculares (DONSÌ & FERRARI, 2016; WU *et al.*, 2014).

As nanoemulsões foram capazes de reproduzir o efeito tripanocida de ambos os ativos a partir de concentrações menores aos dos fármacos livres (Tabela 14). O uso desses sistemas previne a degradação dos fármacos para uma administração oral, aumentando sua absorção (DONSÌ *et al.*, 2011). Além disso, pode levar ao aumento da

eficiência do produto com conseqüente redução da dose e frequência do tratamento (CUI *et al.*, 2006). No entanto, uma atividade antiparasitária não desejada foi revelada pelo controle da formulação, o que indica que os excipientes sozinhos seriam responsáveis por esse efeito. Este mesmo perfil também foi encontrado para as formas lipossomais, com exceção do LIP-OE que demonstrou uma eficácia ligeiramente maior do que o controle (Tabela 14). Em contrapartida, os carreadores nanoemulsionados apresentam vantagens sobre a formulação lipossomal como fácil obtenção, baixa complexidade, maior estabilidade, bem como, alta capacidade de incorporar componentes lipofílicos, o que justifica a necessidade de menores doses de OE e, principalmente de BZ para reproduzirem efeito similar aos lipossomas (SAINSBURY, ZENG & MIDDELBERG, 2014; LOVELYN & ATTAMA, 2011).

Tabela 14: Determinação da CI_{50} das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* e das células L929 sob ação dos sistemas nanoestruturados e determinação do índice de seletividade para a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Sistema Nanoestruturado	CI_{50} sobre o parasito ¹ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			CI_{50} sobre L929 ² ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Índice de Seletividade ³
	SN ⁴	OE ⁵	BZ ⁶	SN ⁴	OE ⁵	BZ ⁶	
NE-CN	60	-	-	130	-	-	2,2
NE-OE	140	7,0	-	540	27	-	3,8
NE-OE+BZ	130	6,5	0,01	500	25	0,04	3,8
NE-BZ	80	-	0,006	250	-	0,02	3,1
LIP-CN	4680	-	-	4400	-	-	Inativo
LIP-OE	3420	20,5	-	4500	27	-	1,3
LIP-OE+BZ	6700	20,1	1,1	16000	48	2,56	2,4
LIP-BZ	7760	-	2,5	8700	-	2,78	1,1
MIC-CN	Inativo	-	-	>50000	-	-	Inativo
MIC-OE	8100	81	-	37200	372	-	4,6
MIC-OE+BZ	2100	10,5	0,168	62500	312,5	5	30
MIC-BZ	2400	-	0,384	>125000	-	>20	>52
OE livre		60			230		3,8
BZ livre		1			625		625

¹Concentração que reduz em 50% o crescimento parasitário; ²Concentração que induz 50% de morte celular; ³ CI_{50} sobre as células dividido pelo CI_{50} sobre o parasito; ⁴Concentração do sistema nanoestruturado; ⁵Concentração do óleo essencial encapsulado; ⁶Concentração do benznidazol encapsulado; NE: Nanoemulsão; LIP: Lipossoma; MIC: Micela; CN: Controle negativo; OE: Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ: Benznidazol.

Na literatura já foram identificados estudos antiparasitários para ambas as nanoestruturas. Uma significativa redução no número de parasitos *T. evansi* foi observada em testes com a forma nanoemulsionada dos óleos de *Carapa guaianensis* e *Schimus molle* quando comparada com o controle sem tratamento e a formulação na ausência de ativo (BALDISSERA *et al.*, 2013). O óleo de andiroba (*C. guianensis*) nanoemulsionado também foi efetivo contra formas promastigotas de *L. infantum* e *L.*

amazonensis (CI₅₀ 366 e 590 µg/mL). No entanto, a nanoemulsão baseada no óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) mostrou maior potencial leishmanicida (CI₅₀ 16 e 18 µg/mL) (DHORM PIMENTEL DE MORAES *et al.*, 2018). Concentrações superiores a 100 mg/L da nanoemulsão contendo óleo de *Pterodon emarginatus* revelou atividade antiparasitária contra espécies de vermes pertencentes a classe Monogenea (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*) (VALENTIM *et al.*, 2018). No caso de nanoemulsões contendo BZ, Streck *et al.* (2019) demonstraram que todas as formulações desenvolvidas induziram um aumento significativo da eficácia deste fármaco em relação a sua forma livre, com valores de CI₅₀ variando de 0,74 a 0,02 µg/mL para formas epimastigotas e de 0,39 a 0,53 para tripomastigota, os quais são bem maiores ao nosso estudo.

O uso de formulações lipídicas está relacionado ao direcionamento passivo dos fármacos para o sistema mononuclear fagocítico para um efeito potencializado, modificação da farmacocinética e uma subsequente redução da citotoxicidade, além de uma liberação prolongada ou direcionada. Diversos estudos relatam o carreamento de BZ em lipossomas e suas características físico-químicas, como eficiência de encapsulamento, taxa de liberação e solubilidade (MORILLA, PRIETO & ROMERO, 2005; MORILLA *et al.*, 2002). No entanto, poucos avaliam seu efeito tripanocida após a formulação, o que dificulta a confirmação da eficácia dos sistemas desenvolvidos. Este fato pode estar relacionado aos fracassados resultados encontrados para essa forma farmacêutica.

Morilla *et al.* (2004) avaliaram se a entrega de BZ especificamente para o fígado poderia ser aumentada após encapsulá-lo em lipossomas multilamelares. No entanto, nenhum efeito sobre os níveis de parasitemia em camundongos infectados por *T. cruzi* foi observado. As concentrações de BZ alcançadas por Vinuesa *et al.* (2017) no carreamento em lipossomas foram baixas (<12 mM), o que tornaram o efeito antiparasitário insignificante. Em adição, doses de até 30 mg/kg i.v. de anfotericina B lipossomal prolongaram a sobrevivência em modelo murino, mas não foram curativas nos regimes estudados (CLEMONS *et al.*, 2017). Por fim, nenhum trabalho relacionando o encapsulamento de óleos essenciais em lipossomas e seu potencial tripanocida foi encontrado para comparação dos resultados. Esta realidade reforça a importância dos nossos dados, uma vez que foi alcançada a reprodução da atividade de

ambos os ativos na forma lipossomal, além das vantagens do carreamento nanoestruturado, como proteção contra degradação, aumento da solubilidade e liberação gradual, serem mantidas.

Em relação à estrutura micelar, o controle foi inativo nas concentrações testadas. Além disso, esses sistemas permitiram a manutenção da eficácia de ambos os ativos (Tabela 14). Estudos prévios já vêm demonstrando a capacidade das micelas em potencializar o efeito biológico avaliado. Avaliação da atividade fotodinâmica da hipericina sobre *T. cruzi* foi realizado por De Moraes *et al.* (2019) e revelou maior eficácia das micelas (F-127 e P-123) quando comparadas ao fármaco livre. Amostras do ativo na forma micelar mostraram ação mesmo no escuro, com um CI_{50} em torno de 6 a 8 $\mu\text{mol/L}$. Por outro lado, quando iluminadas revelaram valores muito menores (CI_{50} 0,31 $\mu\text{mol/L}$). A atividade tripanocida da benzidrazida de 5-nitro-2-furfurililideno foi avaliada por Rangel-Yagui *et al.* (2007) e encontraram uma completa eliminação do parasito após 3 dias de tratamento. No entanto, a solução micelar contendo a mesma concentração do ativo livre foi capaz de erradicar imediatamente a cultura de epimastigotas. Em adição, formulação de Poloxamer 188 carregada de BZ reduziu a taxa de sobrevivência de tripomastigotas a partir de uma CI_{50} de 36 $\mu\text{g/mL}$, sendo esse efeito superior quando comparado com a forma convencional do fármaco (CI_{50} 49 $\mu\text{g/mL}$) (SCALISE *et al.*, 2016). Por outro lado, nenhum relato na literatura sobre o encapsulamento de óleos essenciais em sistemas micelares e posterior avaliação do efeito contra *T. cruzi* foi encontrado, o que não possibilitou a comparação dos nossos resultados.

Em adição, no caso da MIC-OE+BZ, os resultados sugerem que as micelas apresentam uma atividade mais forte comparada com os fármacos livres e encapsulados separadamente, uma vez que a concentração de ambos os ativos foi reduzida (Tabela 14). De acordo com os resultados encontrados no capítulo 1, o mecanismo pelo qual os monoterpenos podem atuar nas células do *T. cruzi* está relacionado à sua capacidade de desestabilizar a membrana celular. Estes compostos, devido ao seu caráter lipofílico, interagem com a bicamada fosfolipídica que forma a membrana celular, alterando sua integridade e função. Esta alteração facilitaria, portanto, a entrada do BZ e, por conseguinte uma reprodução da atividade tripanocida a partir de doses reduzidas. O aumento da atividade tripanocida *in vitro* das nanopartículas poderia também ser

explicado por uma interação entre a superfície das nanopartículas e a parte externa das bicamadas das membranas biológicas. De fato, o revestimento de surfactante da superfície das nanopartículas pode facilitar a penetração do fármaco encapsulado no parasito (LHERM *et al.*, 1987).

Segundo Wagner & Ulrich-Merzenich (2009), sinergismo entre dois fármacos pode ser demonstrado quando o efeito produzido pelos compostos usados em combinação é maior do que a soma dos efeitos de cada componente utilizado sozinho. Sendo assim, o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado para determinar se houve um efeito de sinergia, indiferença ou antagonismo quando combinados o OE e o BZ nos sistemas nanoestruturados. De acordo com a tabela 15, um efeito sinérgico foi demonstrado para as formas nanoemulsionadas e micelares em comparação com a forma livre dos ativos. No entanto, essa ação só foi mantida para as micelas quando analisamos os fármacos encapsulado separadamente, o que reforça a eficácia desse sistema como alternativa para combater o *T. cruzi*. Em adição, os efeitos para cada sistema foram indicados por isobogramas (Figura 24), em que abaixo da linha contínua é observada a região de sinergia.

Tabela 15: Determinação do índice da concentração inibitória fracionada e do efeito sobre a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* quando combinado com o benznidazol.

	Sistema nanoestruturado	ICIF	Efeito
NE-OE+BZ	Fármaco livre	0,118	Sinérgico
	Fármaco encapsulado	2,588	Antagonista
LIP-OE+BZ	Fármaco livre	1,435	Indiferente
	Fármaco encapsulado	1,420	Indiferente
MIC-OE+BZ	Fármaco livre	0,343	Sinérgico
	Fármaco encapsulado	0,566	Sinérgico

ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada; NE: Nanoemulsão; LIP: Lipossoma; MIC: Micela; OE: Óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*; BZ: Benznidazol.

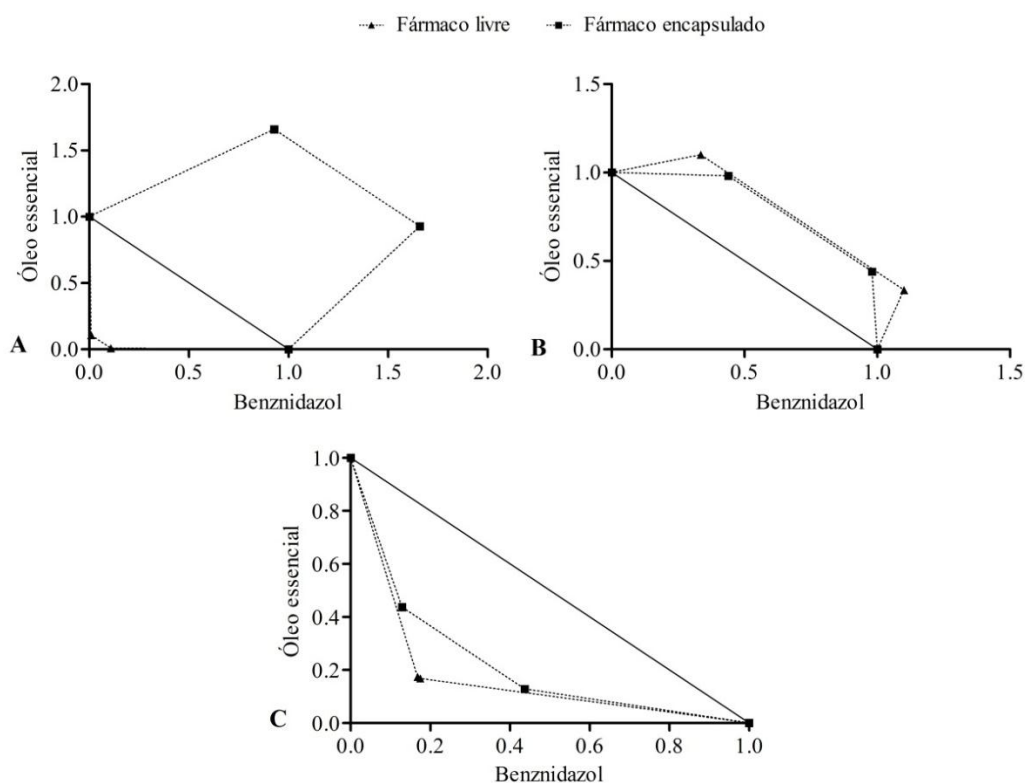


Figura 24: Isobogramas descrevendo os efeitos do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* quando combinado com o benznidazol nas formas nanoemulsionadas (A), lipossomais (B) e micelares (C). Abaixo da linha contínua corresponde às posições para um efeito sinérgico.

Na quimioterapia convencional, a combinação de fármacos é uma abordagem terapêutica útil para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais (SÜLSEN *et al.*, 2016). Nessa estratégia, a eficácia e toxicidade dos fármacos já são conhecidas, o que agiliza a comercialização do novo produto desenvolvido. Nesse sentido, diferentes pesquisadores têm unido as duas abordagens, a partir do desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, bem como, o encapsulamento de forma concomitante de compostos que apresentam propriedades sinérgicas com o intuito de melhorar a biodisponibilidade e a eficácia (CONTRERAS *et al.*, 2018; KYRIAZI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018a; ZHONG *et al.*, 2018; BAHNSON *et al.*, 2016). A sinergia já é explorada no tratamento da Tripanossomíase Humana Africana através do uso combinado de nifurtimox e eflornitina, em que esse encapsulamento de múltiplas drogas foi eficaz contra o parasito *T. brucei*, embora mais estudos sejam necessários (KENNEDY, 2013). Em comparação com os fármacos livres, a combinação do extrato etanólico de *Physalis angulata* e BZ reduziu ambos os valores de CI_{50} (MEIRA *et al.*, 2015). A associação de um derivado do ácido betulínico e BZ também revelou efeito

sinérgico sobre formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. Deformação na membrana plasmática, retração do flagelo e vacuolização citoplasmática estão entre as alterações observadas no parasito após tratamento com esse triterpeno (MEIRA *et al.*, 2016). Resultado semelhante quanto ao sinergismo e mecanismo de ação foi demonstrado anteriormente neste trabalho, o que corrobora com os nossos achados.

Em síntese, o BZ é o fármaco padrão na terapêutica chagásica, porém atua principalmente na fase aguda da doença e revela efeitos colaterais intensos. O óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* demonstrou alto potencial contra o parasito, no entanto, sua citotoxicidade também foi elevada. Estes relatos apresentam desvantagens de ambos os tratamentos, os quais quando administrados de forma isolada podem demonstrar perda de eficácia. Por outro lado, quando usado em combinação na forma micelar, esses fármacos exibiram potente atividade sinérgica contra o *T. cruzi*. Neste contexto, a combinação de terapias pode ser uma ferramenta valiosa para aumentar a eficácia do tratamento através da redução de dose e toxicidade, assim como, para prevenir o desenvolvimento potencial de cepas resistentes, características estas que podem ser vantajosas para o tratamento de doenças parasitárias.

4.3.2. Citotoxicidade

Os estudos de toxicidade são cruciais para a compreensão dos efeitos potencialmente nocivos de novos nanomateriais formulados, pois permite que se estabeleça uma dosagem não tóxica e apropriada para a bioaplicação (SONAWANE *et al.*, 2015; OBERDÖRSTER *et al.*, 2005). De acordo com a tabela 17 uma potencialização do efeito citotóxico foi indicada para ambos os ativos quando formulados em nanoemulsões e lipossomas. Nestes casos, a formulação controle também demonstrou ser tóxica, sugerindo, assim, que os excipientes poderiam estar relacionados á esse efeito. Por outro lado, o controle micelar não revelou ação prejudicial significativa às células de mamíferos nas concentrações testadas, além disso, essas estruturas foram capazes de reduzir a citotoxicidade do óleo essencial e uma reprodução dessa ação também é esperada para o BZ.

Em relação ao índice de seletividade de ambos os ativos (Tabela 14), não foi observado um aumento mesmo após encapsulamento em nanoemulsões e lipossomas, o que contraria a redução de citotoxicidade como característica desses sistemas. Este fato

pode estar relacionado à elevação do efeito tóxico dos ativos de forma similar para as células parasitárias e hospedeiras, além de uma ação prejudicial dos excipientes indicado anteriormente, a qual intensificaria esse resultado. No entanto, valores superiores de IS foram encontrados para as formas micelares em comparação com as outras formulações, embora o resultado para MIC-OE tenha sido menos significativo.

De acordo com a literatura, vários estudos têm reportado a avaliação da citotoxicidade para formulações nanoestruturadas como forma de comprovar a eficiência desses sistemas na entrega de fármacos. Neste contexto, nanoemulsões brancas desenvolvidas a partir de diferentes tipos e proporções de surfactantes foram obtidas por Streck *et al.* (2019). O ensaio de viabilidade celular usando linhagem de células Vero e SiHA revelou citotoxicidade para concentrações superiores a 200 µg/mL, confirmando que este efeito pode estar presente mesmo na ausência de um ativo. Segundo Streck *et al.* (2016), um aumento da citotoxicidade para nanoemulsões contendo BZ foi revelado a medida que a relação surfactante-óleo foi elevada, sugerindo que as estruturas anfifílicas seriam mais tóxicas do que o próprio óleo. No estudo feito por Dhorm Pimentel de Moraes *et al.* (2018), uma redução dos números de macrófagos foi observada em culturas de células tratadas com nanoemulsões do óleo de andiroba (*C. guianensis*) e copaíba (*Copaifera* sp.). No entanto, a formulação sem estes óleos não alterou a viabilidade celular, o que difere dos nossos resultados. Por outro lado, nanoemulsões contendo ácido linoleico não foram nocivas apenas para concentrações abaixo de 20 µg/mL, assemelhando ao presente trabalho (SONAWANE *et al.*, 2015).

Em relação aos lipossomas, a CI_{50} do óleo de *Santolina insularis* foi de 112 µg/mL e o mesmo valor foi obtido após o seu encapsulamento, o que se encontra acima dos números descritos no presente estudo (VALENTI *et al.*, 2001). Em contrapartida, nenhum efeito tóxico sobre queratinócitos foi observado tanto para o óleo de *Thymus capitatus* livre quanto para o encapsulado em vesículas lipídicas nas concentrações máximas de 20 µg/mL, corroborando com os nossos achados (MANCONI *et al.*, 2018). Segundo Vinuesa *et al.* (2017), a citotoxicidade dos lipossomas vazios sobre células L929 foi quase insignificante. No entanto, as formas carregadas com BZ apresentaram resultados paradoxais, uma vez que baixas concentrações exibiram toxicidade mais

acentuada em relação às maiores concentrações, o que difere do efeito dose-dependente demonstrado presente estudo.

No caso das micelas, uma redução de citotoxicidade do OE foi acompanhada do seu encapsulamento, além da ausência de um efeito nocivo da formulação controle (Tabela 14). No entanto, o IS para a formulação contendo somente o óleo ainda se manteve baixo. Portanto, este fato pode estar relacionado provavelmente ao efeito tóxico do próprio ativo, uma vez que concentrações menores de MIC-OE já foram prejudiciais quando comparadas com o controle.

Uma comparação entre os efeitos do surfactante não iônico nas células epimastigotas do *T. cruzi* e nos eritrócitos mostrou que o efeito lítico desse composto utilizado para formar as estruturas micelares é mais forte nas células do parasita (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2007). Formulações de Pluronic F127 não apresentaram citotoxicidade sobre macrófagos murinos (RAW 264.7) nas concentrações testadas. No entanto, após adição de ftalocianina de zinco e óleo essencial de alho um efeito tóxico foi revelado, indicando uma CI_{50} de 0,73 $\mu\text{g/mL}$ e um índice de seletividade da atividade leishmanicida menor do que 4, o que sugere uma pequena faixa de segurança quando comparada ao presente trabalho (DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA *et al.*, 2017). Por outro lado, sistemas de Poloxamer 188 carregados de BZ não demonstraram nenhuma diferença de viabilidade sobre células Vero quando comparados com a forma convencional do fármaco e células não tratadas. Este mesmo padrão foi estabelecido para o ensaio hemolítico. Além disso, nenhuma alteração morfológica e desestabilização da membrana celular foram observadas para esses tratamentos (SCALISE *et al.*, 2016). Todos esses resultados confirmam, portanto, a segurança e eficácia dos sistemas micelares para carrear compostos pouco solúveis em água.

Apesar dos baixos IS para as formas nanoemulsionadas e lipossomais, estes sistemas foram capazes de reproduzir a atividade biológica a partir de concentrações até inferiores quando comparadas com as dos fármacos livres. Além disso, o desenvolvimento destas formulações protege o fármaco da degradação, aumenta a absorção e facilita à difusão através do epitélio, promovendo, assim, uma distribuição mais eficiente dos ativos (COUVREUR & VAUTHIER, 2006). No entanto, todas essas vantagens somadas à capacidade de reduzir a citotoxicidade do óleo essencial e produzir

um efeito sinérgico com o BZ, fazem do sistema micelar uma promissora alternativa para a terapêutica chagásica.

Posto isto, a emergência da nanotecnologia nas últimas décadas apresenta uma oportunidade para explorar o efeito de óleos essenciais em sistemas nanoestruturados. Entretanto, existem poucos estudos relacionando essa temática e o tratamento da doença de Chagas, bem como, o efeito sinérgico de fármacos (KROUBI *et al.*, 2010; YONGSHENG *et al.*, 1996). Em adição, as nanopartículas precisam superar alguns desafios para serem eficazes e amplamente empregadas na medicina clínica, apesar de terem muitas qualidades positivas para o tratamento de doenças. As limitações estão associadas aos métodos de preparação, às vias de eliminação e ao desconhecimento dos mecanismos de ação, cada um deles representando uma área de interesse e exigindo mais estudos pela comunidade científica (ZHANG *et al.*, 2018b; ZHANG, KIM & HUANG, 2018). Sendo assim, nossos resultados reforçam a importância dessa perspectiva tecnológica e indicam que a forma micelar do BZ tanto sozinho ou em sinergia com o óleo de *C. densiflorus* tem um grande potencial na quimioterapêutica tripanocida, sendo aconselhada para futuros testes *in vivo*.

5. CONSIDERAÇÕES

O presente estudo demonstrou a viabilidade em desenvolver sistemas nanoemulsionados, lipossomais e micelares contendo óleo essencial de *C. densiflorus* e/ou benznidazol com tamanho inferior a 500 nm, o que os caracterizam como nanométricos. As nanoemulsões apresentaram os menores índices de polidispersividade, no entanto, a adição dos princípios ativos favoreceu a homogeneidade para todas as formulações. Além disso, potencial zeta negativo e um pH ácido também definiram as formulações.

Apesar dos valores de PDI e carga superficial para algumas estruturas estarem abaixo do desejado, pode-se dizer que a estabilidade foi mantida para grande parte dos sistemas desenvolvidos, exceto para o lipossoma encapsulando ambos os ativos. No entanto, esses resultados foram obtidos para um armazenamento a temperatura ambiente e após a análise de dados na literatura, sugere-se que um menor grau de instabilidade é obtido quando a manutenção ocorre sob refrigeração.

De uma forma geral, as formulações foram capazes de reproduzir a atividade tripanocida apresentada pelo óleo de *C. densiflorus* e benznidazol a partir de concentrações inferiores quando comparadas aos fármacos livres. No entanto, uma potencialização da citotoxicidade também ocorreu para as nanoemulsões e lipossomas. Por outro lado, esta ação foi reduzida para o óleo essencial quando incorporado nas micelas, as quais foram caracterizadas pelos maiores índices de seletividade. Além disso, um efeito sinérgico foi comprovado quando ambos os fármacos foram encapsulados concomitante nessa forma farmacêutica. Esta melhora da ação tripanocida a partir da associação do óleo essencial e benznidazol pode estar relacionada à presença ao mesmo tempo de diferentes alvos de ação para erradicar o parasita.

Sendo assim, esses resultados sugerem que as micelas contendo benznidazol podem ser uma alternativa na quimioterapia chagásica tanto na sua forma simples, bem como, em combinação com o óleo essencial de *C. densiflorus*.

CAPÍTULO 3

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS
NANOESTRUTURADOS – Doutorado Sanduíche**

Como informado anteriormente, os sistemas nanoestruturados apresentam diversas vantagens em relação as formas farmacêuticas convencionais. Neste contexto, foi proposto o desenvolvimento de um projeto sobre sistemas poliméricos carreadores de fármacos durante o período de doutorado sanduíche na University of Nottingham. Neste estudo, foram selecionadas nanopartículas obtidas através do copolímero PLA-PEG e de polímeros naturais, alginato e quitosana. Os resultados foram expostos no formato de artigo e na língua inglesa, a fim de facilitar o entendimento pelos colaboradores estrangeiros. O primeiro artigo “Development of PLA-PEG nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves for the treatment of Chagas disease” descreve o desenvolvimento e caracterização das formulações obtidas a partir de polímeros sintéticos e o artigo “Nanoparticles from natural polymers, alginate and chitosan, as an alternative for the treatment of Chagas disease” teve como proposta o uso alternativo de polímeros naturais.

**Development of PLA-PEG nanoparticles loaded with essential oil from
Cymbopogon densiflorus leaves for the treatment of Chagas disease**

ABSTRACT

Benznidazole is the choice drug for the treatment of Chagas disease, but it shows disadvantage as low efficacy in the chronic phase and intense side effects. Due to these facts, the search for alternative treatments is required. Essential oils have drawn attention for their antiparasitic properties although their physic-chemical characteristics difficult the administration. PLA-PEG system allows encapsulating of the lipophilic drugs in addition can enhance their biological potential. In this context, the aim of this study was the development of PLA-PEG nanoparticles as a delivery system for essential oil (EO) from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole (BZ) in order to evaluate their effects on *Trypanosoma cruzi*. Nanoparticles were prepared using emulsification method using three PLA-PEG ratios. PLA-PEG (85:15) was the best system and was characterized later. An average particle size below of 160 nm with homogeneous distribution (PDI<0.3) and negative zeta potential, as well as an acid character were observed. In addition, the dispersions were stable since there were no changes for these previous parameters after 28 days. Encapsulation efficiency rate was below of 40% to EO and above of 30% to BZ, varying according to the method. Drug

release assay demonstrated that the intestinal fluid was the best medium to the EO release while the pH close to 7 favored the BZ release. MET analysis confirmed the uniform distribution of the nanoparticles and spherical shape. The treatment with nanoparticulates EO and BZ led to a reduction in *T. cruzi* infection levels in fibroblast cultures and the EO cytotoxicity was reduced. Although the SI values were low, this study demonstrated the versatility of developing nanostructured systems that may have various advantages to the treatment of Chagas disease as controlled release and increased bioavailability.

Keywords: Polyethylene glycol (PEG), polylactide (PLA), biodegradable nanoparticles, drug delivery system, *Cymbopogon densiflorus*, essential oil, benznidazole, Chagas disease, anti-*Trypanosoma cruzi* activity.

INTRODUCTION

Natural products play an important role in the search for new active drugs and, among these compounds with biological potential, essential oils (EO) may be highlighted (SCHMIDT *et al.*, 2012a). EO are secondary metabolites produced by medicinal plants and can be extracted from a variety of species. They are used for many purposes due their biological actions, as antimicrobial, analgesic, sedative, anti-inflammatory, antispasmodic, anthelmintic, and antiprotozoal (AZEREDO *et al.*, 2014). In addition, natural products are easy to cultivate, biodegradable, and present low toxicity since they do not give rise to accumulations in animal tissue (COIMBRA *et al.*, 2006; CHAGAS *et al.*, 2002).

C. densiflorus is a large grass present throughout Africa, Asia and Australia (AKHILA, 2010; KHANUJA *et al.*, 2005; SOENARKO, 1977). It has popular use to the treatment of asthma, fever, abdominal pain, and epilepsy (TAKAISI-KIKUNI, TSHILANDA & BABADY, 2000; SOENARKO, 1977). In addition antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and parasitic properties have already been demonstrated in the literature (SEIBERT *et al.*, 2019; TAKAISI-KIKUNI, TSHILANDA & BABADY, 2000). Thus, phytotherapy is a alternative treatment for several parasitic infections as Chagas disease (SCHMIDT *et al.*, 2012a,b).

Trypanosoma cruzi is a blood protozoan parasite and the etiological agent of the Chagas disease (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Although the transmission by

vectors and new infections has declined by more than 70% in the American continent, the migration of chronically infected and asymptomatic individuals has led to the globalization of the disease (GASCON, BERN & PINAZO, 2010; SCHUMUNIS, 2007). Benznidazole (BZ) is the most common antiprotozoal drug used in the treatment of this disease (GASCON, BERN & PINAZO, 2010; URBINA, 2002). However, this drug has been ineffective mainly in the chronic phase and showed side effects (URBINA, 2009; CASTRO, MECCA & BARTEL, 2006; URBINA & DOCAMPO, 2003; URBINA 2002). Moreover, frequent episodes of parasites resistance to some drugs has been reported and new alternatives are required (MAUDLIN, HOLMES & MILES, 2004).

However, EO and BZ present disadvantages as low dispersion in water and nanotechnology researches represent a strategy for the inefficiency and/or low solubility of some hydrophobic drugs (VOLPEDO *et al.*, 2019; KALHAPURE *et al.*, 2015; SAHARMA *et al.*, 2012; HUH & KWON, 2011; ZHANG, 2010). Gradual and controlled release, increased bioavailability, reduced side-effects are some advantages showed for the nanostructured systems (BLECHER, NASIR & FRIEDMAN, 2011; ZHANG, 2010; COUVREUR & VAUTHIER, 2006; ROCO, 2001; VERMA & GARG, 2001). In addition, the small size allows a long circulation time of these structures, as well as reduces recognition and opsonization by macrophages (GONG *et al.*, 2012; NISHIYAMA & KATAOKA 2006). Dispersion using polymers is well established for this purpose (DE MELO *et al.*, 2013). Poly-ε-caprolactone (PCL), poly(lactide) (PLA), polyethylene glycol (PEG) and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) are examples of biodegradable polymers and are frequently used for encapsulation of EO in nanoparticulate systems (KHOEE & YAGHOUBIAN, 2009). This is possible due polymeric particles are composed of a hydrophilic and a hydrophobic parts that allow the incorporation low water soluble drugs inside their hydrophobic core (SHALABY *et al.*, 2014). PLA-PEG nanoparticles are an example of this alternative and studies have showed their efficacy over the conventional medicine (GONG *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2009; VENKATRAMAN *et al.*, 2005).

In this context, the development of new alternative for the treatment of Chagas disease is crucial. Therefore, the objective of this study was to evaluate the *in vitro*

susceptibility of *T. cruzi* to PLA-PEG nanoparticles loaded with essential oil from *C. densiflorus* leaves and/or benzimidazole.

MATERIAL AND METHODS

Botanical material

Cymbopogon densiflorus leaves were collected in Ouro Preto – MG/Brazil (20°23'51"S, 43°30'40"W). A voucher specimen (OUPR 28122) was identified by Prof. Hildeberto Caldas de Sousa and deposited in Herbarium Prof. José Badini, Federal University of Ouro Preto – MG/Brazil. The access was registered at SisGen, the Brazilian National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge under number AC902F3. The essential oil extraction was performed by the hydrodistillation (Linax[®]) according to Seibert *et al.* (2019).

Preparation of PLA-PEG nanoparticles

PLA-PEG nanoparticles were prepared from three different ratios: PLA-PEG (50:50), PLA-PEG (65:35) and PLA-PEG (85:15) using the single (O/W) and double (W/O/W) emulsification methods (ZAMBAUX *et al.*, 1998). The different copolymers were accurately weighed and dissolved in specific solvent (Ethanol:dichloromethane (1:1) to PLA-PEG (50:50) and PLA-PEG (65:35) and only ethanol to PLA-PEG (85:15)). The drugs, EO and BZ, were dissolved in the same solvent according to the used copolymer and added into the polymeric solution under stirring. Then ultrapurified water was added in this mixture and stirred by ultrasonic homogenizer (Bandelin Sonopuls hd 2070) at force 90% for 1 minute. This step occurred only for the double (W/O/W) emulsification method. Finally, the organic phase was added into polyvinyl alcohol aqueous solution 0.5% w/v (PVA – Nippon Gohsei) and the dispersions were stirred at force 47% for 3 minutes. These mixtures were concentrated to a final volume of 1 mL, in a rotatory evaporator to eliminate the organic solvent and to adjust the final concentration of EO and BZ to 10 mg/mL and 100 µg/mL, respectively (RITTER *et al.*, 2017). After the nanoparticles development, these systems were characterized by particle size and size distribution to select the best loaded system and continue the next assays. The qualitative and quantitative compositions of the nanoparticles were described in the table 1.

Table 1: Composition of PLA-PEG nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole.

Constituent	PLA-PEG nanoparticle			
	NP-NC	NP-EO	NP-EO+BZ	NP-BZ
PLA-PEG ¹	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Solvent ²	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Essential oil	-	10 mg	10 mg	-
Benznidazole	-	-	100 µg	100 µg
Water ³	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
PVA ⁴ 5%	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

¹PLA-PEG (50:50), PLA-PEG (65:35) and PLA-PEG (85:15); ² Ethanol:dichloromethane (1:1) to PLA-PEG (50:50) and PLA-PEG (65:35), and ethanol to PLA-PEG (85:15); ³Double emulsification method (w/o/w); ⁴PVA – Polyvinyl alcohol; NP – PLA-PEG nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Determination of particle mean size and polydispersity index

The particle mean size and the polydispersity index (PDI) of the nanoparticles were measured by photon correlation spectroscopy using Zetasizer (Zetasizer Nano series - Nano ZS, Malvern). Samples were diluted in distilled water and analyzed at 170° detection angle. The polydispersity index reflects the homogeneity profile of the diameter of the sample's droplets and a value under 0.3 was considered satisfactory. The median and standard deviation analysis was performed in triplicate (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of Zeta potential

The zeta potential of the nanoparticles was determined by electrophoretic mobility measurements of suspended particles using Zetasizer (Zetasizer Nano series - Nano ZS, Malvern). The samples were diluted in distilled water and inserted into a capillary cell. The measurements were performed in triplicate and the results were expressed in millivolts (mV) (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of pH

The potential of hydrogen (pH) of the nanoparticles was measured directly in the suspensions using a potentiometer (Fisherbrand Hydrus 600) previously calibrated with buffer solutions pH 4.0 and 7.0. The pH values were determined by the average of three replicates at 25 °C (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of encapsulation efficiency

The samples were scanned at intervals of 200 to 400 nm and 400 to 600 nm in the spectrophotometry analysis to observe their characteristic absorbance and fluorescence peaks, respectively. After preparation, the nanoparticles were filtered using an acetate membrane (0.22 μm) to remove the excess of non-encapsulated drug and freeze-dried (GVD3 Freeze Dryer Girovac) (SEREMETA *et al.*, 2019). Samples were suspended in ethanol or acetonitrile according to the used method. Encapsulation efficiency (EE) analyses were assayed by means of spectrophotometric (S) (TECAN SPARK 10 M) and chromatographic (C) (HPLC Shimadzu) methods at 296 and 324 nm wavelengths to EO and BZ, respectively. Calibration curves were performed (EO-S: $y = 0.0002x - 0.021$; $R^2 = 0.9988$; EO-C: $y = 30.067x + 1878$; $R^2 = 0.9986$ and BZ-S: $y = 3.4275x - 1952.2$; $R^2 = 0.9924$; BZ-C: $y = 1.2936x + 3725.5$; $R^2 = 0.9576$). Essential oil was also quantified by fluorescence from both methods at 350 nm excitation wavelength and 417 nm emission wavelength (EO-S: $y = 3.4275x - 1952.2$; $R^2 = 0.9924$; EO-C: $y = 1.2936x + 3725.5$; $R^2 = 0.9576$). The HPLC analysis was carried out according the following conditions: mobile phase: A – ultrapure water and C – acetonitrile (ACN); isocratic elution (0-1.0 min: 20% ACN; 1.0-15.0 min: 20 to 70% ACN; 15.0-17.0 min: 70% ACN; 17.0-18.0 min: 70 to 20% ACN; 18.0-25.0 min: 20% ACN); run time: 25.0 min; flow: 1.0 mL/min; column temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$; samples temperature: 19,5 $^{\circ}\text{C}$; column: C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm – Phenomenex[®]); injection volume: 20 μL and wavelengths: 296 and 324 nm (PERIN *et al.*, 2017). The EE percentage was calculated in triplicate using the following equation:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{amount of drug quantified in nanoparticle}}{\text{theoretical amount of drug in the system}} \times 100$$

Determination of drug release profile

The *in vitro* drug release study was performed using dialysis membrane (SnakeSkin[™] Dialysis Tubing). Nanoparticles were added in the donor compartment and it was placed in contact with the receptor medium under stirring at 37 $^{\circ}\text{C}$ (Fisher Scientific). Three different receptor solutions were used: A - phosphate buffer solution (PBS) and 10% Tween 80 (pH 7.4); B – fasted state simulated gastric fluid (FaSSGF) (pH 1.6) and C – fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF) (pH 6.5) (JANTRATID

et al., 2008). At specific intervals (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 24, 48, 96 and 168 hours for A solution and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours for B and C solutions), aliquots were removed from receptor medium and the same volume of a freshly solutions was replaced to maintain the sink conditions. The samples were freeze-dried (GVD3 Freeze Dryer Girovac) and suspended in acetonitrile. Percentages of EO and BZ released were determined by chromatographic method at 296 and 324 nm, respectively, according previous conditions.

TEM analysis

The surface morphology of nanoparticles and size distribution were observed using a transmission electron microscope (JEOL 2100F FEG-TEM) operated at 200 kV. Samples were diluted in ultrapure water and deposited on a copper mesh grid. The excess of fluid then was removed with filter paper and the samples were left to dry to be observed (BARRADAS *et al.*, 2017).

Stability study

The measurements of particle mean size, PDI, zeta potential and pH were conducted for all samples immediately after processing and again at intervals of 1, 7, 14, 21 and 28 days to stability study on samples maintained at room temperature.

Evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity

In vitro test of trypanocidal activity adopting β -galactosidase-transfected Tulahuen *T. cruzi* strain was performed as previously describe by Romanha *et al.* (2010). Briefly, infective trypomastigote forms were obtained through culture in monolayers of mouse L929 fibroblasts in RPMI-1640 medium without phenol red (Gibco BRL), containing 10% fetal bovine serum and 2mM glutamine. For the bioassay, 4,000 L929 cells were added to each well of a 96-well microplate. After an overnight incubation at 37°C and 5% CO₂, 40,000 trypomastigotes were added to the cells and the plate was incubated for 48 hours. The medium was then replaced with solutions of loaded nanoparticles between 50 and 0.78 mg/mL in fresh medium and the plate was incubated for 96 hours. After this period, chlorophenol red glycoside in 0.5% Nonidet P40 was added and the plate incubated for 18 hours, after which the absorbance

at 570 nm was measured. A negative control with uninfected cells (100% cure) and infected cells without treatment (0% cure) were used as comparative parameters. In addition, infected cells treated with EO and BZ free, as well as formulation negative control were used in parallel. The results were performed in triplicate and expressed as the percentage of *T. cruzi* growth inhibition.

Evaluation of cytotoxicity

In vitro cytotoxicity test using AlamarBlue™ assay was performed as previously describe by Romanha *et al.* (2010). Briefly, 4,000 mouse L929 fibroblasts in the same previous RPMI-1640 medium were added to each well of a 96-well microplate and incubated for three days at 37 °C and 5% CO₂. The medium was then replaced with solutions of loaded nanoparticles between 50 and 0.78 mg/mL in fresh medium and the plate was incubated for four days. After this period, AlamarBlue™ was added and the plate was incubated for 4-6 hours, after which the absorbance at 570 and 600 nm was measured. The same controls in the previous test were used. The results were expressed as the percent difference in the reduction between treated (TC) and untreated cells (UT), using the following equation:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(117,216)(Abs_{570\text{ TC}}) - (80,586)(Abs_{600\text{ TC}})}{(117,216)(Abs_{570\text{ UT}}) - (80,586)(Abs_{600\text{ UT}})} \times 100$$

Evaluation of membrane permeability

In vitro cytotoxicity on mouse L929 fibroblasts was also evaluated by the lactate dehydrogenase (LDH) assay (Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit), which is a marker of integral membrane. In a 96-well microplate, 5,000 cells were added in a final volume in each well and incubated for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. After this period, the medium was replaced and controls and samples were added in triplicate. For the negative control only culture medium was used, whereas for the positive control 1% triton X solution was added. The loaded nanoparticles were diluted from the 1:2 serial dilutions at concentrations from 500 to 3.9 mg/mL. Free EO and BZ were added, respectively, from 5 to 0.039 mg/mL and from 50 to 0.39 µg/mL.

After 24 hours incubation period, the samples were removed and 5 µL of lysis solution was added, completing the final volume with culture medium (150 µL). The

plate was incubated for 45 minutes and 25 μL of each well were then removed and transferred to a new plate. In this second plate, 50 μL of the dye was added and incubated for 30 minutes at room temperature and protected from light. Finally, 25 μL of HCl was added and absorbance at 490 nm was measured. The results were expressed by the percentage of cytotoxicity from the equation below:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{negative control}})}{(Abs_{\text{positive control}} - Abs_{\text{negative control}})} \times 100$$

Statistical analysis

The results are presented as mean and standard error and were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) followed by comparison with the Bonferroni test using Graph Pad Prism 5.0 software. The significance level was $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of particle mean size and polydispersity index

The particle mean size and polydispersity index of the initial PLA-PEG nanoparticles using three different ratios (50:50; 65:35 and 85:15) are shown in figure 1. According these results PLA-PEG (85:15) nanoparticles and double-emulsion method showed the best results for the previous parameters and were selected to encapsule the essential oil and/or benznidazole. Ladj-Minost (2012) demonstrated that hydrophobicity decreased the size of nanoparticles and increased the active molecule entrapment efficiency. Moreover, Bilati, Allemann & Doelker (2003) concluded that a second mixing step (W/O/W) had a great influence on the final mean particle size. In this context, PLA nanoparticles with an average size of 200 nm and a low PDI were prepared by Zambaux *et al.* (1998) using the same double-emulsion method. Other report demonstrated that the particle size decreased from 159 nm to 113 nm when the concentration of PVA increased from 1 to 5%, which was the same amount used in our work, due to an improvement in the emulsification process (MANCHANDA *et al.*, 2010).

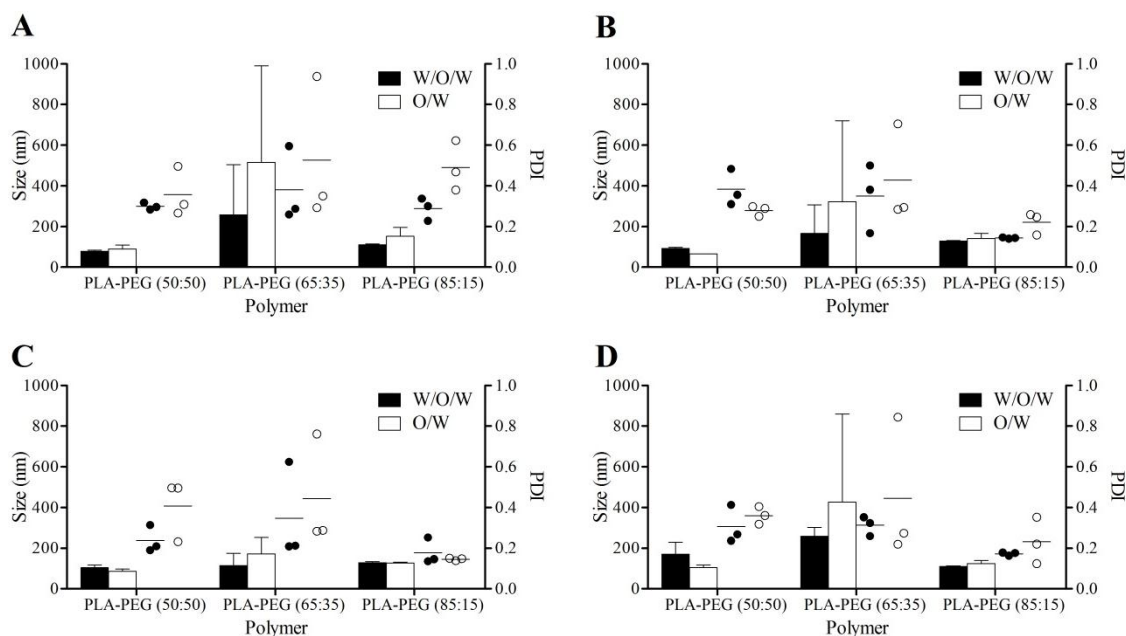


Figure 1: Particle size and size distribution of nanoparticles obtained from PLA-PEG (50:50), PLA-PEG (65:35) and PLA-PEG (85:15) by single (o/w) and double (w/o/w) emulsion method. A – Nanoparticles as negative control; B – Nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; C - Nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole; D – Nanoparticles loaded with benznidazole; Bars refer to size and circles refer to PDI.

The PLA-PEG (85:15) nanoparticle control presented mean size of 121 nm and an increase in this value was observed after drug encapsulation, but all structures maintained a mean size below 160 nm, as shown in table 2. On the other hand, a reduction of PDI values was demonstrated for the loaded particles, being characterized as a narrow size distribution ($PDI < 0.3$). Shalaby *et al.* (2014) prepared PLA-PEG copolymers using different molecular weights of PLA blocks and particles sizes between 42 and 485 nm were found. According this author, the mean diameter increased as the polymer and drug ratio decreased. However, an opposite profile was observed when the copolymer was prepared with the biggest concentration of PLA, that is in agreement with our results. In addition, low values of PDI were shown for this same condition.

Similar approach was observed by Dos Santos-Silva *et al.* (2017), which BZ slightly enhanced the particle size due to the known solute contribution effect. Besides PEO (2000)-PLA (1400) nanoparticles loaded with BZ showed mean size of 194.6 nm and PDI 0.211 (RAMBO, BRITTA & NAKAMURA, 2015). Moreover, *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in poly- ϵ -caprolactone nanoparticles demonstrated droplet size round of 236 nm with polydispersity of 0.112, suggesting that the polymer

may influence in these parameters (RITTER *et al.*, 2017). This difference could be justified by PEG influence on the interfacial tension between solvents. In agreement with this finding, values of 182.5 and 105 nm were found for poly- ϵ -caprolactone and PLA-PEG nanocapsules loaded with lychnopholide isolated from *Lychnophora trichocarpha*, respectively. Both nanoparticle populations were also monodisperse with PDI lower than 0.3 (BRANQUINHO *et al.*, 2014). Same profile for these previous nanocapsules was also showed by De Mello *et al.* (2016). All these reports corroborate with our study and confirm the versatility of carrying hydrophobic drugs in small and uniform PLA-PEG systems. These characteristics are required for a safety intravenous administration and for accessing leaky endothelium in infectious and inflammatory process which are observed during the Chagas disease (PEREIRA *et al.*, 2009).

Table 2: Average size, polydispersity index, zeta potential and pH of the PLA-PEG (85:15) nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole.

Nanostructured system	Characterization			
	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	pH
NP-NC	121.57 ± 3.07	0.204 ± 0.08	-4.70 ± 1.15	3.60 ± 0.01
NP-EO	146.70 ± 4.07	0.104 ± 0.01	-5.51 ± 0.63	3.57 ± 0.01
NP-EO+BZ	151.87 ± 1.76	0.084 ± 0.01	-5.78 ± 0.11	3.68 ± 0.01
NP-BZ	123.10 ± 2.18	0.187 ± 0.02	-4.18 ± 0.01	3.52 ± 0.01

PDI – Polydispersity index; NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Determination of Zeta potential

The zeta potential enables prediction of the nanoparticles stability, given repulsion forces between the droplets predominate and prevent instability processes. In general, the border between stable and unstable suspensions is considered for a zeta potential value greater than |30| mV (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015). According to table 2, the formulations showed zeta potential values between -4.18 and -5.78 mV. These negative values can be attributed to the presence of ionized carboxylic groups, such as those present in the lactic acid of PLA. In addition, the low absolute value is probably associated to the masking of these groups by PEG, which has no surface charge. According to Dos Santos-Silva *et al.* (2017), high concentrations of surfactant reduced the zeta potential due to the surfactant adsorption on the nanoparticles. Although these values were lower than established, this system was found to be stable as a result of the steric stabilization provided by the bulky surface groups of PEG. This effect is also required and prevents or minimizes the occurrence of particle aggregation (CAPEK,

2002; FORGIARINI *et al.*, 2001). Thus, polymeric nanoparticles in aqueous solution can be stabilized by electrostatic and/or steric stabilizations using surfactants (CRUCHO & BARROS, 2017).

According to Shalaby *et al.* (2014), PLA-PEG nanoparticles developed from different molecular weights of PLA blocks showed zeta potential in the range of -1.9 to -30.2 mV and an increase of these values was observed when the polymer and drug ratio decreased. High values for this potential were also determined for poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing *Achyrocline satureioides* essential oil (-29.3 mV) (RITTER *et al.*, 2017). Similar results, -32.7 and -42.7 mV, have been demonstrated for PLA-PEG and poly- ϵ -caprolactone nanocapsules loaded with a sesquiterpene, respectively (DE MELLO *et al.*, 2016). Interestingly, BZ encapsulated in PEO (2000)-PLA (1400) systems showed a potential of 5.40 mV (RAMBO, BRITTA & NAKAMURA, 2015).

Determination of pH

The determination of pH is an important test to monitor the formulations stability, because changes in this parameter indicate the occurrence of chemical reactions that may compromise the quality of the final product. The PLA-PEG nanoparticles showed an average pH value of 3.6 (Table 2). It is known that in the case of systems formulated with vegetable oils, a decrease in pH may result from the hydrolysis of fatty acid esters, which generate free fatty acids (FRONZA, CAMPOS & TEIXEIRA, 2004). However, the control formulation and loaded with BZ also showed an acid pH, being a characteristic of the system. According to Ritter *et al.* (2017), *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in poly- ϵ -caprolactone nanoparticles showed a pH close to neutrality (pH 6.32).

Determination of encapsulation efficiency

Another key parameter during the development of polymeric nanoparticles incorporating drugs is the encapsulation efficiency. In the first step, the absorbance and fluorescence scanning analyses by spectrophotometric method demonstrated that the solvent and components of nanoparticle (PLA-PEG) did not promote any interference in the range of maximum wavelength for EO and BZ. Although, BZ can lead to the

improvement of EO concentrations by first analysis, its quantification by fluorescence would be more reliable than by absorbance. On the other hand, BZ chromatographic results are more precise than spectrophotometric values.

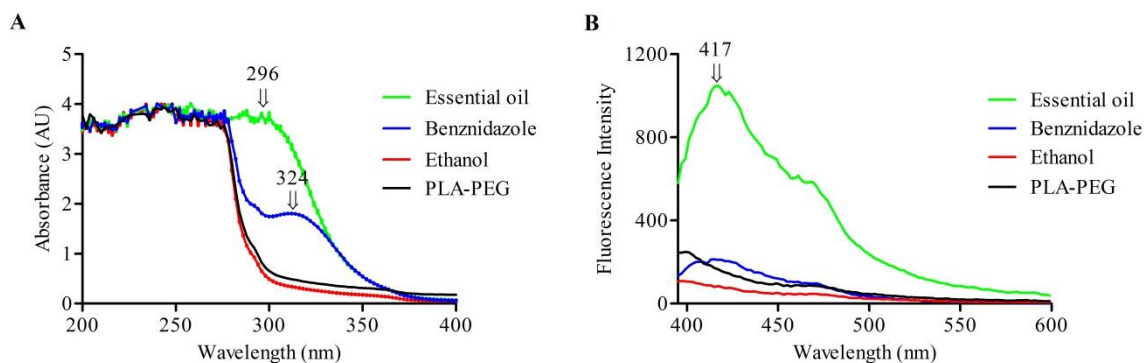


Figure 2: Absorbance (A) and fluorescence (B) spectrum in ethanolic solution by spectrophotometric method for different samples: essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves, benznidazole, ethanol and PLA-PEG nanoparticles without drug. The excitation wavelength was 350 nm for fluorescence analysis.

Entrapment efficiency of EO and BZ was determined and found to be in the range of 10.27 to 38.74% and of 31.61 to 41.77%, respectively (Table 3). This result was already expected since the BZ amount added was significantly lower than EO and an excess of this drug would be observed. Comparing the methods (same line), there was no significant difference between for the NP-BZ absorbance values and for the EO fluorescence values. However, EO absorbance by spectrophotometric method was significantly higher than chromatographic method. As previous described, an improvement of the EO concentration would be found in NP-EO+BZ analysis due to an interference promoted for the BZ. Interestingly, this profile was also observed for the nanoparticle loaded with only EO, but in a smaller proportion. All the other samples showed the same EE in both methods when different types of nanoparticle were compared (same column).

Table 3: Encapsulation efficiency of PLA-PEG (85:15) nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benzimidazole by spectrophotometric and chromatographic methods.

Nanostructured system	Encapsulation efficiency (%)					
	Spectrophotometry			Chromatography		
	Absorbance		Fluorescence	Absorbance		Fluorescence
	EO	BZ	EO	EO	BZ	EO
NP-EO	29.87 ±	-	14.52 ±	10.27 ±	-	15.49 ±
	1.61 ^{a,*}	-	2.73 ^{b,*}	1.23 ^{b,*}	-	1.68 ^{b,*}
NP-EO+BZ	38.74 ±	31.61 ±	11.79 ±	10.53 ±	41.77 ±	15.26 ±
	1.58 ^{a,#}	4.03 ^{a,*}	2.51 ^{b,*}	0.75 ^{b,*}	0.05 ^{b,*}	0.57 ^{b,*}
NP-BZ	-	35.25 ±	-	-	37.85 ±	-
	-	1.17 ^{a,*}	-	-	0.75 ^{a,*}	-

NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benzimidazole. Different letters mean $p < 0.05$ in each line and different symbols mean $p < 0.05$ in each column.

In summary, the BZ encapsulation efficiency rate was higher than EO rate and this difference may be explained by the physic-chemical properties of EO and/or the variations that occur in the method. Gas chromatography analysis is recommended to quantify volatile substances as EO. Moreover, the scape of hydrophobic drugs from de polymeric wall may occur at the moment of solvent evaporation, being a drug-loading efficiency about 60% demonstrated for this method (MOBARAK, SALAH & ELKHESHEN, 2014; BUDHIAN, SIEGEL & WINEY, 2007; KNOW *et al.*, 2001). Thus, this parameter depends of the interaction between polymer and drug.

Similar to our observations, PLA-PEG systems loaded with noscapine presented an EE range of 2.79 to 41.89% according to molecular weights of PLA blocks, being the polymer to drug ratio was the most influential factor for this parameter (SHALABY *et al.*, 2014). On the other hand, a great drug loading efficiency of 86% was observed for the poly-methylmethacrylate nanoparticle containing BZ (DOS SANTOS-SILVA *et al.*, 2017). Interestingly, poly- ϵ -caprolactone and PLA-PEG nanocapsules loaded with lychnopholide showed high yield, more than 95% was encapsulated for the first polymer and 100% for the second (BRANQUINHO *et al.*, 2014). Similar results for these structures were reproduced later by De Mello *et al.* (2016).

Determination of drug release profile

In vitro release studies were performed at pH 7.4 and acid pH solutions at 37 °C to simulate the physiological blood and gastric intestinal pH, since these particles were formulated to be administered intravenously or orally. According to the figure 3, it can be observed that EO released percentage was higher than BZ released percentage

independent of the receptor medium. When the drug release profile is analyzed according to this parameter, the intestinal solution favored the EO release, with a high drug released percentage after 3 hours. Although this result is not ideal for a controlled release, this property was sustained in the gastric solution that occurs previous to intestinal fluid. Thus, the oral via is suggested as the most appropriate for the EO loaded nanoparticles. It is known that the oral administration of polymeric nanosystems is more stable in the gastrointestinal tract than other structures as liposomes and lipid-based nanoparticles (PLAPIED *et al.*, 2011; BARRATT, 2003). This occurs because the polymeric wall protects the encapsulated drug, hence a longer exposure is conferred (ATTILI-QADRI *et al.*, 2013; MORGEN *et al.*, 2012).

On the other hand, the PLA-PEG nanoparticle property of controlling BZ release was better observed in pH close to neutral than acid pH, releasing 50% approximately. This value was significantly high and suggests that the parenteral via is the best option for this drug. This difference between the receptor solutions may be due to that part of BZ remained on the surface of the nanoparticles when acid pH was used. However, studies have demonstrated a BZ rapid release in the medium of similar gastric pH (SEREMETA *et al.*, 2019). It is known that BZ solubility is low (0.4 mg/mL) at pH 7 (SEREMETA *et al.*, 2019) and nonionic surfactants are better solubilizing agents than ionic surfactants in dilute solutions (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2007). Thus the nanoparticles development could be the main factor responsible for the BZ loaded nanoparticles exhibiting a great parasitological effect in further *in vivo* assays if administrated by intravenous via, since the time of body exposure to the drug could be longer. Thus, although EO and BZ showed distinct release characteristic, NP-EO+BZ is a great alternative because the drug would be released independent of the medium.

According to Dos Santos-Silva *et al.* (2017), BZ loaded polymethylmethacrylate nanoparticle assured the drug desired slow release for distinct diffusion kinetic linear models using buffer phosphate solution. However, in our study no drug amount was detected using only this solution, being need add Tween 80 in the receptor medium to maintain the sink conditions (Data no shown). This difference may be justified by use of the cationic polymer that ensured a slower BZ release.

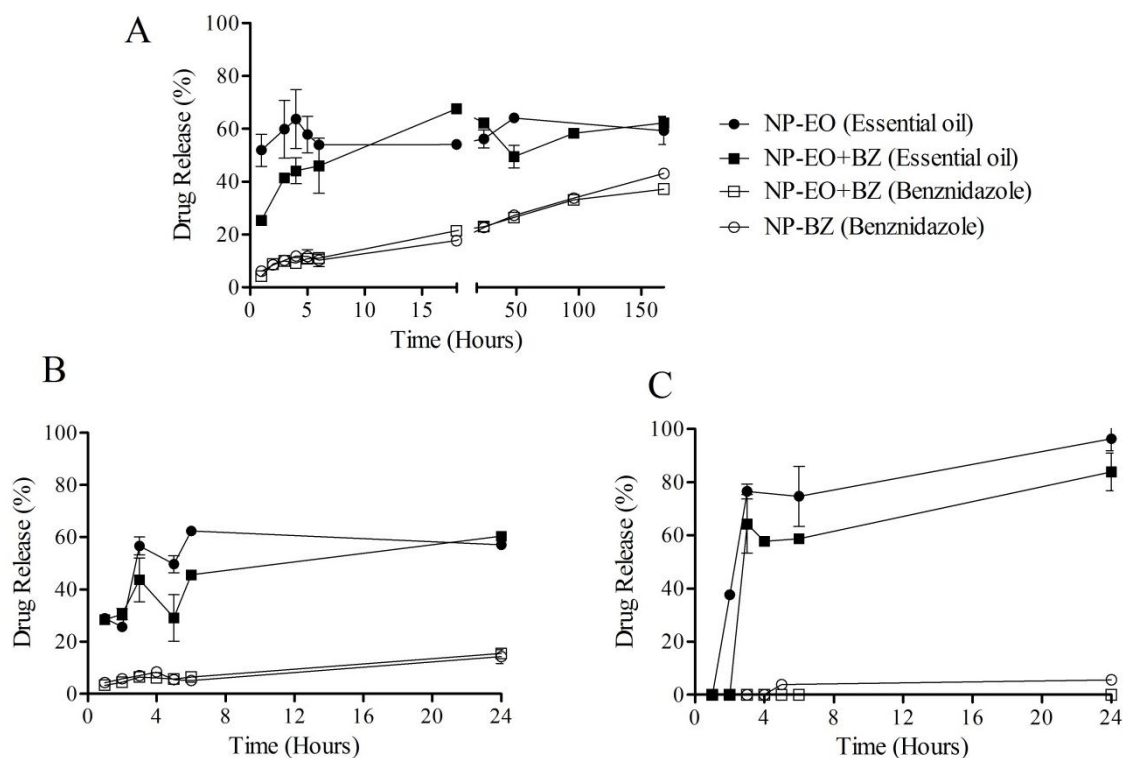


Figure 3: *In vitro* drug release profile of the essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole encapsulated in PLA-PEG (85:15) nanoparticles using three different receptor medium. A - Phosphate buffer solution (PBS) and 10% Tween 80 (pH 7.4); B – Fasted state simulated gastric fluid (FaSSGF) (pH 1.6) and C – Fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF) (pH 6.5); NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

TEM analysis

The morphology of PLA-PEG nanoparticles was analyzed by TEM and showed spherical shape and a narrow size distribution, as shown in figure 4. The small size obtained by TEM analysis correlated well with the size obtained using DLS method. The same profile had already been observed for other systems containing hydrophobic drugs and essential oils (RITTER *et al.*, 2017; SHALABY *et al.*, 2014). Images of PEO (2000)-PLA (1400) copolymer loaded with BZ also showed a spherical morphology (RAMBO, BRITTA & NAKAMURA, 2015).

In addition, EO loaded nanoparticles (NP-EO and NP-EO+BZ) revealed dark spots inside their structure. This fact could not be verified for control formulation and NP-BZ. This result occurred probably due a difference in light reflection and confirms that the EO has been encapsulated, corroborating with the preliminary results of the encapsulation efficiency.

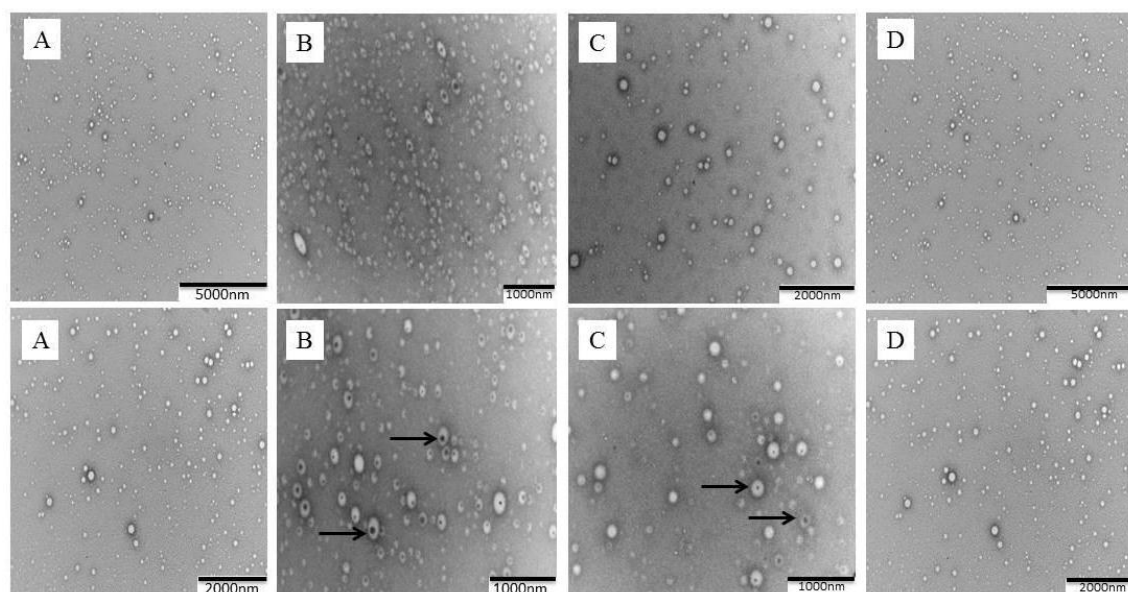


Figure 4: Morphology of PLA-PEG (85:15) nanoparticle determined by transmission electron microscopy (TEM). A – PLA-PEG (85:15) nanoparticle as negative control (NP-NC); B – PLA-PEG (85:15) nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves (NP-EO); C – PLA-PEG (85:15) nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole (NP-EO+BZ); D – PLA-PEG (85:15) nanoparticle loaded with benznidazole (NP-BZ). Black arrows show nanoparticulate essential oil.

Stability study

Differences in the particle size, PDI, zeta potential and pH of the polymeric system were explored in a physical stability assay after 28 days under room temperature storage. According to the figure 5, PLA-PEG nanoparticles clearly exhibited a stable behavior for all the evaluated period, since there was no significant difference for any of these previous parameters. This finding could probably be related with the absence or a very small influence of the Ostwald ripening (PINTO *et al.*, 2010). It is worth mentioning that Branquinho *et al.* (2014) described that PLA-PEG and poly- ϵ -caprolactone nanocapsules loaded with lychnopholide were stable for 6 months at 4 °C. Similar to our findings, BZ nanoparticles demonstrated excellent stability behavior at 5 °C for six weeks, since diameter of about 160 nm with zeta potential of 20 mV were remained (DOS SANTOS-SILVA *et al.*, 2017). Although colloidal nanoparticles are thermodynamically unstable, the polymeric surfactant PVA was able to induce the steric stabilization hence formulations were stable over a long period.

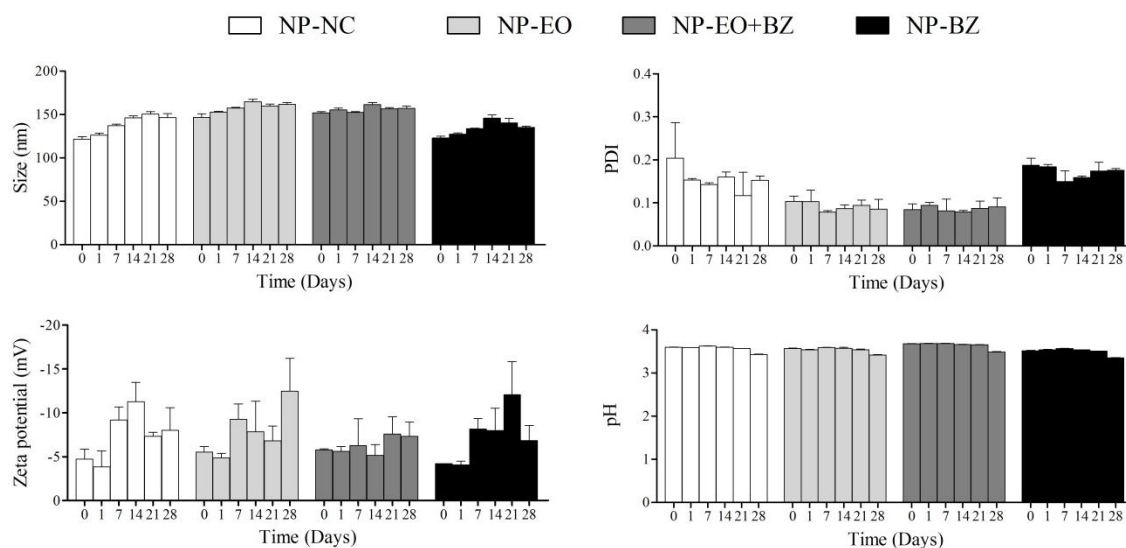


Figure 5: Average size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH of the PLA-PEG (85:15) nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole according to the analyzed period. NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Once evaluated the nanoparticle stability in solution form, some variations were applied to confirm the system stability. Thus, a concentrated system was obtained after centrifugation of initial system and resuspended in 1 mL of PVA (0.5%). PLA-PEG nanoparticles were also produced using only ultrapurified water without PVA. In addition, a freeze-drying process was performed after the standard nanoparticle development. All formulations were obtained without drug by same method to the control formulation. According to figure 6, no significant changes were observed in the size for standard NP-CN, nanoparticles without PVA and freeze dried, as well as the pH was sustained for all formulations. However, an increased size for concentrated NP-NC can occur due an insufficient dispersion of nanoparticles after centrifugation originating an aggregation process and it can be also confirmed by increased of PDI. Superior value found for population dispersion after 28 days suggests that the same phenomenon happened for freeze dried nanoparticles. Besides, only the formulation without surfactant demonstrated difference in the zeta potential, confirming that a stabilizer can prevent the agglomeration during the storage period. On the other hand, Musazzi *et al.* (2014) prepared stable nanoparticles without surfactant from a combination of PLGA and PCL-PEG copolymer.

For various methods, nanoparticles are produced in an aqueous suspension form, in which their chemical and physical stability is poor. A drying technique as freeze-

drying has been applied to obtain the corresponding powder, since that solid phase is more desirable than liquid phase due the slower reaction rates of physical and chemical interactions. However, during this process some changes on nanoparticle properties are produced and a cryoprotectant may be needed to preserve the system stability (ZHANG *et al.*, 2017; FONTE *et al.*, 2016). Some reports in the literature have reported an increased particle size after lyophilization (FONTE *et al.*, 2014; CHACÓN *et al.*, 1999). On the other hand, in the study carried out for Seremeta *et al.* (2019), this parameter was not modified by freeze-drying process which is in agreement with the present work. Crucho & Barros (2015) evaluated the influence of post-synthesis methods on nanoparticles mean size and concluded that evaporation under reduced-pressure could reduce the coalescence process since the smallest particle diameter was observed. Similar to our observations, an aggregation behavior after the centrifugation step was demonstrated for them. In other study, caking, coalescence and difficulties in redispersing nanoparticles were evidenced in this process (DALWADI, BENSON & CHEN, 2005). At the same time, this behavior is also attributed to lyophilization which confirms our results for both technics.

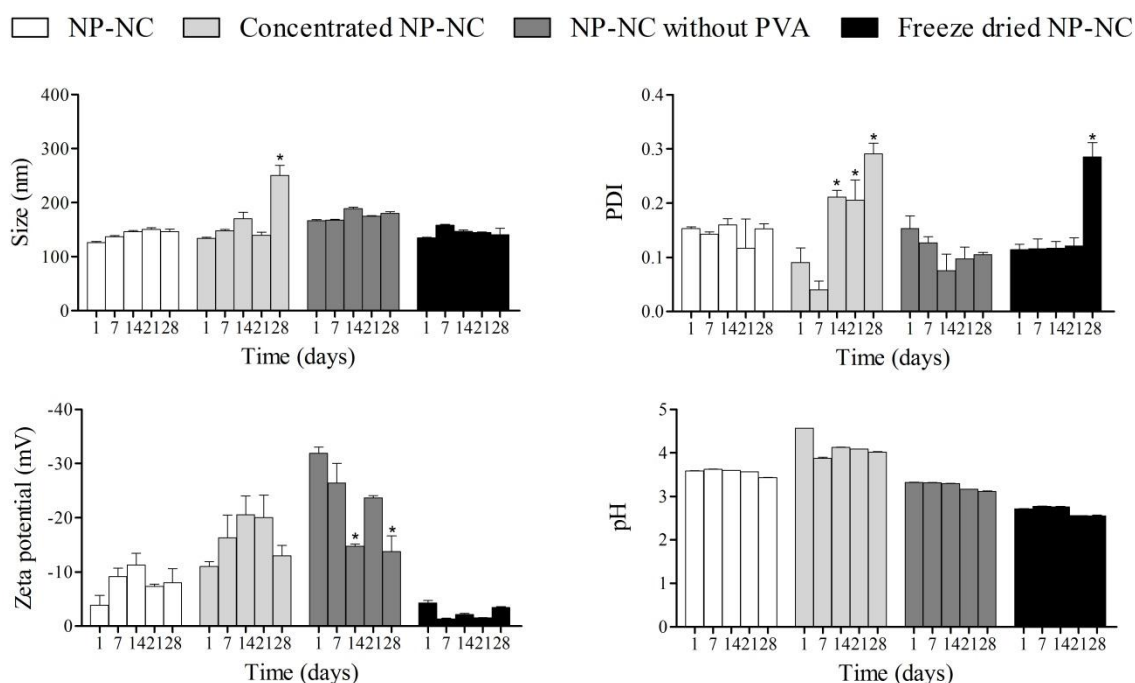


Figure 6: Average size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH of the negative control PLA-PEG (85:15) nanoparticle (NP-NC) after some modifications. Concentrated NP-NC – nanoparticle after centrifugation; NP-NC without PVA – nanoparticle obtained without stabilizer; Freeze-dried NP-NC – nanoparticle after freeze-drying.

Evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity

The results obtained from *in vitro* anti-*T. cruzi* test using infected fibroblasts treated with PLA-PEG nanoparticles showed that all loaded formulations were effective in reducing the parasite number in a dose-dependent manner. In addition, no effect was observed for negative control at concentrations analyzed. The previous trypanocidal activity evaluation of the free EO and BZ were carried out and IC₅₀ values of 60 and 1 µg/mL were obtained, respectively. On the other hand, an increase of the BZ activity was observed after its encapsulation, as shown in table 4. Although the same effect was not observed for the essential oil, the nanoparticles development still presents advantages, as protection against oil degradation, gradual and controlled release, and increased bioavailability.

Table 4: IC₅₀ determination of the *Trypanosoma cruzi* infected L929 cells and uninfected L929 cells after treatment with PLA-PEG (85:15) nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benzimidazole and selectivity index for the anti-*Trypanosoma cruzi* activity.

Nanostructured system	IC ₅₀ on parasite ¹ (µg/mL)			IC ₅₀ on L929 ² (µg/mL)			Selectivity index ³
	NS ⁴	EO ⁵	BZ ⁶	NS ⁴	EO ⁵	BZ ⁶	
NP-NC	Inactive	-	-	>6250	-	-	Inactive
NP-EO	27100	271	-	74700	747	-	2.8
NP-EO+BZ	8900	89	0.89	68600	686	6.86	7.7
NP-BZ	6000	-	0.60	50000	-	5.00	8.3
Free EO		60			230		3.8
Free BZ		1			625		625

¹Concentration which reduced 50% of the proliferation of parasite cells; ²Concentration cytotoxic for 50% of L929 cells; ³IC₅₀ of L929 cells/IC₅₀ of parasite cells; ⁴Nanostructured system concentration; ⁵Nanoparticulate essential oil concentration; ⁶Nanoparticulate benzimidazole concentration; NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benzimidazole.

Branquinho *et al.* (2014) developed PLA-PEG and poly-ε-caprolactone nanocapsules loaded with lychnopholide and evaluated their trypanocidal *in vivo* activity. According to the author these systems were able to increase the cure rates, decrease parasitemia and hence improve the infected animal survival. In addition, PLA-PEG showed an effect higher in the prepatent period than the other polymer, since that this system presents a long circulation in blood. This effect occurs due to its polymeric steric stabilization which reduces uptake by phagocytes of the mononuclear phagocyte system and the same condition is expected for our formulations in further *in vivo* assays (GONG *et al.*, 2012; NISHIYAMA & KATAOKA 2006). It is known that BZ has poor activity in the late chronic phase, thus these nanoparticles advantages may improve its

action. These previous results of nanoparticulate sesquiterpene lactone were obtained by intravenous administration and its oral use was also evaluated. In similar approach, the cure rates of the drug delivery systems were significantly higher than of free lychnopholide, which did not cure any animals (DE MELLO *et al.*, 2016).

In another report, Rambo, Britta & Nakamura (2015) developed PEO (2000)-PLA (1400) nanoparticles containing BZ and a small concentration (IC_{50} 1.2 $\mu\text{g/mL}$) was required to kill trypomastigote forms of *T. cruzi* compared to free substance (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/mL}$). However, lower values were demonstrated in our work. Other nanoparticles have also presented parasitic efficacy. Animals treated with *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in poly- ϵ -caprolactone nanoparticles showed lower parasitemia than control group (RITTER *et al.*, 2017). Moreover, the greatest trypanocidal activity was recorded for ethylcyanoacrylate nanocapsules with an IC_{50} twenty times less than free nifurtimox (SÁNCHEZ *et al.*, 2002).

Evaluation of cytotoxicity

A new drug candidate for treatment of Chagas disease must be effective, secure, and present low toxicity and absence of side effects. The negative control showed no cytotoxicity at concentrations tested and the LDH assay confirmed absence of toxicity until 500 mg/mL, assuring the secure use of this formulation's components (Figure 7). In addition, loaded PLA-PEG nanoparticles were more toxic to parasite than mammalian cells since IC_{50} values above 50 mg/mL were found for L929 cells (Table 4). The evaluation of the cytotoxicity activity of the free EO and BZ in the same conditions was already performed (IC_{50} 230 and 625 $\mu\text{g/mL}$, respectively). However, the formulation development reduced EO cytotoxicity when compared to free drug. Although low IS were reported, features such high physical stability and solubilization of lipophilic drugs make PLA-PEG nanoparticles a great drug-delivery system.

In this context, poly- ϵ -caprolactone and *Achyrocline satureioides* essential oil system was able to protect the liver tissue against the cytotoxic effect caused by the *T. evansi* by avoiding exacerbated production of reactive oxygen species (Ritter *et al.*, 2017). Moreover, no signs of toxicity or abnormal behavior were observed in mice treated with PLA-PEG and poly- ϵ -caprolactone nanocapsules loaded with lychnopholide (BRANQUINHO *et al.*, 2014). Similar to our results, BZ loaded

nanoparticles inhibited the normal kidney cell growth much more than the free drug (DOS SANTOS-SILVA *et al.*, 2017).

Evaluation of membrane permeability

LDH assay measures the lactate dehydrogenase activity in the extracellular medium (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). According to the figure 7, the nanoparticles presented a dose dependent cytotoxicity profile, in which the lower concentrations of the samples led to lower cell membrane damage. This assay demonstrated absence of toxicity until 500 mg/mL for control formulation, as well for NP-BZ (Figure 7-A). However, the EO loaded formulations showed lower cell viability from the concentration of 250 mg/mL. In addition, an increased cytotoxicity was observed for the NP-EO+BZ when compared with free BZ form, indicating that the EO would be the responsible for the cell death (Figure 7-C). On the other hand, polymeric nanoparticle was able to reduce the harmful effect of the free BZ, contradicting the previous method. Different profile was also observed for the EO loaded nanoparticle, since this system showed the same cytotoxicity of the free drug (Figure 7-B).

Although AlamarBlue and LDH assays evaluated the cytotoxicity on the same line cell, the results could not be compared due to different experimental conditions. This difference may be explained by the EO ability to damage the cell membrane, as shown previously. Thus, a higher cytotoxicity effect would be demonstrated by LDH assay, since the loss of intracellular LDH and its release into the extracellular medium indicate irreversible cell death due to the increased cell membrane permeability (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). However, this effect is not observed after treatment with BZ, justifying the decreased cytotoxicity. On the other hand, the AlamarBlue (oxidized, blue and nonfluorescent) is reduced to a pink fluorescent dye by mitochondrial enzymes (O'BRIEN *et al.*, 2000; DE FRIES & MISTUHASHI, 1995). According to the previous result, it is suggested that EO do not interfere in the mitochondrial activity, since no difference on the ROS levels was determined after treatment with this drug. Therefore, this result reinforces the reduction of the EO toxic effect revealed for this method.

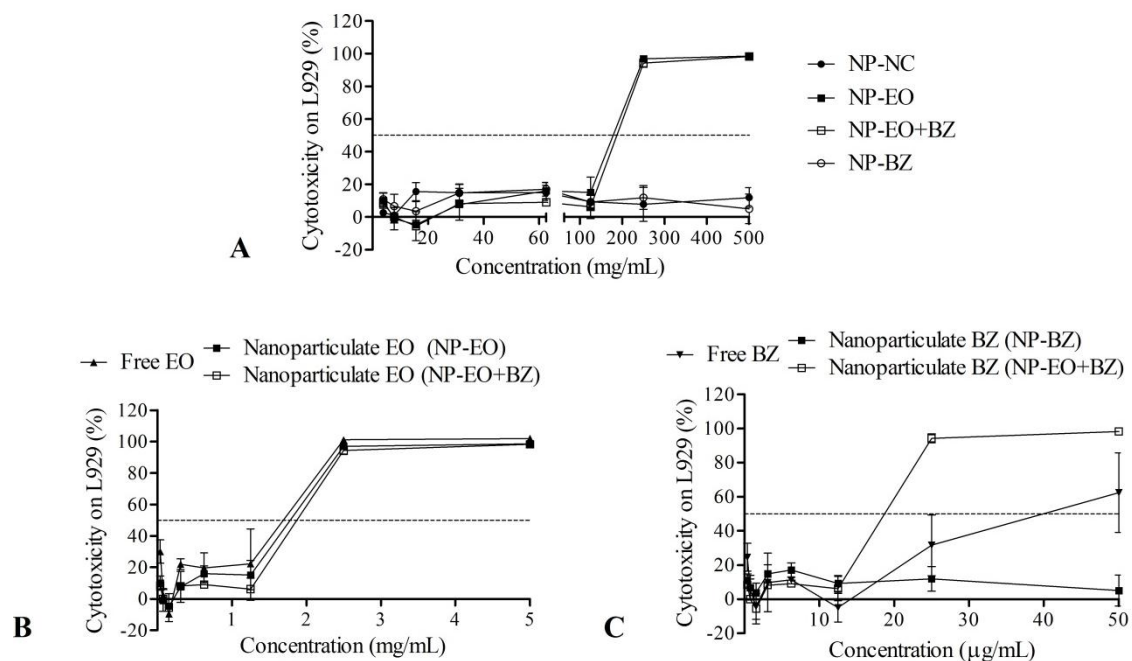


Figure 7: Cytotoxicity on L929 cells after treatment with PLA-PEG (85:15) nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole by LDH assay. NP – PLA-PEG (85:15) nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Various studies have demonstrated that different cytotoxicity tests can give different results depending on the assay employed (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; WEYERMANN, LOCHMANN & ZIMMER, 2005; ROMERO *et al.*, 2003). Taken together, both cytotoxicity assays clearly demonstrated that the PLA-PEG nanoparticles development reduced this effect when compared to free drugs. This result added with other nanostructured systems advantages as overcome the physical barriers presented by these assets, controlled release, as well as the possibility of reaching sites of action difficult due to their small size, make them a great alternative for the treatment of Chagas disease.

CONCLUSION

This work promoted the development of stable drug delivery systems with controlled drug release. The small and narrow droplet-size nanoparticles exhibited some advantages and promising features, such as an enhanced BZ trypanocidal activity. Although this effect was not observed to EO, the PLA-PEG nanoparticles reduced its cytotoxicity and others advantages as protection against oil degradation and long-

circulation property may be maintained. Thus, this study confirms that these systems are a new potential treatment for Chagas disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) – Finance Code 001 (Janaina Brandão Seibert – PDSE 88881.188759/2018-01). The authors thank all members of Boots Science Building of University of Nottingham.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

Nanoparticles from natural polymers, alginate and chitosan, as an alternative for the treatment of Chagas disease

ABSTRACT

Amphiphilic alginate and chitosan have been recently proposed to improve delivery of hydrophobic drugs and enhance their biological potential. Benznidazole is the choice drug to treatment of Chagas diseases, but its bioavailability is low and it presents intense side effects. Natural products have showed parasitic properties and beneficial characteristics that make them candidates for new drugs. The aim of this study was to investigate the susceptibility *in vitro* of *Trypanosoma cruzi* to the nanoparticles from natural polymers loaded with essential oil (EO) from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole (BZ). Alginate and chitosan nanoparticles were synthesized by ionic gelation of the polymers in the presence of a stabilizer. The systems were characterized for physical-chemical properties and a preliminary stability study was performed. The systems are stable dispersion of a few hundred nanometer droplets, low PDI and acid pH. Negative and positive zeta potential characterized alginate and chitosan structure, respectively. A uniform distribution was confirmed by MET analysis. In general, the BZ encapsulation efficiency was higher than that of EO for both systems. In addition, the BZ release was higher than EO release independently of the receptor medium and the polymer type. A dose-dependent reduction in the number of parasites for the both nanoparticles was observed. Besides, a synergic effect to EO+BZ was demonstrated. The results suggest that alginate and chitosan nanoparticles loaded with both drugs may be an alternative to the chemotherapeutic of Chagas disease.

Keywords: alginate, chitosan, natural polymer, nanoparticle, drug delivery system, *Cymbopogon densiflorus*, benznidazole, Chagas disease, anti-*Trypanosoma cruzi* activity, synergy.

INTRODUCTION

Chagas disease is a neglected tropical disease caused by the *Trypanosoma cruzi* (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Therapy for this tripanosomosis is based on

chemotherapy mainly with benznidazole (BZ). This antichagasic drug is currently available as an oral tablet pharmaceutical dosage form and its ability to reduce the acute and chronic infection is known (GASCON, BERN & PINAZO, 2010; URBINA, 2002). However, BZ is poorly hydrophilic, with limited ability to overcome biological barriers and requiring high-administered doses. This condition causes various side effects and leads to discontinuation of Chagas disease treatment (URBINA, 2009; CASTRO, MECCA & BARTEL, 2006; URBINA & DOCAMPO, 2003; URBINA 2002). In addition, parasite resistance reinforces the need to obtain new alternatives (MAUDLIN, HOLMES & MILES, 2004).

Different plant species have already showed antiparasitic potential (SCHMIDT *et al.*, 2012a,b). Thus, recent research has been directed to find natural products that have better pharmacological properties than synthetic chemicals. Essential oils (EO) are produced by the secondary metabolism of plants and are characterized by natural origin, low toxicity and action on various target molecules at the same time (RODRÍGUEZ-ROJO *et al.*, 2012; POTZERNHEIM *et al.*, 2006). These particularities make the essential oils good candidates for the development of new drugs.

Essential oil from *C. densiflorus* leaves comprises monoterpenes and sesquiterpenes, being *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol, and *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol the major compounds (SEIBERT *et al.*, 2018). This oil has been used in traditional medicine to treat diseases such as asthma, fever, abdominal pain, epilepsy (TAKAISI-KIKUNI, TSHILANDA & BABADY, 2000; SOENARKO, 1977) and biological studies have proved its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and parasitic properties (SEIBERT *et al.*, 2019; TAKAISI-KIKUNI, TSHILANDA & BABADY, 2000). On the other hand, essential oils are volatile and can decompose when exposed to air, light, heat, and moisture (RODRÍGUEZ-ROJO *et al.*, 2012; POTZERNHEIM *et al.*, 2006). These characteristics reduce their bioavailability and the formulations development that maintain the biological actions, as well as improve the solubility are required.

In fact, polymers have showed potential as a carrier system for the delivery of poor water-soluble drugs due to their enhancement of chemical stability of these substances (VOLPEDO *et al.*, 2019). Besides, these structures create a foundation for targeted delivery systems with improved blood circulation time (MORRIS *et al.*, 2010;

SUNDAR, KUNDU & KUNDU, 2010). Natural polymers as starch, cellulose, alginate, chitosan, and pectin are biodegradable, biocompatible, renewable and non-toxic (ABREU *et al.*, 2012; SENEL *et al.*, 2000).

In this context, alginate presents properties which allow forming gel, spheres, micro- and nanoparticles. This occurs because alginate (ALG) is a polyanionic linear biopolymer that can interact with cations, forming complexes. Thus, these ions act as crosslinking agent (LI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012; ZHANG & SALSAC, 2012). Studies have demonstrated its capacity to encapsulate lipophilic drugs as essential oils (DE OLIVEIRA, PAULA & DE PAULA, 2014; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; VARONA *et al.*, 2010; PAULA *et al.*, 2010). Chitosan (CHI) is also a natural polymer obtained by deacetylation of chitin, the main component of the exoskeleton of crustaceans (SAHOO *et al.*, 2010). Nanoparticles from this compound are used to control drugs release, improve their solubility and bioavailability (SINHA *et al.*, 2004; HEJAZI & AMIJI, 2003, PAULA *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2010a,b). In addition, it is largely described in the literature for its mucodhesive, absorption enhancement, peptidase inhibition and cell proliferation properties (BONFERONI *et al.*, 2017).

Previous studies have demonstrated strategies to enhance the BZ action such as cyclodextrins (DE MELO *et al.*, 2016; PRIOTTI *et al.*, 2015), solid dispersions (FONSECA-BERZAL *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2011), liposomes (MORILLA *et al.*, 2004 and 2002). On the other hand, few studies have evaluated the alginate and chitosan nanoparticles (FERRAZ *et al.*, 2018; VINUESA *et al.*, 2017; MORILLA *et al.*, 2002). In addition, micrometric particles are easily produced by the gelation of the polysaccharide polymer, but nanoparticles are rarely reported (MASALOVA *et al.*, 2013; AHMAD *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Thus, both natural polymers are a great alternative to overcome the physical disadvantage of these lipophilic drugs. In the present work three different Tween 80: Flower oil (T80:FO) ratios and concentrations were studied, as well as a crosslinking agent variation in order to obtain stable nanosystems. Alginate and chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *C. densiflorus* leaves and/or benzimidazole were characterized and their anti-*Trypanosoma cruzi* activity was assessed.

MATERIAL AND METHODS

Botanical material

Cymbopogon densiflorus leaves were collected in Ouro Preto – MG/Brazil (20°23'51"S, 43°30'40"W). A voucher specimen (OUPR 28122) was identified by Prof. Hildeberto Caldas de Sousa and deposited in Herbarium Prof. José Badini, Federal University of Ouro Preto – MG/Brazil. The access was registered at SisGen, the Brazilian National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge under number AC902F3. The essential oil extraction was performed by the hydrodistillation (Linax[®]) according Seibert *et al.* (2019).

Preparation of alginate nanoparticles

Alginate nanoparticles were synthesized by ionic gelation of the polymer according to Masalova *et al.* (2013). Sodium alginate (0.1%) (Alginic acid sodium salt from brown algae – Sigma Aldrich) was solubilized in acetic acid (0.1%) (Sigma Aldrich) under constant stirring overnight. In parallel, Tween 80 (Fluka BioChemika) was added to flower oil (T80: FO) at ratios of 2:1, 1:1 or 1:2, respectively, under constant stirring for 20 minutes. In the preliminary tests, CaCl₂ (2M) (Sigma Aldrich) cross-linking (0, 1 or 5%) was added to the alginate solution under stirring in ultrasonic homogenizer (Bandelin Sonopuls hd 2070) at force 90% for 1 minute. Then, three concentrations (1, 5 or 10%) of each organic phase (T80: FO) were added in the same previous conditions. Various quantities of Tween 80, oil and CaCl₂ were evaluated to obtain a stable product and the best system was selected to encapsulate the essential oil from *C. densiflorus* leaves and/or benzimidazole.

Table 1: Composition of preliminary alginate nanoparticles

Constituent	Alginate nanoparticles
Alginate (in Acetic acid 0.1%)	0.1% w/v
Tween 80:Flower oil ¹	1/5/10% v/v
CaCl ₂ (2M)	0/1/5% v/v

¹Tween 80: Flower oil in three different ratios (2:1; 1:1 and 1:2 v/v).

Preparation of chitosan nanoparticles

As previously described, chitosan nanoparticles were also synthesized by ionic gelation of the polymer according to Masalova *et al.* (2013). Chitosan (0.1%) (Chitosan

from crab shells highly viscous - Sigma Aldrich) was solubilized in acetic acid (0.3%) under constant stirring overnight. In parallel, Tween 80 was added to flower oil (T80: FO) at ratios of 2:1, 1:1 or 1:2, respectively, under constant stirring for 20 min. In the preliminary tests, three concentrations (1, 5 or 10%) of the each organic phase (T80: FO) were added to the chitosan solution under stirring in ultrasonic homogenizer at force 90% for 1 minute. Then, NaCl (6.5% w/v) (Sigma Aldrich) cross-linking (0, 1 or 5%) was added in the same previous conditions. Various quantities of Tween 80, oil and NaCl were evaluated to obtain a stable product and the best system was selected to encapsulate the essential oil from *C. densiflorus* leaves and/or benzimidazole.

Table 2: Composition of preliminary chitosan nanoparticles

Constituent	Chitosan nanoparticles
Chitosan (in Acetic acid 0.3%)	0.1% w/v
Tween 80:Flower oil ¹	1/5/10% v/v
NaCl (6.5%)	0/1/5% v/v

¹ Tween 80: Flower oil in three different ratios (2:1; 1:1 and 1:2 v/v).

Determination of particle mean size and polydispersity index

The particle mean size and the polydispersity index (PDI) of the nanoparticles were measured by photon correlation spectroscopy using Zetasizer (Zetasizer Nano series - Nano ZS, Malvern). Samples were diluted in distilled water and analyzed at 170° detection angle. PDI indicates the width of the size distribution ranging between 0 and 1, being a monodisperse or polydisperse system, respectively. The median and standard deviation analysis was performed in triplicate (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of Zeta potential

The zeta potential of the nanoparticles was determined by electrophoretic mobility measurements of suspended particles using Zetasizer (Zetasizer Nano series - Nano ZS, Malvern). The samples were diluted in distilled water and inserted into a capillary cell. The measurements were performed in triplicate and the results were expressed in millivolts (mV) (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of pH

The potential of hydrogen (pH) of the nanoparticles was measured directly in the suspensions using a potentiometer (Fisherbrand Hydrus 600) previously calibrated with

buffer solutions pH 4.0 and 7.0. The pH values were determined by the average of three replicates at 25 °C (SEIBERT *et al.*, 2019).

Determination of encapsulation efficiency

After preparation, the nanoparticles were filtered using an acetate membrane (0.22 µm) to remove the excess of non-encapsulated drug and freeze-dried (GVD3 Freeze Dryer Girovac) (SEREMETA *et al.*, 2019). Samples were suspended in ethanol or acetonitrile according to the used method. Encapsulation efficiency (EE) analyses were assayed by means of spectrophotometric (S) (TECAN SPARK 10 M) and chromatographic (C) (HPLC Shimadzu) methods at 296 and 324 nm wavelengths to EO and BZ, respectively. Calibration curves were performed (EO-S: $y = 0.0002x - 0.021$; $R^2 = 0.9988$; EO-C: $y = 30.067x + 1878$; $R^2 = 0.9986$ and BZ-S: $y = 3.4275x - 1952.2$; $R^2 = 0.9924$; BZ-C: $y = 1.2936x + 3725.5$; $R^2 = 0.9576$). Essential oil was also quantified by fluorescence from both methods at 350 nm excitation wavelength and 417 nm emission wavelength (EO-S: $y = 3.4275x - 1952.2$; $R^2 = 0.9924$; EO-C: $y = 1.2936x + 3725.5$; $R^2 = 0.9576$). The HPLC analysis was carried out according the following conditions: mobile phase: A – ultrapure water and C – acetonitrile (ACN); isocratic elution (0-1.0 min: 20% ACN; 1.0-15.0 min: 20 to 70% ACN; 15.0-17.0 min: 70% ACN; 17.0-18.0 min: 70 to 20% ACN; 18.0-25.0 min: 20% ACN); run time: 25.0 min; flow: 1.0 mL/min; column temperature: 30 °C; samples temperature: 19,5 °C; column: C18 (250 x 4.6 mm, 5µm – Phenomenex®); injection volume: 20 µL and wavelengths: 296 and 324 nm (PERIN *et al.*, 2017). The EE percentage was calculated in triplicate using the following equation:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{amount of drug quantified in nanoparticle}}{\text{amount of drug in the system}} \times 100$$

Determination of drug release profile

The *in vitro* drug release study was performed using dialysis membrane (SnakeSkin™ Dialysis Tubing). Nanoparticles were added in the donor compartment and it was placed in contact with the receptor medium under stirring at 37 °C (Fisher Scientific). Three different receptor solutions were used: A - phosphate buffer solution (PBS) and 10% Tween 80 (pH 7.4); B – fasted state simulated gastric fluid (FaSSGF)

(pH 1.6) and C – fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF) (pH 6.5) (JANTRATID *et al.*, 2008). At specific intervals (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 24, 48, 96 and 168 hours for A solution and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours for B and C solutions), aliquots were removed from receptor medium and the same volume of a freshly solutions was replaced to maintain the sink conditions. The samples were freeze-dried (GVD3 Freeze Dryer Girovac) and suspended in acetonitrile. Percentages of EO and BZ released were determined by chromatographic method at 296 and 324 nm, respectively, according previous conditions.

Transmission electron microscopy analysis

The surface morphology of nanoparticles and size distribution were observed using a transmission electron microscope (JEOL 2100F FEG-TEM) operated at 200 kV. Samples were diluted in ultrapure water and deposited on a copper mesh grid. The excess of fluid then was removed with filter paper and the samples were left to dry to be observed (BARRADAS *et al.*, 2017).

Stability study

The measurements of particle mean size, PDI, zeta potential and pH were conducted for all samples immediately after processing and again at intervals of 1, 7, 14, 21 and 28 days to stability study on samples maintained at room temperature.

Evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity

In vitro test of trypanocidal activity adopting β -galactosidase-transfected Tulahuen *T. cruzi* strain was performed as previously describe by Romanha *et al.* (2010). Briefly, infective trypomastigote forms were obtained through culture in monolayers of mouse L929 fibroblasts in RPMI-1640 medium without phenol red (Gibco BRL), containing 10% fetal bovine serum and 2mM glutamine. For the bioassay, 4,000 L929 cells were added to each well of a 96-well microplate. After an overnight incubation at 37°C and 5% CO₂, 40,000 trypomastigotes were added to the cells and the plate was incubated for 48 hours. The medium was then replaced with solutions of loaded nanoparticles between 50 and 0.78 mg/mL in fresh medium and the plate was incubated for 96 hours. After this period, chlorophenol red glycoside in 0.5%

Nonidet P40 was added and the plate incubated for 18 hours, after which the absorbance at 570 nm was measured. A negative control with uninfected cells (100% cure) and infected cells without treatment (0% cure) were used as comparative parameters. In addition, infected cells treated with free EO and BZ, as well as formulation negative control were used in parallel. The results were performed in triplicate and expressed as the percentage of *T. cruzi* growth inhibition.

In addition, for formulations containing essential oil and benznidazole (ALG-EO+BZ and CHI-EO+BZ), the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated from the sum of the fractional inhibitory concentration (FIC) of each drug in order to determine if there is a synergistic effect (<1), indifferent (≥ 1 and ≤ 2) or antagonist (> 2) according to the following equation (FRATINI *et al.*, 2017):

$$FICI = FIC (EO) + FIC (BZ)$$

$$FICI = \frac{IC50_{EO+BZ}}{IC50_{EO}} + \frac{IC50_{EO+BZ}}{IC50_{BZ}}$$

Evaluation of cytotoxicity

In vitro cytotoxicity test using AlamarBlue™ assay was performed as previously describe by Romanha *et al.* (2010). Briefly, 4,000 mouse L929 fibroblasts in the same previous RPMI-1640 medium were added to each well of a 96-well microplate and incubated for three days at 37 °C and 5% CO₂. The medium was then replaced with solutions of loaded nanoparticles between 50 and 0.78 mg/mL in fresh medium and the plate was incubated for four days. After this period, AlamarBlue™ was added and the plate was incubated for 4-6 hours, after which the absorbance at 570 and 600 nm was measured. The same controls in the previous test were used. The results were expressed as the percent difference in the reduction between treated (TC) and untreated cells (UT), using the following equation:

$$Cytotoxicity (\%) = \frac{(117,216)(Abs_{570} TC) - (80,586)(Abs_{600} TC)}{(117,216)(Abs_{570} UT) - (80,586)(Abs_{600} UT)} \times 100$$

Statistical analysis

The results are presented as mean and standard error and were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) followed by comparison with the Bonferroni test using Graph Pad Prism 5.0 software. The significance level was $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of alginate nanoparticles

Preliminary experiments focused on the improvement of biopolymeric nanoparticles were performed by using different Tween 80: Flower oil (T80:FO) ratios and concentrations, as well as a crosslinking agent variation. Concentrations of the alginate higher than 0.5% are not practical because viscosity of the solution becomes too high (Data no shown). In addition, the order of crosslinking agent addition on alginate solution interfered in the particle size. Interestingly, when CaCl_2 solution was added as the first compound into the polymer smaller nanocapsules were obtained compared to those obtained with T80:FO added before the crosslinking compound (Data no shown). Similar results were described for Letsutthiwong & Rojsitthisak (2011) when chitosan was used as stabilizer. This phenomenon could be explained because alginate solution interacts with calcium ions at oligopolyguluronic sequences, forming a compact “egg-box” structure. Then, addition of stabilizer after this first process would stabilize the system and small nanocapsules are obtained (SARMENTO *et al.*, 2006).

According to the figure 1, it was possible to observe that the crosslinking agent is important for the stable systems production, since the nanoparticles without CaCl_2 presented the highest values of PDI or were unstable after 24 hours. Studies have shown calcium cations as a great gelating agent due to the formation of small particles, as well as their biocompatibility with alginate and non-toxicity (RACOVITA *et al.*, 2009; OPANASOPIT *et al.*, 2008).

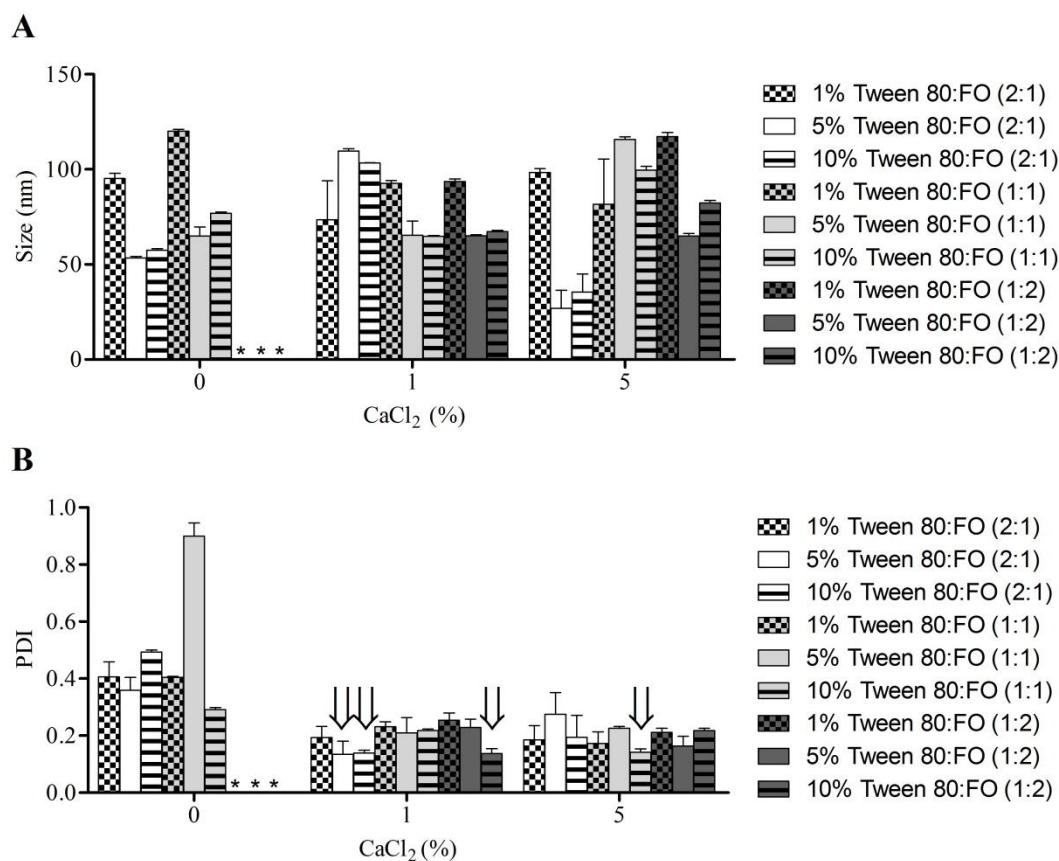


Figure 1: Particle size (A) and size distribution (B) of alginate nanoparticles obtained from different ratios of Tween 80:Flower oil (FO) and CaCl₂ cross-linking. * Unstable formulations after 24 hours. Black arrows show the selected formulations.

In addition, the samples containing 1% CaCl₂ and 5 or 10% T80: FO (2:1) and 10% T80: FO (1:2), as well as the addition of 5% CaCl₂ and 10% T80: FO (1:1) presented the lowest values for PDI, indicating the stable formulation production. Thus, these nanoparticles were selected and developed again from the change of flower oil by essential oil (EO) from *C. densiflorus* leaves in the same concentrations in order to confirm the maintenance of these results. In a previous study, Hosseini *et al.* (2013b) observed an increased particle size and size distribution as a function of initial essential oil content in alginate systems.

Similar approach was evaluated by Masalova *et al.* (2013) and revealed alginate colloids in water of 210 to 540 nm. However, these values were reduced when the drying process was applied (below to 240 nm), suggesting that these structures collapsed. According to the author, this parameter was affected by the presence of a stabilizer besides the ageing in the water. Considering the stabilizer type, Tween 80 was able to produce particles smaller than those produced by PEG 15000. This occurs due

the contraction of the neighboring hydrophobic tails hence a decreased swelling of nanoparticles in water is observed. Thus, Tween 80 is adsorbed on the surface of alginate system, forming a shell like micelle.

The nanostructured system developed from 5% CaCl₂ and 10% T80:EO (1:1) revealed the best results for the parameters analyzed, as shown in figure 2. De Oliveira, Paula & De Paula (2014) developed alginate-cashew gum nanoparticles in order to encapsulate essential oil using different ratios for this polymer mixture and oil phase. In accordance with our finding, the best result found for them was blend:oil ratio of 10:1.

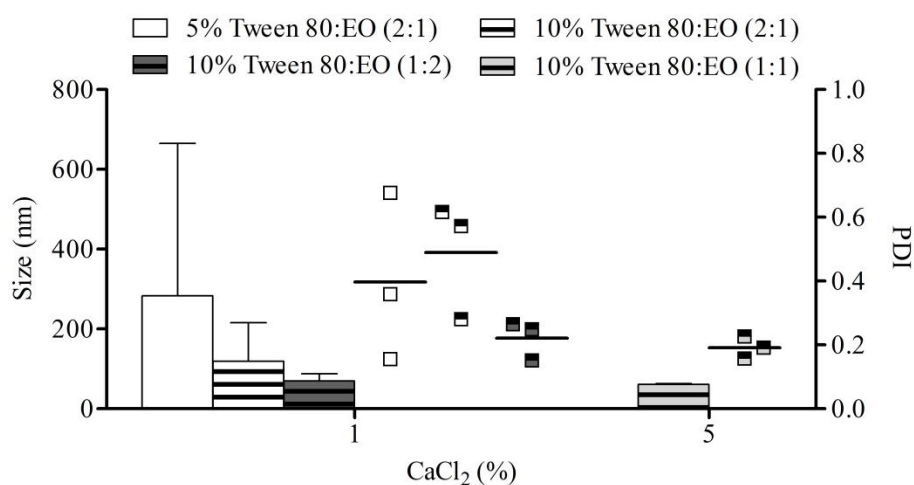


Figure 2: Particle size (Bars) and size distribution (Squares) of alginate nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves.

Then, 100 µg/mL of BZ was added in the selected oil phase to obtain the ALG-EO+BZ nanoparticles. Similarly, the ALG-BZ was obtained but replacing EO for FO. Finally, the control formulation was developed from FO without drug as described to preliminary systems. Thus, the final composition of the alginate nanoparticles is described in the table 3 and they were employed throughout this work.

Table 3: Composition of alginate nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole.

Constituent	Alginate nanoparticle			
	ALG-NC	ALG-EO	ALG-EO+BZ	ALG-BZ
Alginate (in Acetic acid 0.1%)	0.1% w/v	0.1% w/v	0.1% w/v	0.1% w/v
Tween 80:Oil (1:1)	10% v/v ¹	10% v/v ²	10% v/v ²	10% v/v ¹
Benznidazole	-	-	0.01% w/v	0.01% w/v
CaCl ₂ (2M)	5% v/v	5% v/v	5% v/v	5% v/v

¹Tween 80: Flower oil; ²Tween 80: Essential oil; ALG – Alginate nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Preparation of chitosan nanoparticles

Similarly to the previous system, chitosan concentrations higher than 0.5% did not allow the nanoparticle development due to highly viscous system (Data no shown). The preliminaries chitosan nanoparticles were characterized by mean particle diameter and polydispersity index. In addition, the order of crosslinking agent addition on chitosan solution was also evaluated. However, the opposite of the alginate profile was observed for chitosan nanoparticles. Thus, when NaCl solution was added as the first compound into the polymer, bigger nanocapsules were obtained compared to those obtained with T80:FO added before the crosslinking compound (Data no shown).

As shown in the figure 3, the crosslinking agent was also important for the stable systems production, since the nanoparticles without NaCl presented the highest values of PDI, corroborating with the alginate formulations. In addition, higher oil amount in the T80:FO ratio led to the instability of the system. According to Zhao *et al.* (2010), an increasing Tween 80 concentration reduced the particle size. In similar approach, Masalova *et al.* (2013) developed chitosan nanoparticles with size between 180 and 260 nm. This difference depended on polymer concentration, its molecular weight, and stabilizer type. However, lower values were demonstrated in our work. In this context, samples containing 1 or 5% NaCl and 5 or 10% T80:FO (2:1), as well as 5% NaCl and 10% T80:FO (1:1) presented the lowest values for PDI, indicating the stable formulation production. Following the previous method, these nanoparticles were selected and developed again from the change of flower oil by essential oil (EO) from *C. densiflorus* leaves in the same concentrations.

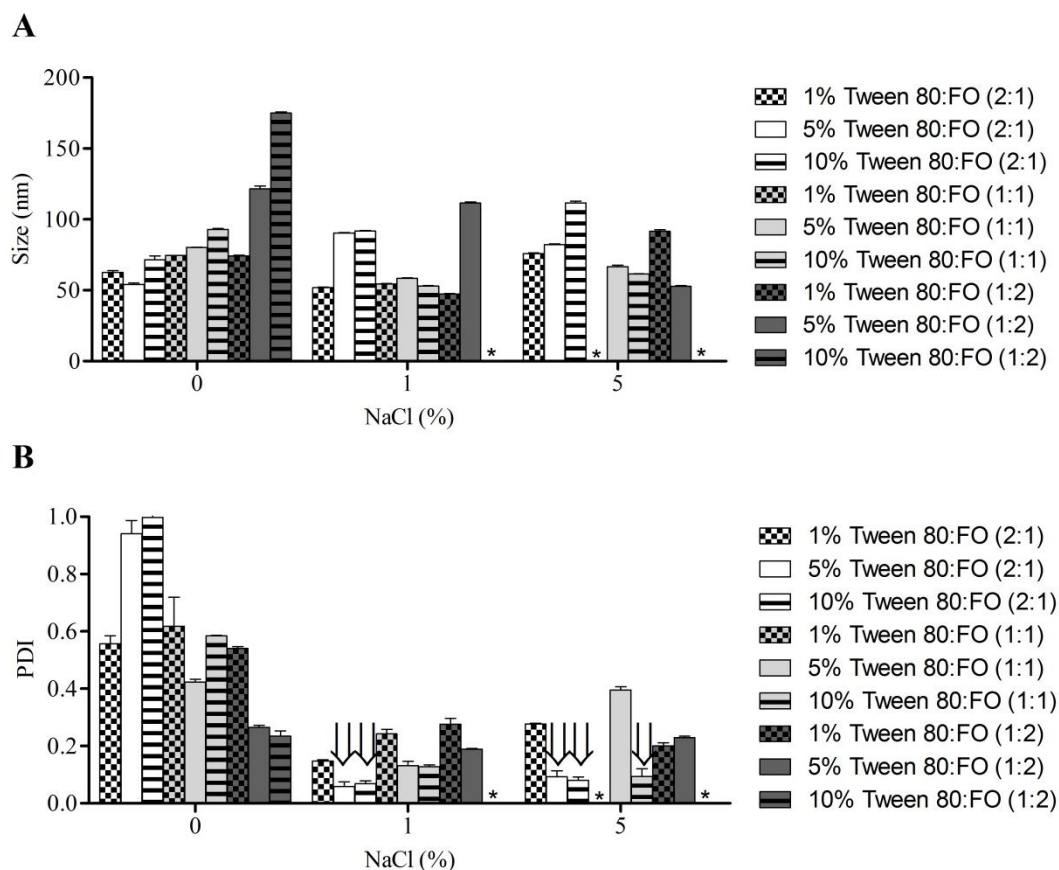


Figure 3: Particle size (A) and size distribution (B) of chitosan nanoparticles obtained from different ratios of Tween 80:Flower oil (FO) and NaCl cross-linking. * Unstable formulations after 24 hours. Black arrows show the selected formulations.

The nanostructured system developed from 5% NaCl and 10% of the Tween 80:OE (1:1), revealed the best numbers for the parameters analyzed, as shown in the figure 4. Interestingly, this result represent the same amount of the crosslinking and T80:FO demonstrated for the alginate nanoparticles. According to Letsutthiwong & Rojsitthisak (2011), SEM images of chitosan-alginate nanocapsules suggest that an ideal Tween 80 amount is required to produce a small particle size.

Then, this system was selected for developing CHI-EO+BZ and CHI-BZ nanoparticles and the control formulation (CHI-CN). These nanoparticles were obtained in the same conditions as the alginate formulations, since the same system (5% crosslinking agent and 10% T80:EO 1:1) showed the best results for both formulations. Thus, the final composition of the chitosan nanoparticles is described in the table 4 and they were employed throughout this work.

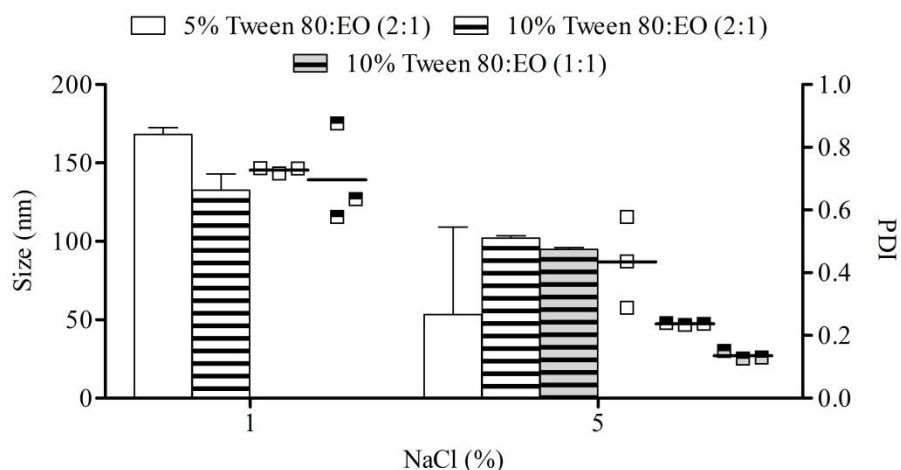


Figure 4: Particle size (Bars) and size distribution (Squares) of chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves.

Table 4: Composition of chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole.

Constituent	Chitosan nanoparticle			
	CHI-NC	CHI-EO	CHI-EO+BZ	CHI-BZ
Chitosan (in Acetic acid 0.3%)	0.1% w/v	0.1% w/v	0.1% w/v	0.1% w/v
Tween 80:Oil (1:1)	10% v/v ¹	10% v/v ²	10% v/v ²	10% v/v ¹
Benznidazole	-	-	0.01% w/v	0.01% w/v
NaCl (6.5%)	5% v/v	5% v/v	5% v/v	5% v/v

¹Tween 80: Flower oil; ²Tween 80: Essential oil; CHI – Chitosan nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Determination of particle mean size and polydispersity index

The alginate and chitosan nanoparticles, previously selected, showed particle mean size lower than 110 and 70 nm, respectively (Table 5). Interestingly, the mean diameter was reduced after drug encapsulation in alginate system. However, the opposite profile was observed for loaded chitosan formulations. PDI indicates the width of the size distribution ranging between 0 and 1, being values less than 0.3 characteristic of the uniform system (GÜNDEL *et al.*, 2018). Thus, both structures were characterized as monodisperse. The therapeutic success in the treatment of any disease depends on the effective drug uptake and nanostructured systems have shown an increased drug efficacy and a reduced side effect. In this context, these results are appropriate since the low particle size increases the surface area, favoring drug delivery (DOS SANTOS-SILVA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2009).

DLS data showed that alginate-cashew gum nanoparticles containing *Lippia sidoides* essential oil presented diameters between 223 and 399 nm, being much bigger than those observed in our work (DE OLIVEIRA, PAULA & DE PAULA, 2014). In

similar approach, analysis of *Eucalyptus citriodora* essential oil in chitosan system demonstrated a mean size of 232 nm with polydisperse distribution (RIBEIRO *et al.*, 2014). In this case, this difference can be justified due to the high concentrations of encapsulated oil (36%) when compared with our work (5%).

Table 5: Average size, polydispersity index, zeta potential and pH of the alginate and chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benzimidazole.

Nanostructured system	Characterization			
	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH
ALG-NC	103.30 ± 0.80	0.076 ± 0.01	-4.50 ± 1.36	3.49 ± 0.01
ALG-EO	59.17 ± 0.86	0.192 ± 0.01	-2.68 ± 0.18	3.57 ± 0.01
ALG-EO+BZ	77.53 ± 0.88	0.161 ± 0.01	-4.01 ± 1.28	3.46 ± 0.01
ALG-BZ	62.34 ± 0.72	0.209 ± 0.01	-3.66 ± 0.50	3.51 ± 0.01
CHI-NC	45.30 ± 0.57	0.234 ± 0.00	2.65 ± 0.65	3.82 ± 0.01
CHI-OE	56.78 ± 0.31	0.178 ± 0.01	4.12 ± 2.55	3.80 ± 0.00
CHI-EO+BZ	59.77 ± 0.96	0.152 ± 0.01	6.95 ± 2.46	3.79 ± 0.01
CHI-BZ	69.45 ± 0.76	0.264 ± 0.00	1.40 ± 0.14	3.80 ± 0.01

PDI – Polydispersity index; ALG – Alginate nanoparticle; CHI – Chitosan nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benzimidazole.

Determination of zeta potential

The zeta potential parameter allows the assessment of the stability of nanoparticles since particles that exhibit high superficial charge will repel and prevent instability processes. In general, the border between stable and unstable suspensions is considered for a zeta potential value greater than |30| mV (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2015). According to table 5, alginate and chitosan formulations showed negative and positive superficial charge, respectively. This occurs because the first polymer is a polyanionic compound while chitosan has a cationic nature. However, the values were lower than established.

Zeta potentials of alginate-cashew gum nanoparticles loaded with essential oil varied from -30.0 to -36.2 mV. These superior values relate with the carboxylated sites present in both polymers (DE OLIVEIRA, PAULA & DE PAULA, 2014). Similarly, quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles showed values about -40.5 mV (MANUJA *et al.*, 2014).

According to Woranuch & Yoksan (2013), the positive charge at the chitosan nanoparticle decreased (+37.7 and +31.91 mV) with increasing eugenol content (+16.2 and +16.5 mV), suggesting an effect of charge shielding by migrated and coated terpene. This same profile has been found for others authors (KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011; WU *et al.*, 2005). However, an increase in this parameter was

described for EO loaded chitosan and this difference might be related to the crosslinking agent used. In addition, Abreu *et al.* (2012) demonstrated that the oil content did not influenced the zeta potential, but this value drastically reduced when the cashew gum:chitosan ratio increased. Data suggests that the chitosan amount contributes more effectively to nanoparticle stabilization and the higher is its concentration the greater would be its zeta potential.

Despite the low potential found in our work, colloidal system also has a steric stabilization which helps to prevent instability processes (CAPEK, 2002; FORGIARINI *et al.*, 2001). In addition, chitosan has a positive charge which favorable electrostatic interaction with the negatively charged phospholipids in the biological membranes. This condition allows a higher cellular uptake in the adsorptive-mediated endocytosis (CHENG *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2007). This is also a key factor influencing nanoparticles *in vivo* use, for example in interactions with cell membranes (CRUCHO & BARROS, 2017). Studies have shown that the cationic nanoparticles have the cellular uptake enhanced by macrophages

Determination of pH

The determination of pH is an important test for monitoring the formulations stability, because changes in this parameter indicate the occurrence of chemical reactions that may compromise the quality of the final product. The alginate and chitosan nanoparticles showed pH values of 3.5 and 3.8, respectively. In the case of systems formulated with vegetable oils, a decrease in pH may result from the hydrolysis of fatty acid esters, which generate free fatty acids (FRONZA, CAMPOS & TEIXEIRA, 2004).

Determination of encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency studies were performed to observe differences in the drug amount as a function of the method. A higher uniformity in this parameter was showed for the spectrophotometry method than chromatography method when EO entrapment in alginate nanoparticle was evaluated (Table 6). This result could be improved if a gas chromatography was used, since EO are composed for volatile substances. On the other hand, opposite profile was determined for chitosan system.

Moreover, close values were found for BZ loaded formulations using chromatography assay.

Although this difference, statically increased values in this analysis were observed when BZ was encapsulated alone for both polymers and independently of the method. However, the same EO amount was shown for its encapsulation alone and combined, suggesting that it is the responsible for polymer saturation. In addition, BZ encapsulation efficiency was higher than EO independently of the method. Similar results have been previously reported for Masalova *et al.* (2013) that drug encapsulation efficiency in alginate polymer significantly varied according to its concentration. In this case, a high drug amount (99%) was encapsulated when its concentration was of 0.25 mg/mL. However, this value was reduced to 15% in the increase concentration to 1.0 mg/mL. The same profile was demonstrated for chitosan polymer. This fact would explain the difference found to EO and BZ about this parameter in our work, since that was used 50 mg/mL for the first drug and 0.1 mg/mL for the second.

Table 6: Encapsulation efficiency of alginate and chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benzimidazole by spectrophotometric and chromatographic methods.

Nanostructured system	Encapsulation efficiency (%)					
	Spectrophotometry			Chromatography		
	Absorbance		Fluorescence	Absorbance		Fluorescence
	EO	BZ	EO	EO	BZ	EO
ALG-EO	29.90 ±	-	26.20 ±	9.03 ±	-	28.99 ±
	0.31 ^{a,*}	-	0.48 ^{a,*}	0.06 ^{b,*}	-	5.04 ^{a,*}
ALG-EO+BZ	30.49 ±	31.09 ±	25.97 ±	8.77 ±	41.93 ±	48.51 ±
	0.14 ^{a,*}	0.20 ^{a,*}	2.51 ^{a,*}	0.04 ^{b,*}	4.53 ^{b,*}	2.51 ^{c,#}
ALG-BZ	-	67.52 ±	-	-	50.22 ±	-
	-	3.08 ^{a,#}	-	-	2.20 ^{b,#}	-
CHI-EO	30.90 ±	-	24.10 ±	24.17 ±	-	20.60 ±
	0.05 ^{a,*}	-	0.75 ^{b,*}	0.18 ^{b,*}	-	0.64 ^{b,*}
CHI-EO+BZ	31.24 ±	29.21 ±	25.84 ±	20.07 ±	57.86 ±	19.79 ±
	0.20 ^{a,*}	7.82 ^{a,*}	2.51 ^{b,*}	0.05 ^{c,*}	0.04 ^{b,*}	2.51 ^{c,*}
CHI-BZ	-	78.18 ±	-	-	79.92 ±	-
	-	10.78 ^{a,#}	-	-	1.44 ^{a,#}	-

ALG – Alginate nanoparticle; CHI – Chitosan nanoparticle; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benzimidazole. Different letters mean $p < 0.05$ in each line and different symbols mean $p < 0.05$ in each column for each polymer.

Similarly, this parameter ranged from 52.40 to 66.37%, decreasing as the *Satureja hortensis* essential oil content increased in the alginate microparticles development (HOSSEINI *et al.*, 2013b). In a previous report, the encapsulation efficiency ranges from 21 to 48% were also found for alginate-cashew gum nanoparticles loaded with essential oil by spectrophotometry method (DE OLIVEIRA,

PAULA & DE PAULA, 2014). This finding indicates that a saturation capacity of the polymer to encapsulate EO may happen for high concentrations of this drug and it is also related with the increased encapsulation efficiency when BZ is encapsulated without the EO. The same profile was also demonstrated for chitosan systems containing oregano essential oil, being observed an increase from 5.45 to 24.72% when the oil content reduced from 0.8 to 0.1 g/g chitosan (HOSSEINI *et al.*, 2013a). On the other hand, superior values (96.48%) were determined for quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles (MANUJA *et al.*, 2014).

Determination of drug release profile

A controlled drug release profile was demonstrated for both polymer independently of the receptor medium, as shown in the figure 5. Interestingly, BZ release was higher than EO release for all experimental conditions. This result is opposite to those demonstrated for loaded PLA-PEG nanoparticles that favored the EO release. In addition, similar drug percentage was released for the three solutions. *In vitro* release studies were performed at pH 7.4 and acid pH solutions at 37 °C to simulate the physiological blood and gastric intestinal pH. Thus, these results suggesting that both nanoparticles could be administered intravenously or orally.

In previous report, a BZ rapid release was observed in the medium of similar gastric pH (SEREMETA *et al.*, 2019). In addition, it is known that BZ solubility is low (0.4 mg/mL) at pH 7 (SEREMETA *et al.*, 2019), but a controlled and high BZ release percentage was demonstrated in the pH close to neutrality. Other studies have also demonstrated a sustained drug release from superficial charged nanoparticles. In this condition, the drug release is reduced before the nanoparticles arrive the target cells, mainly considering the internalization of nanoparticles by endocytosis (DOS SANTOS-SILVA *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2010; MIAO *et al.*, 2010; SON & KIM, 2010).

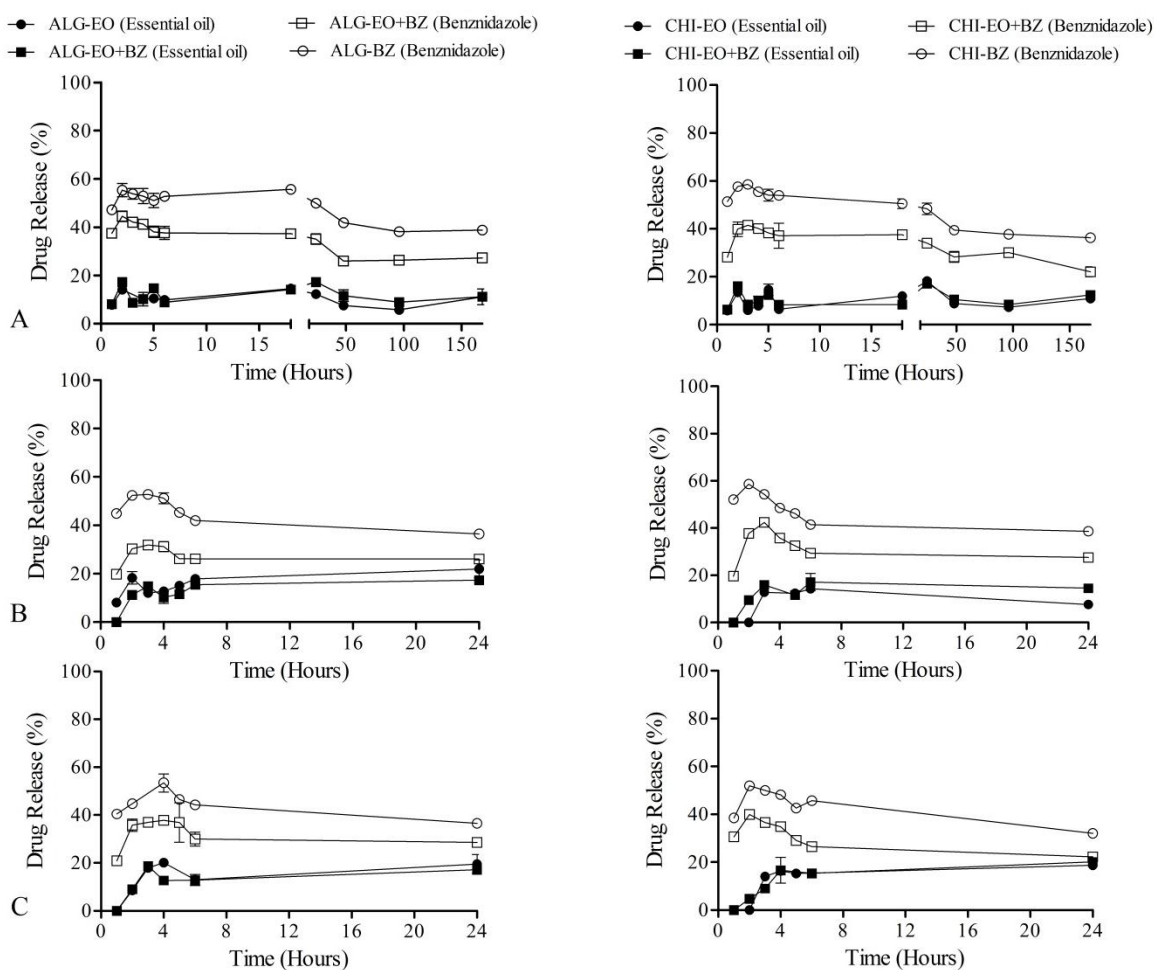


Figure 5: *In vitro* drug release profile of the essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole encapsulated in alginate and chitosan nanoparticles using three different receptor medium. A - Phosphate buffer solution (PBS) and 10% Tween 80 (pH 7.4); B – Fasted state simulated gastric fluid (FaSSGF) (pH 1.6) and C – Fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF) (pH 6.5); ALG – Alginate nanoparticle; CHI – Chitosan nanoparticle; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

On the other hand, the results also showed an initial “burst” effect for BZ loaded nanoparticles that may be attributed to the presence of drug at or near the nanoparticles surface, as well as high surface area and diffusion coefficient due to the small particle size (GHOSH *et al.*, 2010). After this effect, the drug inner part of the polymer matrix becomes surrounded by the drug-free outer part. Then, this condition allows a sustained-release profile due to the increased diffusion distance and hindering effects by matrix (VERMA & RAM, 2010).

In accordance with our results, a slow and extended BZ release encapsulated in alginate and chitosan based interpolyelectrolyte complexes was observed towards water and saline solution. However, a high BZ amount was released during the first 30

minutes, suggesting that a “burst” effect could happen. In addition, a solution simulating gastrointestinal tract conditions was used and the same previous profile was obtained from this medium (GARACÍA, MANZO & JIMENEZ-KAIRUZ, 2018). The burst effect followed by slow drug release was also determined for quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles and *S. hortensis* essential oil loaded alginate microparticles (MANUJA *et al.*, 2014; HOSSEINI *et al.*, 2013b).

Usually, nonionic surfactants are better solubilizing agents than ionic surfactants in dilute solutions (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2007). However, the opposite was observed by Rangel-Yagui *et al.* (2007) and Krishna & Flanagan (1989), corroborating with our work. Moreover, the positively charged nanoparticle, as chitosan, could be attached to the negatively charged epithelial mucin layer in the gastrointestinal tract which in turn would improve drug oral bioavailability (SEREMETA *et al.*, 2019; UBRICH *et al.*, 2005).

Similar to our observations, alginate-cashew gum nanoparticles allowed a sustained release of *L. sidoides* essential oil with release maximal peak between 30 and 50 hours and released content varying from 45 to 95% (DE OLIVEIRA, PAULA & DE PAULA, 2014). Other studies demonstrated the same profile for chitosan nanoparticles, being 80-90% of the essential oil released after 48-60 hours (PAULA *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2010b). On the other hand, only 15% of the turmeric oil in the chitosan-alginate nanocapsule was release into the sodium lauryl sulfate solution after 12 hours. Although this low rate, this system enhanced the drug skin permeation compared with its free form (LETSUTTHIWONG & ROJSITTHISAK, 2011).

TEM analysis

According to figure 6, TEM images revealed small dark round-shaped particles and no signs of aggregate formation were detected for loaded formulations. Similar to our observations, Masalova *et al.* (2013) developed chitosan nanoparticles that presented a monodisperse population and have a spherical shape with the mean size close to 80 nm. In addition, TEM micrographs showed quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles of approximately 25 nm (MANUJA *et al.*, 2014).

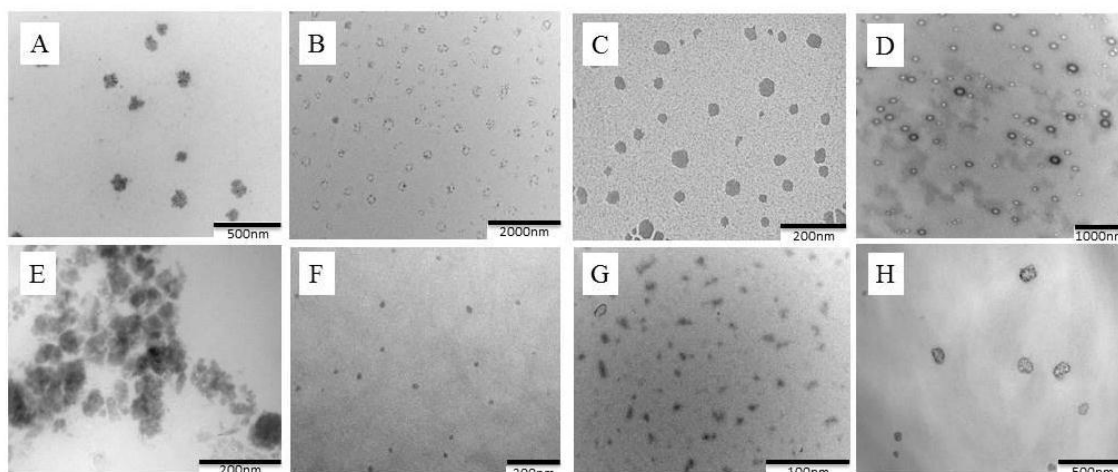


Figure 6: Morphology of alginate and chitosan nanoparticle determined by transmission electron microscopy (TEM). A – Alginate nanoparticle as negative control (ALG-NC); B – Alginate nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves (ALG-EO); C – Alginate nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole (ALG-EO+BZ); D – Alginate nanoparticle loaded with benznidazole (ALG-BZ). E – Chitosan nanoparticle as negative control (CHI-NC); F – Chitosan nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves (CHI-EO); G – Chitosan nanoparticle loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole (CHI-EO+BZ); H – Chitosan nanoparticle loaded with benznidazole (CHI-BZ).

Stability study

In the stability study, alginate and chitosan nanoparticles loaded with essential oil presented an increased mean size after 14 days (Figure 7 and 8). However, after this period the previous parameter was maintained. This finding may be attributed to an increased interaction of the nanoparticles under storage at room temperature and consequence formation of new agglomerates. Although this difference may indicate an instability behavior, the PDI, zeta potential and pH remained constant for the all period analyzed.

Masalova *et al.* (2013) found stable alginate colloids for more than 30 days and this parameter may change according to the ageing in the supernatant and the presence of stabilizers. The same profile was also revealed for the chitosan nanoparticles since no separation of colloids was observed. Thus, the interaction forces between Tween 80 and these polysaccharides would be enough to support the high stability presented for these systems. In addition, the use of a drying technic would be advantageous to maintain their initial physical chemical characteristics.

Stable system for up 4 months was also developed for Lertsutthiwong, Rojsitthisak & Nimmannit (2009) using chitosan and alginate to incorporate turmeric oil. This condition was maintained at 4 and 25 °C, being possible due to strong ionic

interactions between these polymers. A polyelectrolyte complex is then formed that stabilizes and reduces the porosity of the alginate particles (SMIDSRØD & SKJÅK-BRÆK, 1990).

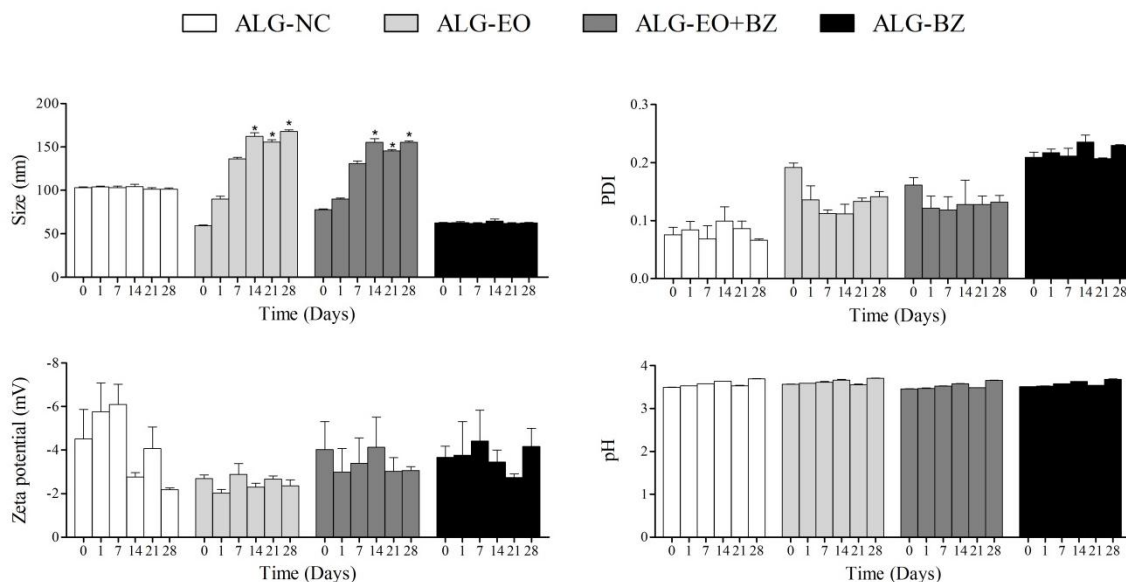


Figure 7: Average size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH of the alginate nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole according to the analyzed period. ALG – Alginate nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

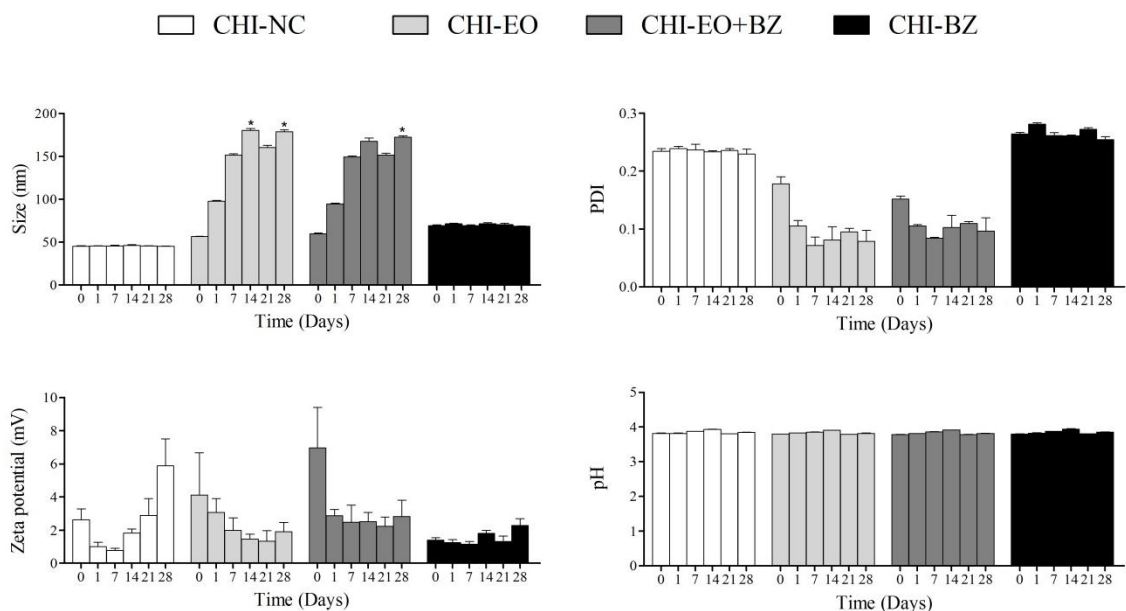


Figure 8: Average size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH of the chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole according to the analyzed period. CHI – Chitosan nanoparticle; NC – Negative control; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

Evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity

Drug-loaded polymeric nanoparticles were evaluated on *T. cruzi* using *in vitro* assay. These systems inhibited the growth of the parasite in the dose-dependent form and control formulations were inactive or active at high concentrations. In this context, quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles were able to inhibit the growth of *T. evansi* at lower concentrations and time treatment (0.243 µg/mL - 4h) than its conventional form (10 µg/mL - 6h). The same profile was also determined by *in vivo* assay for these systems (MANUJA *et al.*, 2014).

Thus, EO loaded formulations reproduced the free drug biological potential. However, the data indicate that CHI-BZ (IC₅₀ 0.68 µg/mL) is more toxic to parasite than ALG-BZ (IC₅₀>2.5 µg/mL) and, in this case, higher doses of BZ are necessary to kill the parasites (Table 7). This finding suggests that there is an incompatibility between this drug and anionic system. According to Gottlieb *et al.* (1995), the presence of charges appears not to support the interactions of chemical species against *T. cruzi* and decreases considerably the therapeutic action of drugs. It suggests that the parasite interacts better with uncharged systems. Chitosan system loaded with *Eucalyptus citriodora* essential oil demonstrated the same EC₅₀ of the free oil for the control of gastrointestinal nematodes (*Haemonchus contortus*) (RIBEIRO *et al.*, 2014).

On the other hand, treatment of peritoneal macrophages with chitosan nanoparticles synthesized with the precursor of nitric oxide in mercaptosuccinic acid decreased the number of *T. cruzi* infected cells and the mean number of intracellular replicative amastigotes per infected cell (CONTRERAS *et al.*, 2018). However, it is known the inflammatory potential of nitric oxide and the systems could improvement this process. Similar approach was observed by Dos Santos-Silva *et al.* (2017) that cationic nanoparticles were able to improve the biological activity of BZ on the cancer cell lines. This fact may be related to their capacity for overcoming biological membranes, as well as particle size with nanometer scale (KANG *et al.*, 2016; OOSTENDORP, BEIJNEN & SCHELLENS, 2009; ZHANG *et al.*, 2008).

Table 7: IC₅₀ determination of the *Trypanosoma cruzi* infected L929 cells and uninfected L929 cells after treatment with alginate and chitosan nanoparticles loaded with essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and/or benznidazole and selectivity index for the anti-*Trypanosoma cruzi* activity.

Nanostructured system	IC ₅₀ on parasite ¹ (µg/ mL)			IC ₅₀ on L929 ² (µg/ mL)			Selectivity index ³
	NS ⁴	EO ⁵	BZ ⁶	NS ⁴	EO ⁵	BZ ⁶	
ALG-NC	Inactive	-	-	Inactive	-	-	Inactive
ALG-EO	3600	180	-	3800	190	-	1.1
ALG-EO+BZ	2100	105	0.21	4890	244	0.5	2.3
ALG-BZ	>25000	-	>2,5	16000	-	1.6	Inactive
CHI-NC	16300	-	-	19100	-	-	1.2
CHI-EO	2600	130	-	2620	131	-	1.0
CHI-EO+BZ	2200	110	0.22	3000	150	0.3	1.4
CHI-BZ	6800	-	0.68	17200	-	1.72	2.5
Free EO		60			230		3.8
Free BZ		1			625		625

¹Concentration which reduced 50% of the proliferation of parasite cells; ²Concentration cytotoxic for 50% of L929 cells; ³IC₅₀ of L929 cells/IC₅₀ of parasite cells; ⁴Nanostructured system concentration; ⁵Nanoparticulate essential oil concentration; ⁶Nanoparticulate benznidazole concentration; ALG: Alginate nanoparticle; CHI: Chitosan nanoparticle; NC: Negative control; EO: Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ: Benznidazole.

Interestingly, an enhanced BZ efficiency was revealed when it was encapsulated with EO for both polymers. In this context, the FICI was determined for these drugs and a synergistic effect was demonstrated for alginate nanoparticles (Table 8). The isobologram analysis confirmed that the combination of EO and BZ resulted in a remarkable synergistic effect on *T. cruzi* (Figure 9). The ability of the colloidal carrier to maintain the entrapped drug into polymeric matrix in the release medium probably would be the responsible for the desired biological activity (KHANG *et al.*, 2016). In addition, previous studies demonstrated the weak interaction between BZ and soybean oil in water emulsion system (STRECK *et al.*, 2014). Soybean and flower oils are composed mainly for fatty acids, that differ of essential oils composition. This fact could justify better results to EO+BZ than FO+BZ. However, further studies are required to identify the precise molecular mechanism between these actives.

Thus, the combination of drugs is an alternative to improve the efficacy of the drugs when they are administrated alone. This might occur due the generation of effects on different pharmacological targets. In addition, others advantages as a reduction of drug resistance and side effects may be observed due low drug doses and treatment period are required. These findings have been supported by different authors (VALDEZ *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2011; GOBBI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FAÚNDEZ *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2000). In this context, Cencig *et al.* (2012)

also demonstrated that shorter durations of treatment combining BZ and posaconazole or nifurtimox might cure mice acutely or chronically infected with the Tulahuen strain.

Table 8: The Fractional inhibitory concentration index and effect on anti-*Trypanosoma cruzi* activity of combined use of the essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole

Nanostructured System	FICI	Effect
ALG-EO+BZ	0,6	Synergistic
CHI-EO+BZ	1,1	Indifferent

FICI – Fractional inhibitory concentration index; ALG – Alginate nanoparticle; CHI – Chitosan nanoparticle; EO – Essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves; BZ – Benznidazole.

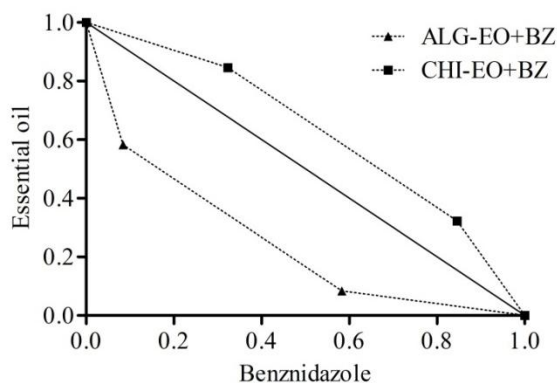


Figure 9: Isolologram describing the synergistic effect of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves and benznidazole encapsulated in alginate and chitosan nanoparticles on *T. cruzi*. Dotted lines below the continuous line correspond to the predicted positions of the experimental points for synergistic effect.

Evaluation of cytotoxicity

The cytotoxicity of developed nanoparticles was assayed by colorimetric assay using resazurin dye. This oxidized, blue and nonfluorescent compound is reduced to a pink fluorescent dye by mitochondrial enzymes (O'BRIEN *et al.*, 2000; DE FRIES & MISTUHASHI, 1995). In general, the viability of fibroblasts treated with the control formulations and BZ loaded systems was maintained during the cell culture period, but a decay of cells number was observed when treated with formulations containing EO. In addition, toxicity of free essential oil and benznidazole increased after encapsulation, but alginate and chitosan are no known to be slightly toxic (Table 7). Thus, this process probably resulted in increased of both drugs toxicity (RIBEIRO *et al.*, 2014). However, a slightly EO cytotoxicity was observed for ALG-EO+BZ.

Similar to our observations, *Eucalyptus citriodora* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles were more toxic than the free oil in the *in vivo* toxicity test (RIBEIRO *et al.*, 2014). In addition, cell viability assay showed IC₅₀ values for quinapyramine sulfate loaded alginate nanoparticles and free drug of 567.54 and 848.33

µg/mL, respectively (MANUJA *et al.*, 2016). On the other hand, the same formulation was less toxic than its non-encapsulated form in a previous work, besides blank nanoparticles without drug were more viable than both previous treatments (MANUJA *et al.*, 2014). This difference may happen because in the first work the cytotoxicity assay was evaluated at determined concentrations (10 and 5 µg/mL) and for the second these values were higher and a drastically dropped cell viability was observed at 625 µg/mL.

Although low SI values were showed for both formulations, polymeric systems present advantages than free drug as increased bioavailability, gradual and controlled release. In addition, an enhanced BZ efficiency was revealed when it was encapsulated with EO. Thus, the nanoparticulate EO and BZ in alginate or chitosan nanoparticles are considered a promising strategy to facilitate the application of these drugs in the chagasic therapeutic.

CONCLUSION

In this study, the interactions of Tween 80:oil ratio and concentrations, as well the use of crosslinking agent were monitored to produce stable systems. The developed formulations revealed feasible physical-chemical characteristics such small and narrow droplet size, satisfactory encapsulation efficiencies and controlled drug release. In addition, alginate and chitosan nanoparticles were demonstrated as promising biocompatible drug delivery systems capable of improving the BZ trypanocidal activity for the treatment of Chagas disease when encapsulated with essential oil from *C. densiflorus* leaves.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) – Finance Code 001 (Janaína Brandão Seibert – PDSE 88881.188759/2018-01). The authors thank all members of Boots Science Building of University of Nottingham.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

APÊNDICE
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uso de plantas medicinais no tratamento da inflamação

Embora muitas citocinas sejam atualmente caracterizadas com base em seus efeitos pró ou anti-inflamatórios, está claro que várias delas também apresentam funções paradoxais, respondendo de diferentes maneiras na dependência de sua concentração, do microambiente e do estágio da resposta imune nas quais essas proteínas são produzidas. Dessa forma, essas citocinas podem influenciar tanto a atividade das células T efectoras como de células reguladoras, no sentido de estabelecer uma resposta imune protetora ao hospedeiro (PAVANELLI, 2008).

Como detalhado anteriormente, citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da doença de Chagas com o propósito de estimular a resposta imune e combater o parasito. No entanto, estas são produzidas em níveis elevados na fase crônica e acabam causando danos ao tecido devido à sua produção tóxica às células parasitárias, bem como, às do hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2003; ABEL *et al.*, 2001; RIBEIRÃO *et al.*, 2000). Sendo assim, se a resposta imune não for devidamente controlada pode induzir uma patogênese associada ao parasitismo e, com isso, o infiltrado inflamatório passa a ser mais lesivo para os órgãos acometidos na doença de Chagas do que para os próprios parasitos (DUTRA *et al.*, 2014; BORGES *et al.*, 2009; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

Neste contexto, diversos estudos já revelaram a ação anti-inflamatória de bioativos provenientes de plantas, sendo algumas espécies já registradas pela Anvisa, como: *Borago officinalis*, *Boswellia serrata*, *Cassia occidentalis*, *Harpagophytum procumbens*, *Oenothera biennis* e *Uncaria tomentosa* para uso oral e *Calendula officinalis*, *Capsicum annum*, *Cordia verbenacea*, *Matricaria recutita* e *Uncaria tomentosa* para uso tópico (CARVALHO *et al.*, 2008).

Em revisão feita por Tresch *et al.* (2019), também foram confirmadas as atividades de *C. officinalis* e *M. recutita* sobre a inflamação, além de outras espécies que demonstraram potencial semelhante, *Hypericum perforatum* e *Salvia officinalis*. Dessa forma, trabalhos recentes reforçam a importância das plantas medicinais e seus metabólitos, descrevendo a presença de efeitos anti-inflamatórios para espécies do gênero *Celastrus* (SHEN *et al.*, 2019), *Lamium* (SALEHI *et al.*, 2019) *Sideritis*

(ANEVA *et al.*, 2019), *Opuntia* (SHIRAZINIA *et al.*, 2019), *Portulaca* (RAHIMI *et al.*, 2019), *Decalepis* (MISHRA *et al.*, 2019), entre outros.

Ademais, Mamani-Matsuda *et al.* (2004) reportaram o efeito da quercetina na Tripanossomíase Humana Africana (THA) causada pelo parasito *T. brucei*. No entanto, a atividade desse flavonoide, que é facilmente extraído de diversas plantas, foi observada como devido não apenas ao efeito tripanocida direto, mas também à diminuição da resposta pró-inflamatória das células hospedeiras, ou seja, redução do TNF e síntese de NO em macrófagos humanos ativados.

Além das citocinas, podem ser avaliadas a atividade e a expressão de enzimas envolvidas na inflamação como a iNOS e as ciclo-oxigenases (COX). Como descrito anteriormente, a iNOS é induzida por citocinas e endotoxinas como resultado de uma resposta inflamatória (CERQUEIRA *et al.*, 2002; MONCADA *et al.*, 1991). Após sua expressão, quantidades elevadas de NO são produzidas até que os fatores essenciais para sua síntese sejam inibidos ou ocorra morte celular (DUSTING *et al.*, 1995). Estudos prévios revelam que cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* expressam RNAm para mediadores como TNF- α , IL-1 β e iNOS, os quais respondem a estes estímulos através da produção de altos níveis de NO (MACHADO *et al.*, 2000; TALVANI *et al.*, 2000). Entretanto, quando a expressão dessa enzima é parte da inflamação anormal ou não-adaptativa, sua ação pode ser nociva e, portanto, não desejável (CERQUEIRA *et al.*, 2002).

As ciclo-oxigenases (COX) são enzimas responsáveis pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides, os quais estão incluídos as prostaglandinas (PG), prostaciclina e tromboxano, e são fundamentais na geração da resposta inflamatória. Existem pelo menos duas isoformas de COX: a COX-1, constitutivamente (constantemente) expressa na maioria das células, e a COX-2, que é induzida por mediadores inflamatórios, principalmente citocinas (BATLOUNI, 2010). Estudos demonstram que durante a infecção desencadeada pelo *T. cruzi*, a COX-2 e a PGE2 são essenciais para a sobrevivência desse patógeno nas células hospedeiras, através da indução da replicação e disseminação do patógeno, bem como a inibição da resposta do sistema imune. Dessa forma, este parasito é um potente indutor de COX-2, uma vez que a expressão desse mediador é significativamente aumentada durante a infecção pelo *T. cruzi* (MORAES *et al.*, 2015). Por outro lado, após tratamento com

inibidores da COX-2, camundongos infectados com *T. cruzi* apresentaram redução do parasitismo no sangue e no músculo cardíaco (ABDALLA *et al.*, 2008; TATAKIHARA *et al.*, 2008; MICHELIN *et al.*, 2005). Com isso, ativos que inibem os mediadores inflamatórios, como iNOS e COX, são favoráveis ao amenizar a replicação do parasito e a patogênese inflamatória chagásica.

Há vários relatos na literatura que comprovam a ação inibitória de iNOS e COX-2 para produtos naturais provenientes de plantas. Segundo Ahujaa *et al.* (2019), o extrato metanólico de *Protium javanicum* reduziu significativamente a expressão de ambas as enzimas. Resultados semelhantes também foram encontrados para *Garcinia kola* (WALLERT *et al.*, 2019), *Atractylodes macrocephala* (JEONG *et al.*, 2019), *Sphaeranthus africanus* (TRAN *et al.*, 2019), *Vitis thunbergii* (CHANG *et al.*, 2017), *Premna integrifolia* (AZAD *et al.*, 2018), *Dendropanax morbifera* (HYUN *et al.*, 2015), *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (BARNWAL *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2017), sugerindo efeito anti-inflamatório para estas espécies.

Tendo em vista, portanto, o potencial de espécies vegetais sobre a mediação da inflamação e sabendo-se que a infecção pelo *T. cruzi* pode desencadear esse processo, substâncias que apresentam ambos os efeitos, antiparasitário e anti-inflamatório, seriam alvos de grande interesse para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para a doença de Chagas e foi, portanto, tema de estudo para o presente capítulo.

1.2. Uso de plantas medicinais no estresse oxidativo

Um alto grau invariável de dano oxidativo prevalece principalmente nos órgãos infectados pelo *T. cruzi*, sendo proposto, então, que a ativação persistente de processos lesivos oxidativos desempenha papel importante na lesão tecidual específica na doença de Chagas (GUPTA *et al.*, 2009). Neste contexto, o potencial uso farmacológico de plantas medicinais como antioxidante já é comprovado e outras espécies ainda estão sendo exploradas (BANERJEE *et al.*, 2018). Além disso, os antioxidantes naturais podem ser mais benéficos do que os sintéticos, os quais causam potenciais efeitos colaterais à saúde durante os longos períodos de ingestão (LAHMAR *et al.*, 2017).

Revisão feita por Banerjee *et al.* (2018) apresenta uma coleção de artigos sobre o uso de extratos medicinais na prevenção de doenças relacionadas ao dano oxidativo. Neste trabalho, espécies como *Smallanthus sonchifolius*, *Carapa guianensis*, *Gracilaria*

lemneiformis, *Rheum tanguticum* e *Mentha piperita* foram descritas como alvo na busca por agentes antioxidantes. Segundo Meng *et al.* (2018), o efeito reportado para *R. tanguticum* ocorre devido à sua capacidade em inibir a expressão e, conseqüentemente, a produção de moléculas inflamatórias e oxidativas, como IL-1 β , TNF e NO.

Sayin *et al.* (2011) sugerem que o resveratrol, polifenol encontrado naturalmente em uvas, pode auxiliar o tratamento de doenças relacionadas com o efeito prejudicial e acumulativo das ERO, uma vez que a atividade antioxidante foi comprovada para esta substância. De acordo com Yan *et al.* (2018), este polifenol regula negativamente a expressão do gene miR-21 que resulta no bloqueio da indução de ERO.

Outra via relacionada ao estresse oxidativo é a ação de terapias tripanocida sobre a mitocôndria do parasito. A mitocôndria do protozoário pode ser considerada como um valioso alvo de fármacos devido à sua estrutura e função únicas, comparadas às células de mamíferos (SEM *et al.*, 2008). A função fisiológica predominante da mitocôndria é a geração de ATP pela fosforilação oxidativa e funções adicionais incluem a geração e desintoxicação de ERO, o envolvimento em algumas formas de apoptose e a regulação do cálcio citoplasmático e mitocondrial (BRAND *et al.*, 2011). Diante disso, um potencial adequado de membrana mitocondrial é essencial para a sobrevivência das células e as mudanças podem resultar em uma variedade de alterações nocivas ao *T. cruzi*. Sendo assim, como consequência à redução do potencial de membrana mitocondrial, ocorre a elevação da produção de ERO e, por conseguinte, proteínas, lipídios e DNA são prontamente oxidados, resultando em disfunção de processos fisiológicos vitais, dano oxidativo e morte celular tanto do parasito quanto das células hospedeiras (FIDALGO *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2009).

Em suma, a geração sustentada de NO e ERO de origem inflamatória ou mitocondrial, associada a uma resposta antioxidante inadequada, resulta na eliminação ineficaz desses radicais e leva ao estresse oxidativo a longo prazo e, subseqüentemente, a danos oxidativos dos componentes celulares dos órgãos acometidos durante a doença chagásica (GUPTA *et al.*, 2009). Com isso, o estudo isolado somente da atividade anti-inflamatória ou da ação sobre NO e ERO não estaria completo, uma vez que esses efeitos estão correlacionados durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Além disso, considerando que um grande número de fármacos que afetam a mitocôndria também contribui para a estimulação de ERO, compostos que são efetivos

contra o parasito, mas que não induzam o estresse oxidativo seriam interessantes na busca por novas terapias seguras (CORTES *et al.*, 2015). Como por exemplo, a soulamarina, cumarina obtida através de *Calophyllum brasiliense*, induziu a despolarização do potencial da membrana mitocondrial em tripomastigotas, sem produzir efeito na geração de radicais livres (REA *et al.*, 2013).

É proposto, portanto, que os antioxidantes capazes de modular ou retardar o aparecimento desta patogênese oxidativa e possíveis deficiências nos órgãos afetados se revelem úteis na doença de Chagas, sendo também foco de pesquisa nesse trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, bem como, sugerir a via de ação deste óleo durante o processo inflamatório.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* em culturas de macrófagos.
- Dosar citocinas presentes no processo inflamatório após tratamento com este óleo.
- Dosar óxido nítrico após tratamento com óleo essencial de *C. densiflorus*.
- Dosar espécies reativas de oxigênio após tratamento com este óleo.
- Avaliar a ação do óleo essencial de *C. densiflorus* sobre a expressão da enzima induzível de óxido nítrico sintase (iNOS).
- Avaliar a ação deste óleo sobre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2).
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in silico* do óleo essencial de *C. densiflorus*.
- Avaliar a ligação molecular entre os compostos majoritários deste óleo e as enzimas iNOS e COX-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória

3.1.1. Citotoxicidade

Para a avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória foi determinada previamente, a partir do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (MOSMAN, 1983), a citotoxicidade em macrófagos murinos do óleo essencial que apresentou maior potencial anti-*T. cruzi*, sendo este o óleo de folhas de *C. densiflorus*.

Foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774 A.1(ATCC TIB-67™) cultivados em garrafas em meio de cultura RPMI 1640 com vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) contendo L-glutamina (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), 10% de soro fetal bovino e 60 µg/L de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), mantido em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

Em seguida, em placa de 96 poços, foi adicionado um número de células equivalente a 5×10^5 em um volume final de 200 µL de meio de cultura em cada poço e incubadas por 4 horas em estufa nas mesmas condições anteriores para aderência das células.

Após esse período, foi retirado o meio de cultura e adicionado os controles e as amostras nas placas em triplicata. Para o controle negativo, foi utilizado apenas 200 µL de meio de cultura sobre as células, já para o controle positivo foi adicionado 100 µL de meio e 100 µL de uma mistura de lipopolissacarídeo (LPS) (*Escherichia coli* O111:B4 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e IFN-γ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a fim de obtê-los na concentração de 5 µg/mL e 100 ng/mL, respectivamente, para promoção da resposta inflamatória. Além disso, também foi necessário 200 µL de um controle para o meio, no entanto, sem a presença de células. Por fim, as amostras negativas foram obtidas a partir 100 µL de meio de cultura e 100 µL do óleo essencial (2 mg/mL), obtendo-o a partir da diluição seriada 1:2 nas concentrações finais de 1000 a 62,5 µg/mL, já para as amostras positivas este meio foi substituído por 100 µL da solução de LPS+ IFN-γ.

A placa foi, então, incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi retirado (200 µL) e armazenado na temperatura de -80 °C para a realização conseguinte da dosagem de citocinas e de óxido nítrico. Depois da retirada do sobrenadante, foram adicionados 100 µL do meio RPMI sem vermelho de fenol e suplementado e 50 µL do reagente de viabilidade celular MTT (2 mg/mL). A placa foi novamente acondicionada em estufa ao abrigo de luz por mais 4 horas. Após esse período foi adicionado 60 µL do reagente dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% 0,01 M HCl, responsável por solubilizar os cristais de formazan formados e depois de 18 horas mantida na mesmas condições anteriores foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos pela porcentagem de viabilidade celular a partir da equação 3.

$$\% \text{ viabilidade celular} = (A_1 \times 100)/A_0 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, A₀ representa a absorbância do controle negativo e A₁ representa a absorbância da amostra.

Após os cálculos, foram selecionadas as concentrações de óleo essencial que apresentaram cerca de 60% ou mais de viabilidade celular para dosagem de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (VENTURA, 2011).

3.1.2. Dosagem de citocinas

Nesta etapa foi utilizado o sobrenadante dos controles e tratamentos retirados do teste anterior, estabelecendo-se como critério de escolha das concentrações a serem utilizadas as que apresentaram citotoxicidade inferior a 40%. As citocinas foram, então, quantificadas a partir do método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o kit *mouse inflammation* (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF e IL-12p70) (BD Biosciences, San Jose, CA) com auxílio do Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias (OLIVEIRA, 2014).

A princípio, o padrão foi reconstituído 15 minutos antes do uso com 2 mL de Reagente G (diluyente) e denominado de *Top Standard* (5000 pg/mL), sendo, posteriormente, submetido a uma diluição seriada 1:2 a fim de se obter oito concentrações, de 2500 a 20 pg/mL. Além disso, também foi necessária a produção de um controle negativo contendo apenas o Reagente G (0 pg/mL).

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 25 °C e centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e 4 °C. Em seguida, foram recolhidos 25 µL de cada amostra para um novo tubo separadamente.

As *beads* para cada uma das citocinas são marcadas com intensidades de fluorescências distintas, de modo a serem separadas, graficamente, no momento da aquisição no citômetro de fluxo. Dessa forma, as posições das *beads* e as citocinas correspondentes são: A1= IL-6, A2= IL-10, A3= MCP-1, A4= IFN- γ , A5= TNF, A6= IL-12p70. Sendo assim, foi preparada uma mistura desses reagentes (A1 até A6), contendo um volume final de 3 µL de cada *bead* para cada amostra. Posteriormente, foram adicionados 18 µL dessa mistura nos respectivos tubos de diluição do padrão e para cada amostra a ser analisada. Por fim, foram adicionados 18 µL de Reagente B (reagente de detecção marcado com PE) em cada tubo, os quais foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após esse período, 500 µL de Reagente F (*Wash Buffer*) foram adicionados em cada um dos tubos, seguido de uma centrifugação à 1300 rpm e 18 °C por 7 minutos. Em uma última etapa, o sobrenadante de todos os tubos foi aspirado, restando um volume final de aproximadamente 100 µL e adicionado 100 µL do Reagente F para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram obtidos em triplicata e analisados utilizando o *software FCAP Array v3* e os gráficos obtidos através do *software GraphPad Prism 5.0*.

3.1.3. Dosagem de óxido nítrico

a) Método de Griess

A concentração de óxido nítrico do sobrenadante recolhido na primeira etapa foi mensurada a partir do método colorimétrico de Griess (LAI *et al.*, 2013). O reagente de Griess é obtido através de uma mistura 1:1 de sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5% (A) e de naftilenodiamina 0,1% em água destilada (B). As soluções estoques A e B foram preparadas e, no momento do ensaio, misturadas para formar o reagente.

O padrão utilizado foi o nitrito de sódio, o qual foi obtido primeiramente numa solução de 0,02 M para a produção, posterior, de uma solução estoque de 1 µmol/mL. A partir desta solução, foram preparadas doze concentrações através de uma diluição

seriada 1:2 em água destilada. Em seguida, foram adicionados em placa de 96 poços 50 µL de cada concentração do padrão, em triplicata, juntamente com 50 µL de reagente de Griess em cada poço, a fim de se obter o padrão nas concentrações de 500 a 3,9 mmol/mL. No caso das amostras a serem analisadas, foram utilizados os sobrenadantes dos controles e tratamentos retirados no teste de citotoxicidade, para isto foram adicionados em cada poço 50 µL do controle negativo (ausência de LPS+IFN-γ), controle positivo (presença de LPS+IFN-γ) e cada concentração do óleo essencial que apresentou viabilidade celular próximo ou superior a 60% na ausência ou presença de LPS+IFN-γ e, por fim, foram acrescentados 50 µL do reagente de Griess para cada amostra.

Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 10 minutos. Após esse período, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos através da concentração de óxido nítrico a partir da equação da reta obtida pela curva do padrão.

b) Citometria de fluxo

A dosagem de óxido nítrico também foi realizada através de citometria de fluxo. Em placas de 96 poços sem tratamento para aderência das células foi adicionado um número de células J774 equivalente a 5×10^5 em um volume de 25 µL de meio de cultura RPMI com vermelho de fenol e suplementado. Logo após, adicionou-se 25 µL da mistura de LPS+IFN-γ a fim de obtê-los na concentração final de 5 µg/mL e 100 ng/mL, respectivamente. No caso do controle sem estímulo para o processo inflamatório, esse volume foi substituído por apenas meio de cultura. Em seguida, foi adicionado 50 µL de óleo essencial para os tratamentos nas concentrações de 250 a 62,5 µg/mL. O controle negativo foi composto por apenas 25 µL de células e 75 µL de meio de cultura, enquanto que para o controle positivo 25 µL da mistura de LPS+ IFN-γ e somente 50 µL de meio foram adicionados além das células. A placa foi, então, incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Após esse período, a placa foi mantida sob uma placa de gelo por 5 minutos para que todo o material fosse desprendido. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de citometria e adicionou-se PBS para lavagem dos poços e retirada de qualquer

material ainda restante. Nos tubos de citometria com as amostras, foram adicionados 2 mL de PBS e, posteriormente, centrifugados a 1600 rpm e 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram agitados sob o vórtex para ressuspender as amostras. Logo após, adicionou-se 100 µL de meio de cultura e 100 µL da solução do marcador fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF2-DA - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (15 µmol em PBS) e os tubos foram agitados novamente e incubados ao abrigo de luz em estufa a 37 °C por 3 horas. Posteriormente, 2 mL de PBS foram adicionados às amostras, as quais foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de PBS para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) (MAMANI-MATSUDA *et al.*, 2004). Os resultados foram obtidos em triplicata e analisados utilizando o *software FlowJo* e os gráficos obtidos através do *software GraphPad Prism 5.0*.

3.1.4. Dosagem de espécies reativas de oxigênio

A dosagem de espécies reativas de oxigênio foi realizada a partir da mesma metodologia anterior para dosagem do óxido nítrico através de citometria de fluxo. No entanto, para este caso, o marcador fluorescente utilizado foi o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (AMPARO *et al.*, 2019). Sendo assim, em placas de 96 poços sem tratamento para aderência das células, foi adicionado um número de células J774 equivalente a 5×10^5 em um volume de 25 µL de meio de cultura RPMI com vermelho de fenol e suplementado. Logo após, adicionou-se 25 µL da mistura de LPS+IFN- γ a fim de obtê-los na concentração final de 5 µg/mL e 100 ng/mL, respectivamente. No caso do controle sem estímulo para o processo inflamatório, esse volume foi substituído por apenas meio de cultura. Em seguida, foi adicionado 50 µL de óleo essencial para os tratamentos nas concentrações de 250 a 62,5 µg/mL. O controle negativo foi composto por apenas 25 µL de células e 75 µL de meio de cultura, enquanto para o controle positivo 25 µL da mistura de LPS+ IFN- γ e somente 50 µL de meio foram adicionados além das células. A placa foi, então, incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Após esse período, a placa foi mantida sob uma placa de gelo por 5 minutos para que todo o material fosse desprendido. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de citometria e adicionou-se PBS para lavagem dos poços e retirada de qualquer material ainda restante. Nos tubos de citometria com as amostras, foram adicionados 2 mL de PBS e, posteriormente, centrifugados a 1600 rpm e 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram agitados sob o vórtex para ressuspender as amostras. Logo após, adicionou-se 100 µL de meio de cultura e 10 µL da solução do marcador fluorescente DCFH-DA (0,5 mmol em PBS) e os tubos foram agitados novamente e incubados ao abrigo de luz em estufa por 3 horas. Posteriormente, 2 mL de PBS foram adicionados às amostras, as quais foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de PBS para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram obtidos em triplicata e analisados utilizando o *software FlowJo* e os gráficos obtidos através do *software GraphPad Prism 5.0*.

3.1.5. Avaliação da expressão da enzima iNOS

A ação do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* sobre a produção de óxido nítrico também foi verificada a partir da análise da expressão de iNOS por imunofluorescência segundo Amparo *et al.* (2019). Para isso, 1×10^5 células/poço de macrófagos J774 em meio de cultura RPMI com vermelho de fenol e suplementado foram adicionados em placa *chamber slide*, a qual foi incubada por 4 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi retirado e adicionou-se novamente 150 µL de meio novo para obtenção do controle negativo, enquanto o controle positivo continha 75 µL de meio e 75 µL da solução de LPS+IFN- γ , a fim de obtê-los na concentração final de 5 µg/mL e 100 ng/mL, respectivamente. Para o tratamento com óleo essencial foi utilizado o mesmo volume de LPS+IFN- γ e adicionou-se 75 µL do óleo, obtendo-o a 250 µg/mL. A placa foi incubada novamente nas mesmas condições anteriores por 24 horas.

Após esse período, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e 100 µL de paraformaldeído a 4% foram adicionados e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Os poços foram lavados novamente com PBS e adicionou-se 100 µL de Triton X-100 a 0,5% em PBS, mantidos durante 5 minutos a temperatura ambiente para

permeabilização das células. Essa etapa foi repetida por mais 2 vezes, seguida do bloqueio dessa permeabilização a partir da adição de 100 µL de PBS com 1% de BSA (*Bovine serum albumin*), a qual foi mantida por 1 hora.

Em seguida, os macrófagos foram corados a partir da adição de 100 µL de anticorpo monoclonal anti-iNOS de murino (Abcam® - Cambridge, MA, USA) em um suporte de parafilme, onde foi colocada a lâmina retirada da *chamber slide*. As amostras foram então transferidas para uma placa Petri úmida contendo papel e algodão umedecidos e incubadas ao abrigo da luz *overnight* a temperatura de 4° C.

Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e incubados novamente à temperatura ambiente com 100 µL do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:200 em PBS com 1% de BSA) (Abcam® - Cambridge, MA, USA) durante 2 horas para obtenção das amostras (controle negativo, controle positivo e tratamento com óleo essencial) coradas apenas com esse marcador. Para a marcação somente com DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), 100 µL desse reagente a 0,2 µg/mL em PBS foram adicionados aos poços e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Estas duas etapas foram efetuadas para as amostras com adição de ambos os corantes. Após as marcações, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e uma lamínula contendo solução de fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (10 µL) foi anexada à lâmina. As imagens foram geradas e capturadas através de microscópio confocal (Zeiss LSM780) a partir de uma objetiva de 63x. A fluorescência foi quantificada pelo *software Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.1.6. Avaliação da expressão da enzima COX-2

A expressão da enzima COX-2 foi avaliada por Western Blotting após tratamento com óleo de *C. densiflorus*, sob supervisão da Dra. Kátia Michelle Freitas, no Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Nesta análise, macrófagos ($7,5 \times 10^6$ células por poço) foram plaqueados em placas de 6 poços e incubados por 4 horas para adesão. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 mL de uma solução de LPS (10 µg/mL) + IFN-γ (200 ng/mL) e 2 mL da amostra (óleo essencial 500 µg/mL). Para o controle negativo, foram

adicionados somente 4 mL de RPMI e para o controle positivo, 2 mL de RPMI e 2 mL de LPS + IFN- γ . O experimento foi realizado em quadruplicata.

Após incubação por 24 horas, o sobrenadante foi descartado, as células removidas com *cell scraper* e transferidas com PBS para tubos. Os tubos foram centrifugados a 370 g e 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 80 μ L de tampão de lise (solução aquosa de NaCl 0,22%, Tris base 0,15%, desoxicolato de sódio 0,12%, Triton-X100 0,25%, contendo 2,5 mg/mL de coquetel de inibidores de protease P-8340 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após, foi realizada a incubação dos tubos por 30 minutos em gelo, com agitação em vórtex em intervalos de 5 minutos. Ao final deste período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm e 4°C por 20 minutos, e então o sobrenadante foi recolhido e transferido para tubos tipo eppendorf que foram armazenados a -80°C.

Para análise da expressão de COX-2, 30 μ g dos lisados proteicos foram fracionados em gel de poliacrilamida para a separação por eletroforese utilizando-se o sistema *Mini-Protean II Electrophoresis Cell* (Bio-Rad® Laboratories). Inicialmente, pelo período de 30 minutos a corrida foi realizada sob voltagem de 80 V, após esse período, a voltagem foi alterada para 90 V. Após a eletroforese, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos com o tampão de transferência sob lenta agitação. Concomitantemente, uma membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) (Bio-Rad® Laboratories) de mesma dimensão do gel foi lavada por 1 minuto com metanol absoluto e depois incubada em tampão de transferência. As proteínas separadas foram transferidas para a membrana utilizando-se o sistema de transferência *Trans-Blot turbo-Transfer System* (Bio-Rad® Laboratories). As membranas foram então coradas com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético 3% para verificar a eficiência da transferência e para confirmar a quantidade de proteínas em cada canaleta.

Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada na solução de bloqueio por 1 hora. Posteriormente, lavou-se a membrana seis vezes por 5 minutos em TTBS (Solução salina tamponada com tris) seguindo-se a incubação a 4 °C *overnight* com 5 mL dos anticorpos primários COX-2 (Abcam® - Cambridge, MA, USA). Ao final da incubação, lavou-se 6 vezes a membrana por 5 minutos em TTBS, sendo posteriormente incubada por 1 hora com 5 mL de anticorpo anti-IgG de coelho com peroxidase conjugada (Abcam® - Cambridge, MA, USA) (diluído 1:10.000 em TTBS) nas mesmas

condições anteriores. Lavou-se novamente a membrana, e procedeu-se à revelação por quimioluminescência utilizando o Luminatta Forte (Invitrogen[®]) como revelador em Fotodocumentador ImageQuant[®] (GE Healthcare Life Sciences, USA).

Após a revelação, as membranas foram recuperadas pela incubação das mesmas por 10 minutos com solução comercial de *stripping buffer* (SEPPRO[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O procedimento de *blot* foi repetido, agora utilizando anticorpo anti- β caderina (1:10.000). Os resultados foram expressos como COX-2/ β -actina.

3.2. Avaliação *in silico* da atividade anti-inflamatória

3.2.1. Atividade anti-inflamatória

Os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* também foram analisados *in silico* quanto ao seu potencial anti-inflamatório utilizando a ferramenta PASS *online* (*Prediction Activity Spectra of Substances*), com auxílio da Msc. Tatiane Roquete Amparo (www.pharmaexpert.ru/passonline) (AMPARO, 2016).

Nesta análise, visou-se identificar os constituintes que seriam responsáveis pela ação do óleo durante o processo de inflamação. Sendo assim, os efeitos biológicos e mecanismos de ação avaliados foram: (1) Anti-inflamatório; (2) Agonista de Interleucina 10; (3) Antagonista de Interleucina 10; (4) Antagonista de Interleucina 6; (5) Antagonista de Interferon gama; (6) Sequestrador de óxido nítrico; (7) Antagonista de óxido nítrico; (8) Sequestrador de oxigênio.

Os resultados das análises foram expressos pela diferença da probabilidade do composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) e foram classificados como: Pa-Pi < 0,2: Baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: Moderado potencial; Pa-Pi \geq 0,5: Alto potencial.

3.2.2. Avaliação da ligação molecular

Estudos *in silico* de ligação molecular foram realizados com o intuito de compreender o modo de ligação das enzimas iNOS e COX-2 com os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* e identificar o possível inibidor através do programa PyRx *docking tool* (DALLAKYAN & OLSON, 2015). Inicialmente estruturas cristalinas da iNOS (PDB código 1dd7) e COX-2 (PDB código 4fm5) de murinos foram obtidas a partir do banco de dados de proteínas (PDB)

(MURUGESU *et al.*, 2019) e as estruturas 3D dos compostos majoritários e do controle positivo (Quercetina) foram obtidas pelo banco de dados PubChem. Antes de avaliar a ligação, os arquivos foram convertidos para o formato apropriado (*.pdb) por meio do *Biovia Discovery Studio software* (San Diego, USA). Em seguida, um método de algoritmo foi utilizado para calcular as energias de ligação entre as enzimas e os compostos ativos no programa *PyRx docking tool*. Os parâmetros de iNOS foram ajustados para centro $x = 65,2440$; $y = 16,981$ e $z = 50,6350$ e tamanho $x = 57,60$; $y = 59,83$ e $z = 72,29$. No caso da COX-2, os parâmetros para centro e tamanho foram $x = 48,2589$; $y = 33,9550$ e $z = 25,5684$ e $x = 112,6305$; $y = 89,2199$ e $z = 140,8334$, respectivamente. Por fim, os diagramas 3D sobreposto dos ligantes e as enzimas foram obtidos por meio do programa *Biovia Discovery Studio* (2.1.0).

3.3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram representados pelas médias \pm desvio padrão. A comparação entre os controles e as amostras foi realizada a partir do teste One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$, através do programa *GraphPad Prism 5.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória

4.1.1. Citotoxicidade

A avaliação do efeito tóxico é de suma importância na fase inicial de pesquisa para novos princípios ativos e desenvolvimento de fármacos, uma vez que permite determinar a concentração que pode ser utilizada sem danos celulares (ARAÚJO *et al.*, 2008). Visto que somente o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* apresentou efetiva atividade tripanocida, este foi selecionado para ser avaliado também quanto ao seu efeito anti-inflamatório.

O gráfico presente na figura 25 exibe a concentração deste óleo essencial na ausência e presença do estimulador inflamatório (LPS+IFN- γ) pela porcentagem de viabilidade das células J774.

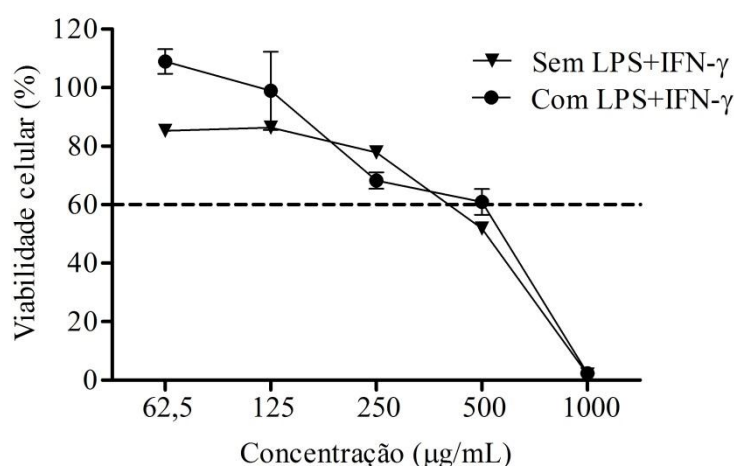


Figura 25: Porcentagem da viabilidade celular de macrófagos J774 de acordo com as concentrações de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* na ausência e presença de LPS (5 µg/mL) + IFN- γ (100 ng/mL).

De acordo com Ventura (2011), concentrações de ativos que apresentam viabilidade celular superior a 60% podem ser utilizadas na avaliação *in vitro* do efeito anti-inflamatório sem que haja danos às células, assim, o efeito medido não seria devido à morte celular. Dessa forma, pode-se observar que as três menores concentrações (62,5 a 250 µg/mL) revelaram valores superiores ao estabelecido, independentemente da presença ou não de LPS+IFN- γ . Sendo assim, estas concentrações de óleo permitiram a manutenção da viabilidade celular e, no caso da presença de LPS+IFN- γ , promoção da

resposta inflamatória, fato este que as tornam viáveis para os posteriores testes de dosagem de citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico.

4.1.2. Dosagem de citocinas

Na sequência estão representados os gráficos obtidos a partir da dosagem das citocinas TNF (Figura 26-A), IFN- γ (Figura 26-B), MCP-1 (Figura 26-C), IL-10 (Figura 26-D) e IL-6 (Figura 26-E) nas diferentes concentrações do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, na ausência ou presença de LPS+IFN- γ , comparando-se com os controles negativo e positivo, respectivamente. Em relação à citocina IL-12p70, não foi possível a quantificação da mesma, uma vez que os valores encontrados foram abaixo do alcance padrão e fora do intervalo de inversão.

Sabe-se que a resistência à infecção pelo *T. cruzi* é multifatorial, ou seja, pode ser influenciada tanto por fatores genéticos do hospedeiro quanto por citocinas. A produção de IFN- γ inibe a replicação do parasito através da indução da síntese de NO em macrófagos e, de forma sinérgica, o TNF controla o crescimento do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1992; MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992). Neste contexto, níveis de TNF e IFN- γ capazes de controlar o *T. cruzi* na doença de Chagas por meio da estimulação de macrófagos são requeridos. Ao analisarmos os gráficos contidos nas figuras 26-A e 26-B, podemos observar que não houve diferença estatística entre o controle e as concentrações do óleo de *C. densiflorus* na ausência ou presença do estimulador inflamatório para essas citocinas, indicando que este ativo não intensificaria a inflamação, bem como, manteria o efeito antiproliferativo desempenhado por TNF e IFN- γ .

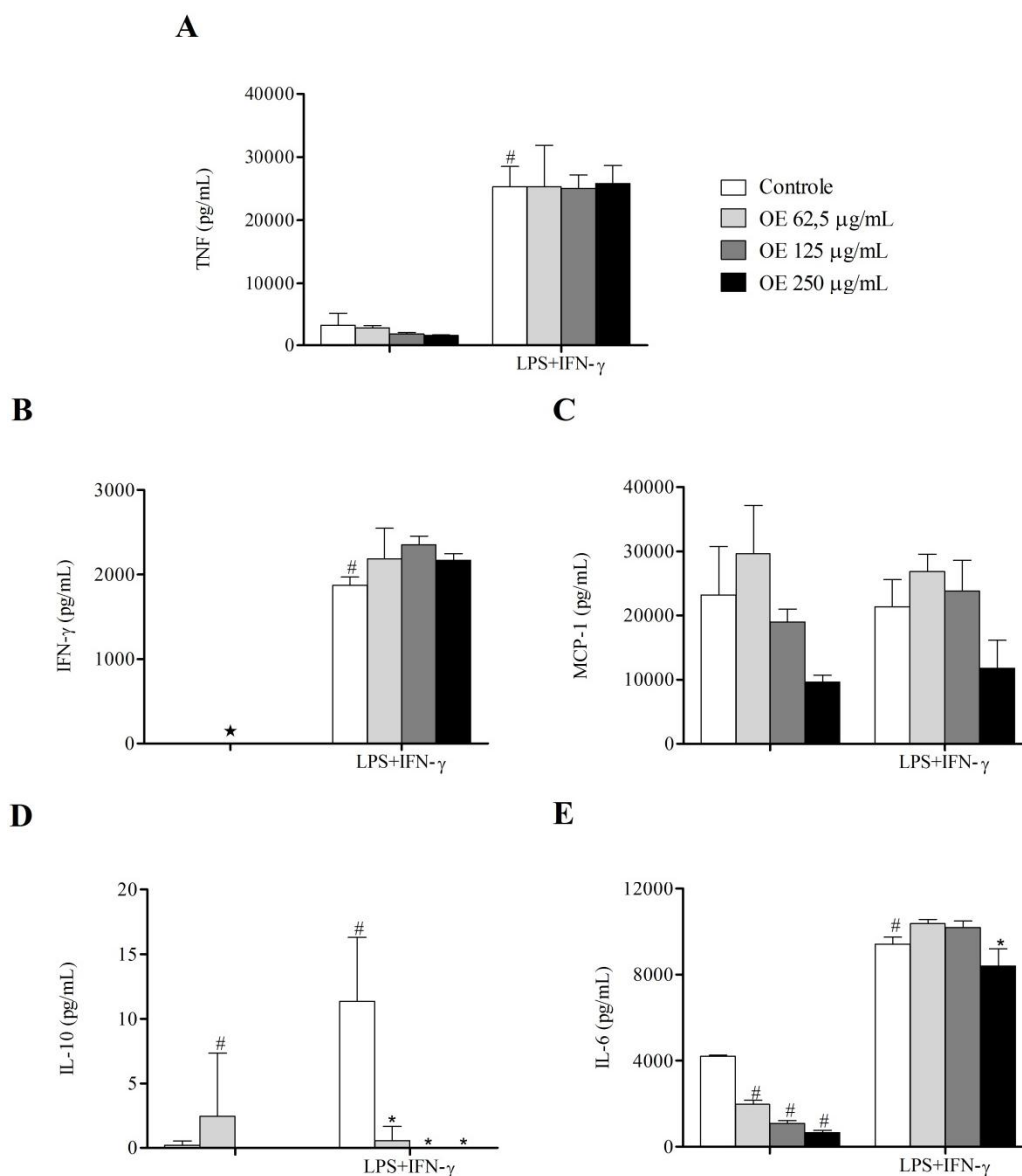


Figura 26: Dosagem de TNF (A), IFN- γ (B), MCP-1 (C), IL-10 (D) e IL-6 (E) após tratamento nas diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* na ausência (-) e presença (+) de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (100 ng/mL). #Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$. *Não foi possível a quantificação.

Além das citocinas, diferentes quimiocinas também estão envolvidas no processo inflamatório desencadeado pela infecção de *T. cruzi*. Estudos demonstram que CCL2/MCP-1 induzidos por TNF pode aumentar a resposta inflamatória por induzir a produção de IL-1 β e IL-6, e consequentemente, de altos níveis de NO (DAMAS *et al.*, 2001). Outros trabalhos também têm demonstrado que algumas quimiocinas, como por exemplo, RANTES, JE/MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β , podem induzir a produção de NO e

consequentemente a atividade tripanocida dependente do NO pelos macrófagos e miócitos cardíacos (ALIBERT *et al.*, 1999; VILLALTA *et al.*, 1998).

Como informado na dosagem de TNF, não houve alteração na sua produção na presença do óleo em estudo, mesmo após o estímulo inflamatório. Sendo assim, é esperada a manutenção na obtenção de MCP-1 por essa citocina. Este fato pôde ser comprovado ao analisarmos que as quantificações de ambas apresentaram o mesmo perfil, ou seja, o nível de MCP-1 não revelou mudanças quando comparados com os respectivos controles e, portanto, também seria mantido o efeito anti-*T. cruzi* desempenhado por essa quimiocina (Figura 26-C).

A IL-6 é outra importante citocina em respostas inflamatórias agudas que apresenta efeitos locais e sistêmicos, incluindo a indução da síntese hepática de diversos outros mediadores, a estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea e a diferenciação de linfócitos T auxiliares produtores de IL-17 (DUTRA *et al.*, 2014; FRICK, GRÜNEBACH & AUTENRIETH, 2010). No caso da doença de Chagas, esta por sua vez induz a produção de NO a fim de combater o parasito, o que, consequentemente, intensificaria o processo inflamatório. As informações descritas para a citocina TNF e quimiocina MCP-1 corroboram com o encontrado para IL-6, uma vez que esta também não sofreu um aumento na sua produção (Figura 26-E).

Por outro lado, as citocinas IL-10 e TGF- β , ditas supressoras, estão relacionadas à suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* através da inibição da ativação de macrófagos mediada por IFN- γ (DUTRA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2012). Na figura 26-D foi possível observar que o óleo reduziu de forma significativa a obtenção de IL-10 após a adição de LPS+IFN γ . Diante desses resultados, podemos realçar que óleo de *C. densiflorus* não estimula o processo inflamatório, embora também não seja capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por intermédio da citocina reguladora.

A apresentação das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas pode estar relacionada com a resposta imune do hospedeiro, a qual protege contra a disseminação do parasito, em contrapartida, com um potencial de causar lesão (DUTRA *et al.*, 2014; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Estudos prévios já revelaram que o infiltrado inflamatório parece ser mais lesivo para as fibras cardíacas, órgão mais acometido na doença de Chagas, do que para os próprios parasitos (BORGES *et al.*, 2009). Diante desta realidade, seria almejado que o ativo tripanocida utilizado na

terapêutica da doença não demonstrasse perfil pró-inflamatório exacerbado, fato este que pode ser observado nos resultados encontrados em nosso trabalho.

Pesquisas avaliando o perfil anti-inflamatório de espécies do gênero *Cymbopogon* vêm sendo realizadas. Rungqu *et al.* (2016) demonstrou propriedades efetivas dos óleos essenciais de folhas e flores de *C. validus* sobre a inflamação induzida por albumina de ovo fresca. Em adição, a administração oral e a aplicação tópica do óleo de capim-limão (*C. citratus*) também resultaram em atividade anti-inflamatória potente *in vivo* (BOUKHATEM *et al.*, 2014), dado este que foi reproduzido por Gbenou *et al.* (2013) para esta mesma espécie, bem como, para *C. flexuosus* (CHANDRASHEKAR E PRASANNA, 2010) e *C. winterianus* (LEITE *et al.*, 2010).

Estudo feito por Ocheng *et al* (2016) com o objetivo de avaliar o efeito de óleos essenciais sobre mediadores pró-inflamatórios demonstrou que o óleo de *C. nardus* não revelou nenhuma ação sobre a secreção basal de IL-6, IL-8 e PGE₂. Este relato confirma os dados demonstrados anteriormente, em que nenhuma citocina pró-inflamatória sofreu interferência do óleo de *C. densiflorus* após adição de LPS+IFN- γ . No entanto, a secreção de IL-6 induzida por IL-1 β apresentou uma diminuição estatisticamente significativa apenas na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de *C. nardus* em comparação com o controle contendo somente IL-1 β . Apesar dessa diferença, o dado encontrado não representa o esperado, visto que as concentrações inferior e superior testadas não revelaram esse mesmo perfil. No presente trabalho, apenas a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir a concentração de IL-6 na presença do estímulo.

Atividade do capim-limão (*C. citratus*) e citral, principal composto desta espécie, sobre a produção *in vitro* de citocinas antes e depois da incubação com LPS foi reportada por Bachiega e Sforcin (2011). Segundo o autor, todas as concentrações do terpeno inibiram a produção de IL-6 na ausência do estímulo, o que corrobora com os nossos dados. Esse efeito foi reproduzido para o citral após adição de LPS, entretanto, apenas a concentração de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de *C. citratus* e *C. densiflorus*, respectivamente, revelaram mesmo resultado. Em relação à produção de IL-10 na ausência de LPS, nenhuma alteração significativa foi observada para *C. citratus* e *C. densiflorus*, exceto na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para esta última espécie. Por outro lado, redução na obtenção dessa citocina foi encontrada para o citral em concentrações

superiores a 25 µg/mL. Esta ação foi mantida para este composto e ambas as espécies após adição do estímulo inflamatório. Estes resultados indicam, portanto, que o óleo de *C. densiflorus* apresenta um efeito sobre a inflamação próxima ao composto isolado.

Concentrações do óleo de *C. martinii* e geraniol não mostraram efeitos citotóxicos sobre monócitos humanos, assim como, não afetaram a produção de TNF, fato que também pôde ser observado em nosso estudo. Por outro lado, os tratamentos utilizando *C. martinii* e geraniol aumentaram a produção de IL-10, exercendo, assim, uma ação anti-inflamatória (ANDRADE *et al.*, 2014), resultado este que não foi encontrado para a espécie *C. densiflorus*.

Outro dado já descrito é a inibição da síntese de mediadores inflamatórios envolvidos na migração celular, tal como TNF, pelo citrônio. Este composto é um álcool monoterpênico prevalente em espécies como *C. citratus* e *C. winterianus*, o qual de forma similar foi capaz de diminuir a produção de NO (BRITO *et al.*, 2012b). Resultado semelhante foi demonstrado por Francisco *et al.* (2013) para o extrato de *C. citratus*, em que tanto a citocina TNF quanto a quimiocina CCL5 tiveram seus níveis reduzidos.

Em adição, infecções causadas por microrganismos, como *Candida albicans*, provocam aumento significativo de citocinas inflamatórias, TNF e IL-1β. Tratamento com óleo essencial de *C. nardus* mostrou níveis reduzidos destes marcadores inflamatórios comparados com animais não tratados, indicando, portanto, redução da infecção, bem como, da progressão da cicatrização e reparação (KANDIMALLA *et al.*, 2016).

Tsai *et al.* (2011) também determinou a ação anti-inflamatória de *C. martinii*, a qual reprimiu a ação enzimática de 5-LOX. Além disso, o ensaio de secreção de citocinas pró-inflamatórias a partir da dosagem de TNF, IL-1β e IL-8 não exibiu nenhuma diferença notável quando comparado com o controle negativo, corroborando com os nossos dados. Por outro lado, essas citocinas foram reduzidas significativamente pelo óleo após a estimulação por LPS, o que não está de acordo para a espécie *C. densiflorus*. Similarmente, extrato hidroetanólico de *C. citratus* mostrou uma redução significativa na geração de TNF (TIWARI, DWIVEDI & KAKKAR, 2010). Estes achados informam, portanto, que apesar de pertencerem ao mesmo gênero, essas espécies reproduziram respostas sobre TNF de forma distinta.

4.1.3. Dosagem de óxido nítrico

Durante o curso da infecção por *T. cruzi* e desenvolvimento da doença, espécies reativas podem ser produzidas como consequência da destruição de tecidos causados por secreções tóxicas do parasito, reações citotóxicas imunomediadas e danos secundários às mitocôndrias (GUPTA, WEN & GARG, 2009). Dessa forma, a dosagem de NO se revela importante como indicativo de um possível desequilíbrio oxidativo e, por conseguinte, determinante na patogênese do paciente chagásico.

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito para cada amostra a partir da equação da reta revelada pelo padrão nitrito de sódio ($y = 8,5938x + 0,0389$, $R^2 = 0,9972$), bem como, a análise intracelular deste radical através do reagente fluorescente DAF2-DA. Na figura 27 estão apresentados os resultados dos níveis de NO para as concentrações de óleo essencial de *C. densiflorus* que obtiveram viabilidade celular superior a 60% na ausência ou presença de LPS+IFN- γ e os respectivos controles. Observa-se que não houve diferença entre o controle e os tratamentos que não foram estimulados quanto à resposta inflamatória. Entretanto, ao compararmos o controle positivo e as amostras contendo LPS+IFN- γ , foi possível constatar redução estatisticamente significativa deste reativo em ambas as metodologias. Dessa forma, pode-se inferir que este óleo essencial não promove um processo inflamatório nas concentrações testadas, ao passo que também é capaz de minimizar a inflamação estabelecida, uma vez que reduz a concentração de NO e conseqüentemente a resposta pró-inflamatória. Além disso, esse resultado também pode sugerir um possível poder redutor deste óleo no desequilíbrio oxidativo.

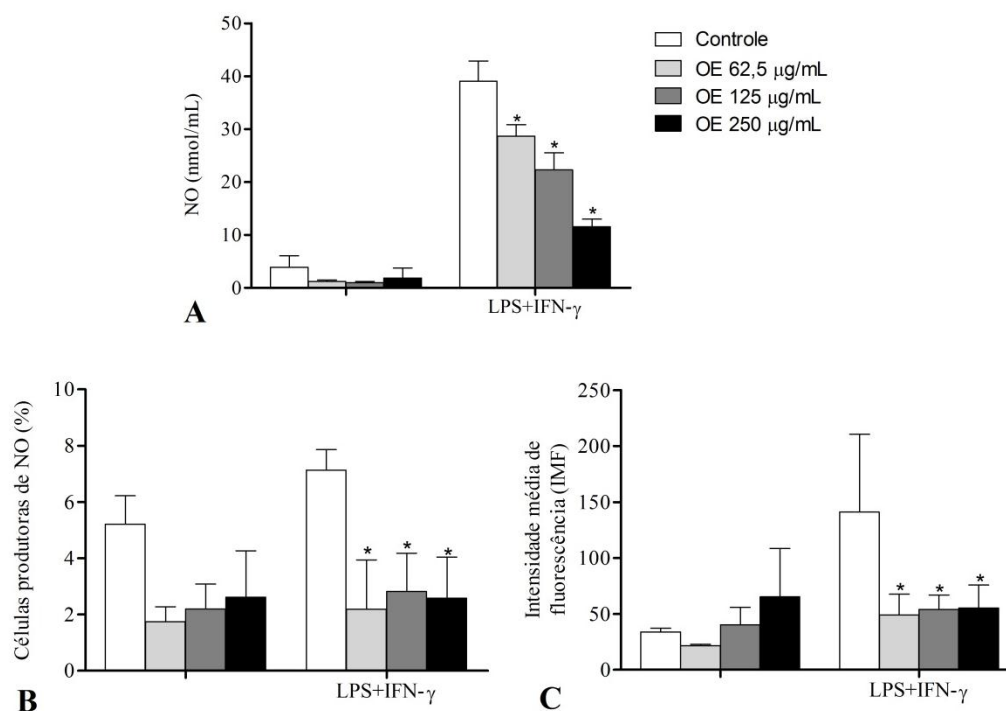


Figura 27: Dosagem de óxido nítrico (NO) a partir do método de Griess (A), porcentagem de células produtoras de óxido nítrico (B) e intensidade média de fluorescência (C) através da citometria de fluxo, após tratamento de macrófagos J774 com diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* na ausência (-) ou presença (+) de LPS (5 µg/mL) + IFN- γ (100 ng/mL). *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$.

Dentre as características da fase aguda da doença de Chagas é possível observar uma elevada parasitemia juntamente com um intenso processo inflamatório, o qual é promovido como um mecanismo de defesa do próprio hospedeiro. Dessa forma, a destruição das formas tripomastigotas na fase aguda da infecção é dependente, além de outros fatores, da produção de NO que é catalisado pela enzima iNOS (LIEKE *et al.*, 2006).

Entretanto, o NO, através do seu potencial oxidativo, pode ter um papel maléfico na patogênese da doença de Chagas. Concentrações excessivas deste composto têm efeitos nocivos devido a sua atividade pró-inflamatória, causando, por exemplo, a perda de neurônios do plexo mientérico durante a fase aguda, o que posteriormente pode estar relacionado com o megaesôfago na fase crônica da doença (ARANTES *et al.*, 2004). Além disso, estudos também demonstraram que níveis elevados de NO provocam dano no DNA das células do coração e baço, levando a destruição das mesmas (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Sendo assim, na fase crônica a parasitemia é subpatente, devido ao controle da proliferação do parasito pelo sistema imune. Em contrapartida, as sequelas das lesões desenvolvidas na fase inicial da doença podem ter consequências patofisiológicas, principalmente no sistema cardíaco e digestivo. Há evidências crescentes que sugerem que a miocardite chagásica é resultado de lesões induzidas por estresse oxidativo sustentado que podem contribuir para a progressão da doença (GUPTA, WEN & GARG, 2009).

Neste contexto, intervenções que reduzam a geração ou os efeitos de espécies reativas podem exercer um papel benéfico na prevenção ou detenção dos danos oxidativos (GUPTA, WEN & GARG, 2009). Com isso, devem ser considerados o tratamento específico (erradicação do parasito) e o tratamento sintomático (manejo de lesões e distúrbios produzidos pela parasitose), sendo ambos igualmente importantes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas. Esta perspectiva pode ser em partes, observada para o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus*, o qual, além de reduzir os níveis de NO e possivelmente os danos por ele causado, também foi capaz de manter seu efeito tripanocida, no entanto, por um mecanismo não dependente deste composto.

Mamani-Matsuda *et al.* (2004) reportaram o efeito da quercetina na Tripanosomíase Humana Africana (THA) causada pelo parasito *T. brucei*. A atividade desse flavonoide, que é facilmente extraído de diversas plantas, foi observada como devido não apenas a sua ação tripanocida direta, mas também a uma diminuição da resposta pró-inflamatória das células hospedeiras (diminuição do TNF e síntese de NO em macrófagos humanos ativados).

Tsai *et al.* (2011) avaliou o potencial do óleo de *C. martinii* em sequestrar radicais através de metodologias variáveis, DPPH, β -caroteno e NO, encontrando valores de CI_{50} equivalentes a 51,42; 0,99 e 56,93 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Isto quer dizer que atividades antioxidantes não são comparáveis quando sistemas de ensaios diferentes são usados. Esta afirmativa está de acordo para os nossos achados, uma vez que foi possível observar uma redução significativa de NO pelo óleo de *C. densiflorus*, embora os dados encontrados por Seibert *et al.* (2019) para o teste de DPPH não tenham sido satisfatórios ($CI_{50} = 14,6 \text{ mg/mL}$).

Em adição, Alitonou *et al.* (2006) pesquisou concomitante a atividade anti-inflamatória e antioxidante do óleo de *C. giganteus*, encontrando valores de CI_{50} 40 ppm

e 1,18g/L, respectivamente. Mesmo que esta atividade antiradical observada seja fraca, sua combinação com o efeito anti-inflamatório significativo poderia explicar as atividades interessantes descritas para esta espécie botânica na medicina tradicional, em particular no tratamento de doenças da pele. Citral é um aldeído isomérico de neral e geranial, majoritadamente encontrado no capim-limão (*C. citratus*), o qual, segundo Lee *et al.* (2008), foi capaz de inibir de forma significativa a produção de (NO) induzida por LPS. Efeito semelhante foi comprovado por Tavares *et al.* (2015), Francisco *et al.* (2011), Figueirinha *et al.* (2010) e Tiwari *et al.* (2010) após adição do extrato hidroetanólico, infusão ou extrato aquoso obtidos através da hidrodestilação de *C. citratus*, corroborando com o presente estudo.

Em humanos, a gravidade da doença cardíaca foi correlacionada com altos níveis plasmáticos de TNF e NO. O nível de NO também foi aumentado em indivíduos indeterminados em comparação com controles saudáveis. Apesar de estes oxidantes reativos serem importantes para o controle do *T. cruzi*, os mesmos podem provocar toxicidade aos componentes celulares dos hospedeiros (GUPTA, WEN & GARG, 2009). No entanto, essa problemática seria minimizada com o uso do óleo de *C. densiflorus*, uma vez que este, embora não tenha demonstrado efeito sobre as citocinas pró-inflamatórias, foi capaz de reduzir a concentração desta espécie reativa sugerindo, assim, que seu efeito tripanocida não é dependente das citocinas dosadas, bem como, um menor dano causado pelo estresse oxidativo seria esperado.

4.1.4. Dosagem de espécies reativas de oxigênio

Relatórios recentes mostraram que a apoptose induzida em *T. cruzi* envolve disfunção mitocondrial que causa um aumento na formação de O₂ e leva a condições de estresse oxidativo celular, o qual desencadeia o início das reações de morte celular programada (DESOTI *et al.*, 2012; PIACENZA *et al.*, 2007). Além disso, níveis de antioxidantes diminuídos (GPx e SOD) foram correlacionados com aumento nos níveis de TNF e NO em pacientes humanos. Todas estas observações sugerem que uma resposta antioxidante não é suficientemente ativada para eliminar as ERO durante a doença chagásica progressiva. O dano oxidativo agudo, portanto, parece ser um efeito espectador de respostas inflamatórias suscitadas por *T. cruzi*, e pode ocorrer em todos os tecidos musculares (GUPTA, WEN & GARG, 2009).

Para avaliar se o óleo essencial de *C. densiflorus* poderia afetar o estado redox intracelular, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo usando a sonda DCFH-DA. Esta sonda não é fluorescente até que seja hidrolisada pela estearase intracelular e prontamente oxidada à diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente na presença de ERO (PUENTE *et al.*, 2019). Interessantemente, nenhuma diferença estatística foi observada para a porcentagem de células produtoras de ERO, bem como, para a intensidade média de fluorescência (IMF) após adição do óleo essencial em relação ao controle de células não tratadas, tanto na ausência quanto na presença do estímulo inflamatório LPS + IFN- γ (Figura 28).

Segundo Sinha *et al.* (2014), análises do óleo essencial de *C. martini* (Palmarosa) e *C. winterianus* (Citronela java) indicou a presença de geraniol como o componente majoritário. Análises da ação dessas espécies, bem como, do monoterpene sobre a geração de ERO não indicaram mudança alguma em comparação com o controle para palmarosa e seu terpeno, o que está de acordo com o presente estudo. No entanto, um aumento significativo na geração desses radicais foi encontrado para citronela. Este efeito elevado também foi relatado para o capim-limão (*C. citratus*) e seu principal constituinte, o citral. Contudo, estudo *in vivo* realizado por Li *et al.* (2018) demonstrou que os tratamentos com *C. flexuosus* ou citral reduziram o estresse oxidativo, assim como, o observado por Tiwari, Dwivedi e Kakkar (2010) para *C. citratus*.

Adicionalmente, deoximikanolido, lactona sesquiterpênica isolada a partir de *Mikania micrantha* e *M. variifolia*, não afetou o estado redox intracelular (PUENTE *et al.*, 2019). De forma semelhante, nenhuma alteração na produção de EROs foi observada para soulamarina, cumarina obtida através de *Calophyllum brasiliense* (REA *et al.*, 2013). Em outro trabalho, a pré-incubação com ciclosporina A reduziu significativamente a produção de ERO quando foi adicionado H₂O₂ na cultura de parasitos para induzir o estresse oxidativo (BUSTOS *et al.*, 2015). Todos esses relatos corroboram com os nossos achados e confirmam a existência de substâncias eficazes contra o parasito sem que haja um aumento do estresse oxidativo durante a infecção.

Em contraste, um aumento de mais de 90% de células positiva para DCF-DA foi verificado após adição de um derivado da β -lapachona sobre epimastigotas (ANJOS *et al.*, 2016). Similarmente, o tratamento com lactonas sesquiterpênicas obtidas a partir de

Ambrosia spp. induziu o aumento da fluorescência desse marcador em epimastigotas (SÜLSEN *et al.*, 2016), assim como, o sesquiterpeno extraído de *Drimys winter*, em que foi observado uma elevação dose-dependente na produção de EROs em comparação com os protozoários não tratados (BOMBAÇA *et al.*, 2018). Estes resultados estão de acordo com os estudos feitos com o (-)-elatol, sesquiterpeno obtido através de microalgas vermelhas *Laurencia dendroidea* (DESOTI *et al.*, 2012), bem como, o citronelal, um dos monoterpenos majoritários do gênero *Cymbopogon* (SINGH, FATIMA & HAMEED, 2016). Segundo Phillion *et al.* (2017), extratos do capim-limão (*C. citratus*) também provocaram efetivamente um aumento na porcentagem de radicais livres oxigenados.

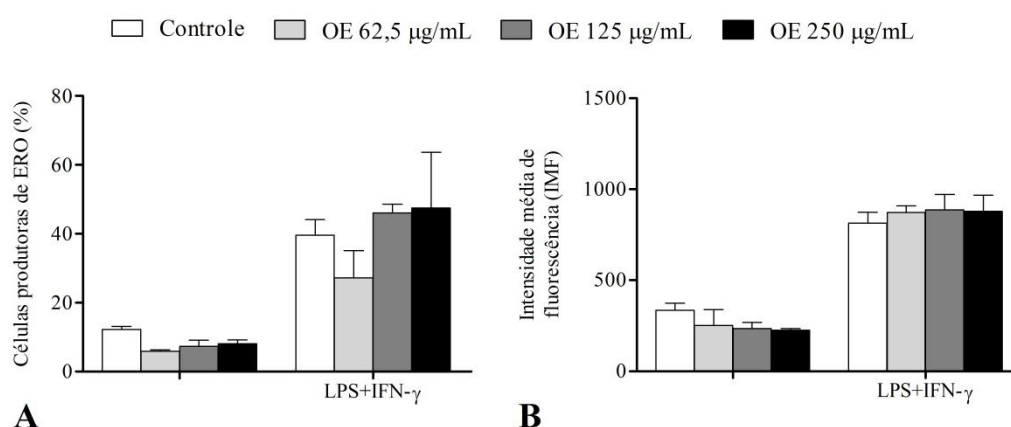


Figura 28: Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento de macrófagos J774 com diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* na ausência (-) ou presença (+) de LPS (5 µg/mL) + IFN- γ (100 ng/mL) a partir da citometria de fluxo. A – Porcentagem de células produtoras de óxido nítrico e B – Intensidade média de fluorescência. #Diferença estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$.

Além disso, os tripanosomatídeos contêm uma mitocôndria única que está associada às defesas antioxidantes rudimentares do parasito, tornando essa organela e moléculas oxidativas alvos interessantes para a intervenção terapêutica. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é um ponto de verificação crucial para processos redox, representando uma das principais fontes de ERO no parasito (MENNA-BARRETO *et al.*, 2014; SOEIRO *et al.*, 2011). Segundo Andreu *et al.* (2011), derivado do ácido cinâmico induziu diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o qual está associado ao aumento da produção intracelular de ERO. O efeito tripanocida de naitofuranquinonas também foi associado a uma disfunção mitocondrial, levando a uma geração de ERO elevada (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009b). No entanto, uma

ação nessa organela acarretaria um desnível no balanço redox e consequentemente danos tanto no parasito quanto nas células de mamíferos.

Em adição, a peroxidação lipídica é uma consequência clássica do aumento das quantidades de ERO celulares, o que também pode levar à ruptura da membrana plasmática (MENNA-BARRETO *et al.*, 2015). Contudo, já foi proposto que uma alteração da permeabilidade da membrana plasmática induzida por um fármaco não é necessariamente acompanhada por alterações da função mitocondrial e, consequentemente, elevação dos níveis ERO (REA *et al.*, 2013). Segundo Vercesi *et al.* (1991), a digitonina, glicosídeo natural obtido da *Digitalis* sp., demonstrou aumentar a permeabilidade da membrana plasmática no *T. cruzi*, sem afetar a mitocôndria. Todos esses fatos esclarecem, portanto, a ação do óleo na superfície da membrana de forma concomitante a ausência de efeito sobre a geração de ERO, sugerindo que o mesmo atue por uma via independente de espécies reativas como consequência de um dano na membrana mitocondrial e que a inibição da biossíntese do ergosterol ainda é o provável alvo de ação.

Por outro lado, estudos recentes também vêm demonstrando permeabilização da superfície plasmática, bem como, despolarização do potencial da membrana mitocondrial, no entanto, sem acarretar no aumento dos níveis ERO (ALEXANDRE *et al.*, 2017). Esta afirmação pôde ser comprovada por Phillion *et al.* (2017), em que o extrato do chá branco (*Camellia sinensis*) provocou uma disfunção mitocondrial, embora nenhum aumento na produção desses radicais tenha sido observado. Dito isto, é possível que uma substância leve a danos à mitocôndria sem consequência de um estresse oxidativo, sendo esta ação de grande valia na descoberta de novas terapias tripanocida, uma vez que seria mais segura às células de mamíferos. Como descrito anteriormente, nenhum efeito foi demonstrado para óleo essencial de *C. densiflorus* sobre a geração de ERO, indicando, portanto, que este ativo não age sobre a membrana mitocondrial, apesar de que estudos posteriores devam ser efetuados para confirmar esse relato.

A partir desta observação associada com os resultados obtidos na análise *in silico* para os compostos majoritários deste óleo essencial, também é possível propor que a inibição da proteína dissulfeto redutase (Glutathione) não seja o mecanismo responsável pelo efeito antiproliferativo do parasito. Embora esta propriedade tenha

apresentado os maiores valores quando comparados com as outras ações biológicas, não foi observado um aumento na produção de radicais oxigenados após tratamento com o óleo, indicando, assim, a manutenção funcional da glutatona.

4.1.5. Avaliação da expressão da enzima iNOS

Sabe-se que citocinas como IFN- γ , TNF e IL-12 ativam direta ou indiretamente o principal mecanismo de controle da proliferação intracelular do parasito, o qual ocorre através da geração de NO. Este radical é produzido pela isoforma induzível de NO sintase em resposta a IFN- γ e em sinergismo com TNF (BORGES *et al.*, 2009; PAVANELLI, 2008). Sendo assim, a indução da iNOS é regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2000) e negativamente por citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β (VODOVOTZ, 1997) e a IL-10 (MOORE *et al.*, 2001). Além disso, complexos imunes, produtos virais e microbianos também induzem a iNOS (MOORE *et al.*, 2001; DINARELLO, 2000).

Ao contrário do efeito na produção de ERO, uma redução significativa nos níveis de NO foi relatada, sugerindo, dessa forma, que o óleo essencial de *C. densiflorus* atue especificamente nessa molécula nitrogenada durante o processo de estresse oxidativo gerado pela condição inflamatória da doença de Chagas. Diante desses relatos, avaliou-se a expressão da enzima iNOS e foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na sua intensidade de fluorescência em relação as células não tratadas na presença do estímulo inflamatório (Figura 29). Adicionalmente, nenhuma diferença foi encontrada entre o tratamento e as células não estimuladas, confirmando, assim, que o óleo não induziu a expressão de iNOS, bem como, foi capaz de reduzir a produção de NO a partir da inibição dessa enzima.

Em concordância aos resultados descritos para a produção de NO, células tratadas com a infusão e o extrato aquoso obtido após hidrodestilação de *C. citratus* também revelaram inibição da expressão de iNOS induzida por LPS (TAVARES *et al.*, 2015; FRANCISCO *et al.*, 2011; FIGUEIRINHA *et al.*, 2010). Estudo feito por Yu, Yan e Sun (2017) reproduziu este resultado para o D-limoneno, um monoterpene presente em numerosas plantas, incluindo *C. densiflorus*. Outros compostos naturais também vêm demonstrando ação modulatória negativa sobre a expressão desta enzima, como o carvacrol, derivado dos gêneros *Origanum* e *Thymus* (BARNWAL *et al.*, 2018;

XIAO *et al.*, 2017), bem como, 4-O-metilbenzoilpaeoniflorino, isolado de *Paeonia lactiflora* (BI *et al.*, 2017).

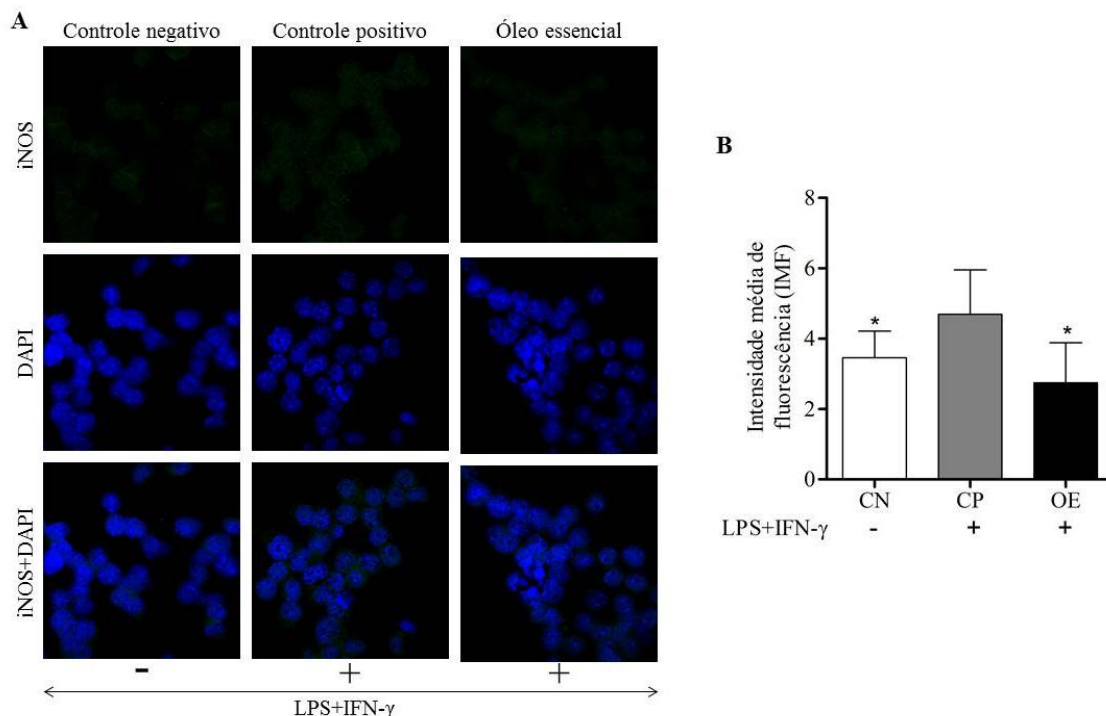


Figura 29: Análise da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos J774 na ausência (CN - controle negativo) ou presença (CP - controle positivo) de LPS (5 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) após tratamento com óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (250 µg/mL). A – Imagens obtidas através da microscopia confocal e B – Intensidade média de fluorescência obtida através do software *Image J*. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$.

O fator de transformação de crescimento (TGF-β) inibe a expressão de iNOS através dos mecanismos de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução (VODOVOTZ *et al.*, 1993). Já a IL-10 inibe a via dependente de arginina que leva a síntese do NO (OSWALD *et al.*, 1992), a qual, provavelmente, não é o alvo de ação, uma vez que esta citocina foi reduzida após adição do óleo essencial.

Posto isto, a expressão de citocinas pró-inflamatórias é principalmente regulada pela via NF-κB. Este fator nuclear leva a fosforilação da proteína inibitória κB (IκB) pela quinase IκB, com subsequente ubiquitinação e degradação pelo sistema de ubiquitina-proteasoma. Esta degradação permite uma translocação rápida do NF-κB para o núcleo e a transcrição de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e iNOS (VITIELLO *et al.*, 2012). De acordo com Francisco *et al.* (2013), o extrato de *C. citratus* manteve a fosforilação de IκB e inibiu sua degradação, sugerindo ação

inibitória sobre este fator. Este efeito havia sido demonstrado anteriormente por este mesmo autor (FRANCISCO *et al.*, 2011), no entanto, além da via NF- κ B, *C. citratus* inibe seletivamente a produção de NO através das cascatas de sinalização pró-inflamatórias p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) e JNK 1/2 (*C-Jun NH2-Terminal Kinase*). Adicionalmente, segundo Lee *et al.* (2008), o citral, aldeído isomérico de neral e geranial encontrado em *C. citratus*, inibiu eficazmente a atividade transcricional e a expressão de iNOS, suprimiu potentemente a atividade de ligação ao DNA e a translocação nuclear de NF- κ B, bem como, a fosforilação de I κ B. Estes resultados sugerem que este terpeno é um anti-inflamatório potente e seus efeitos podem ser devido à inibição da produção de NO através da supressão da ativação de NF- κ B, possibilidade esta que também poderia ser aplicada ao óleo de *C. densiflorus*.

4.1.6. Avaliação da expressão da enzima COX-2

Os papéis da COX-2 e da PGE2 durante as infecções desencadeadas pelo *T. cruzi* são amplamente discutidos na literatura, já que ambos são mencionados como indutores da imunossupressão observada na fase aguda da doença de Chagas, favorecendo a persistência do parasita em células hospedeiras (PINGE-FILHO *et al.*, 1999). Em contrapartida, os inibidores de COX-2 diminuíram a internalização do *T. cruzi* nos macrófagos peritoneais de camundongos e, ao mesmo tempo, aumentaram a expressão de IL-1 β e nitrito, demonstrando a potencial ação desta enzima em favorecer a infecção pelo parasito por modulação negativa dos mediadores pró-inflamatórios (MALVEZI *et al.*, 2014).

Assim como encontrado para a enzima iNOS, a expressão de COX-2 apresentou redução estatisticamente significativa quando comparada com as células não tratadas na presença do estímulo inflamatório (Figura 30). Por outro lado, nenhuma diferença foi demonstrada entre o tratamento e as células não estimuladas, indicando, assim, que o óleo não induziu a expressão desta ciclo-oxigenase, bem como, foi capaz de reduzir sua atividade enzimática.

Diversos relatos na literatura já comprovam a ação de produtos naturais na modulação de enzimas inflamatórias. D-limoneno é um monoterpene encontrado em espécies vegetais variadas como do gênero *Cymbopogon* e demonstrou ser efetivo na redução dos níveis de expressão para COX-2 e, conseqüentemente para produção de

PGE2 (YU, YAN & SUN, 2017). Outros terpenos como carvacrol (BARNWAL *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2017) e álcool perílico (TABASSUM *et al.*, 2015) também suprimiram efetivamente a atividade enzimática desta ciclo-oxigenase. Os resultados do estudo feito por Li *et al.* (2016) indicaram que α -pineno, linalol e 1-octanol contribuem para a atividade anti-inflamatória do óleo de *Boswellia carterii* por meio da inibição da expressão de COX-2.

Em contrapartida, trabalho realizado por Francisco *et al.* (2011) revelou que o extrato de *C. citratus*, assim como, suas frações ricas em polifenóis não afetaram a expressão de COX-2 induzida por LPS em macrófagos. Além disso, foi avaliada a atividade inibitória desta enzima para 16 iridoides isolados de quatro espécies (*Penstemon barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* e *Vitex mollis*), no entanto, apenas a loganina exibiu ação contra COX-2 (RAMÍREZ-CISNEROS *et al.*, 2015).

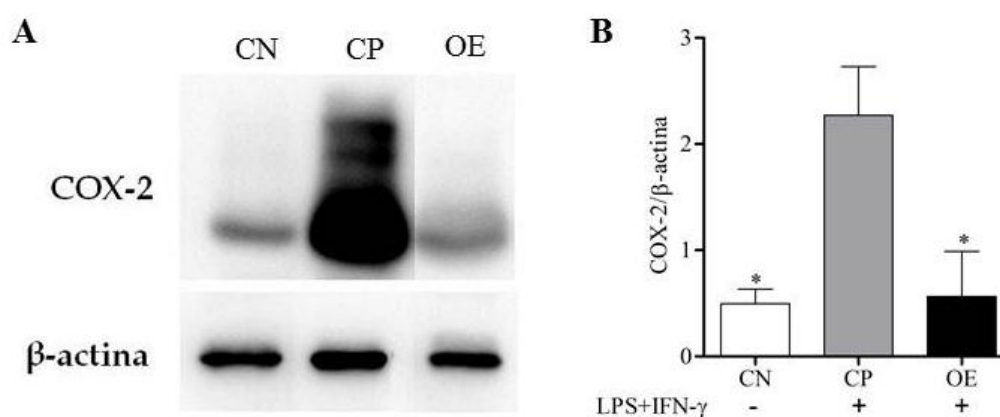


Figura 30: Análise da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) em macrófagos J774 na ausência (CN - controle negativo) ou presença (CP - controle positivo) de LPS (5 μ g/mL) + IFN- γ (100 ng/mL) após tratamento com óleo essencial (OE) de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (250 μ g/mL). A – Imagens obtidas através do gel de Western blot e B – Gráfico da razão COX-2/ β -actina. *Diferença estatística em relação ao controle positivo, $p < 0,05$.

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs - *Peroxisome proliferator-activated receptors*) são membros de uma família de receptores nucleares de fatores de transcrição dependente de ligantes. A subfamília PPAR compreende três isotipos, PPAR α , β/δ e γ que desempenham diversos papéis no metabolismo de lipídios e carboidratos, proliferação e diferenciação celular e inflamação (SONODA, PEI & EVANS, 2007). Um metabólito da prostaglandina PGE2 tem sido identificado como um ligante natural potente para PPAR γ (FORMAN *et al.*, 1995), suprimindo a expressão de COX-2 estimulada por LPS em macrófagos. Esta ação é, portanto, regulada por um

processo de retroalimentação (*feedback*) negativa (INOUE, TANABE & UMESONO, 2000). Carvacrol, extraído do óleo essencial de *Thymus vulgaris*, foi identificado como um supressor da expressão desta enzima inflamatória e um ativador de PPAR α e γ (HOTTA *et al.*, 2010), sendo este resultado reproduzido pelo óleo de *C. citratus* e seu componente majoritário, citral (KATSUKAWA *et al.*, 2010). Sendo assim, é esperado que os monoterpenos presentes no óleo em estudo revelem seu potencial sobre COX-2 como consequência de sua atuação neste receptor.

Todos esses prévios resultados sugerem que, em adição ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática do parasito, o óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* também exerceu um efeito direto na redução do óxido nítrico, bem como, na expressão das enzimas iNOS e COX-2, embora a geração de citocinas pró-inflamatórias analisadas não tenha sido alterada. Com isso, pode-se indicar que este óleo apresenta ações tripanocida e anti-inflamatória, sendo vantajoso seu uso na melhora da patogênese chagásica.

4.2. Avaliação *in silico* da atividade anti-inflamatória

4.2.1. Atividade anti-inflamatória

Diante das análises anteriores, foi possível sugerir que o óleo essencial de *C. densiflorus* apresenta atividade anti-inflamatória, uma vez que os níveis de NO foram reduzidos, bem como, a expressão das enzimas iNOS e COX-2. No entanto, os óleos essenciais são uma mistura natural complexa, contendo diversas substâncias em diferentes concentrações, sendo que um ou dois compostos estão presentes em maior quantidade (BAKKALI *et al.*, 2008). Sendo assim, foi conduzida a análise *in silico* dos constituintes majoritários com o intuito de identificar os compostos deste óleo essencial responsáveis por esse efeito biológico.

Conforme pode ser observado na tabela 16, os compostos *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol demonstraram alto potencial como anti-inflamatório (1), além de uma ação, mesmo que pequena, como agonista de IL-10 (2). Ação de outros terpenos em conter a inflamação também já foi relatada, como D-limone (YU, YAN & SUN, 2017), carvacrol (BARNWAL *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2017), citral (LEE *et al.*, 2008), álcool perílico (TABASSUM *et al.*, 2015), α -pineno, linalol e 1-octanol (LI *et al.*, 2016), o que confirma os resultados encontrados

para a espécie em estudo. Além disso, geraniol demonstrou um efeito estimulatório na produção de IL-10, exercendo, assim, uma ação anti-inflamatória (ANDRADE *et al.*, 2014).

Por outro lado, todas as substâncias mostram ser antagonista de IL-10 (3). Essa citocina anti-inflamatória é importante na regulação da inflamação e apesar de serem baixos os valores, não seria desejável sua inibição. No entanto, este dado está de acordo com os achados do presente trabalho, uma vez que foi demonstrada ação anti-inflamatória do óleo mesmo com o efeito inibitório para esta citocina. Fato semelhante também foi comprovado para o citral, monoterpene majoritário de *C. citratus*, em que foi observado redução de IL-10 após estímulo com LPS (BACHIEGA & SFORCIN, 2011).

Tabela 16: Previsões *in silico* dos potenciais efeitos biológicos e mecanismos de ação anti-inflamatória dos compostos majoritários de óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus*, utilizando a ferramenta PASS online.

Constituinte Folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i>	Potencial efeito biológico e mecanismo de ação							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,086	-	0,034	-	0,161	0,298	0,199	0,100
<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,086	-	0,034	-	0,161	0,298	0,199	0,100
<i>trans-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,587	0,180	0,145	-	0,301	0,305	0,390	0,061
<i>cis</i> -piperitol	0,696	0,118	0,153	0,113	0,207	0,391	0,028	0,280
<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,587	0,180	0,145	-	0,301	0,305	0,390	0,061

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$). 1- Anti-inflamatório; 2- Agonista de Interleucina 10; 3- Antagonista de Interleucina 10; 4- Antagonista de Interleucina 6; 5- Antagonista de Interferon gama; 6- Sequestrador de óxido nítrico; 7- Antagonista de óxido nítrico; 8- Sequestrador de oxigênio.

Valores de baixo potencial foram apresentados em relação ao antagonismo de IL-6 (4) apenas para *cis*-piperitol e no caso de antagonismo de IFN- γ (5) para os isômeros de *p*-menta-2,8-dien-1-ol. Neste último caso, ação moderada foi relatada aos outros compostos. Ambos os efeitos são esperados na atividade anti-inflamatória, porém, resultados prévios não demonstraram que o óleo atuasse sobre essas citocinas. Segundo Bachiega e Sforcin (2011), o monoterpene citral foi capaz de reduzir IL-6 tanto na ausência quanto na presença do estimulador inflamatório. Resultado semelhante para a modulação de IL-6 foi demonstrada após tratamento com D-limoneno (YU, YAN & SUN, 2017), álcool perílico (TABASSUM *et al.*, 2015) e carvacrol (ARISTATILE, AL-ASSAF & PUGALENDI, 2013). Em adição, foi observada a capacidade do timol em reduzir os níveis de IFN- γ em ratos infectados por *Toxoplasma gondii* (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Em relação às espécies reativas, todos os terpenos mostraram números medianos para atuarem como sequestrador de NO (6) e este dado foi reproduzido para os isômeros *p-menta-1(7),8-dien-2-ol* na ação como antagonista de NO (7). No entanto, estes valores foram superiores ao demonstrado para o sequestro de oxigênio (8), fato que está de acordo com o presente estudo, o qual revelou uma redução significativa na geração de NO e manutenção dos níveis de ERO.

Estudo avaliando ação do carvacrol, monoterpene fenólico presente em *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, sobre o processo inflamatório indicaram que este composto inibiu a produção de NO (XIAO *et al.*, 2017), assim como, os resultados encontrados para o citronelol (BRITO *et al.*, 2012b). Adicionalmente, Bi *et al.* (2017) avaliaram a capacidade de sequestrar esse radical de nove monoterpenos isolados de *Paeonia lactiflora* e os resultados mostraram que os derivados de paeoniflorinos e paeonidaninos foram claramente eficientes para esta ação, assim como, na redução dos níveis de IL-6.

Análise do geraniol, componente majoritário de *C. martini* e *C. winterianus*, não indicou nenhuma alteração sobre a geração de ERO, corroborando assim, com o resultado descrito anteriormente. Uma modulação negativa sobre a geração de radicais oxigenados foi demonstrada por Li *et al.* (2018) após tratamento com citral. Por outro lado, *C. citratus* também é rico em citral e tanto a espécie quanto o monoterpene isolado intensificaram a produção desses radicais (SINHA *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi demonstrado para o citronelal, um dos monoterpenos majoritários do gênero *Cymbopogon* e que foi capaz de induzir o estresse oxidativo (SINGH, FATIMA & HAMEED, 2016).

Diante desta análise, foi confirmada a ação sobre a inflamação e a inibição de radicais livres desempenhadas pelos terpenos e pode-se sugerir, então, que os compostos *trans-p-menta-1(7),8-dien-2-ol*, *cis-piperitol* e *cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol* são os principais responsáveis pelo efeito anti-inflamatório demonstrado para o óleo essencial de *C. densiflorus*, sendo esta atividade possivelmente relacionada com o seu potencial em inibir os níveis elevados de NO.

4.2.2. Avaliação da ligação molecular

A avaliação da ligação molecular forneceu vários tipos de ligação entre as principais substâncias do óleo essencial de *C. densiflorus* e as enzimas iNOS e COX-2. Toda a análise foi calculada pelo programa PyRx e as energias relativas foram usadas para determinar a estabilidade relativa.

Na figura 31 estão representados os sítios de ligação entre as enzimas iNOS (A) e COX-2 (B) com os possíveis inibidores. Os principais resultados relacionados à estrutura e energia dos complexos formados entre essas enzimas e os compostos majoritários estão descritos nas tabelas 17 e 18, respectivamente. Quercetina foi utilizada como padrão, uma vez que sua interação com iNOS e COX-2 já é bem elucidada (GOU *et al.*, 2018; LESCANO *et al.*, 2018; SINGH & KONWAR, 2012).

A energia intermolecular dos monoterpenos apresentou valores inferiores ao padrão e, apesar da pequena diferença entre eles, os complexos mais estáveis foram formados a partir dos compostos (a) e (e) (-5,9 kJ/mol) no caso da iNOS (Tabela 17). Já para COX-2 essa interação é ainda mais favorável, uma vez que valores entre -6,1 e -6,4 kJ/mol foram encontrados, sendo os constituintes (c) e (d) os prováveis responsáveis pela inibição dessa enzima (Tabela 18).

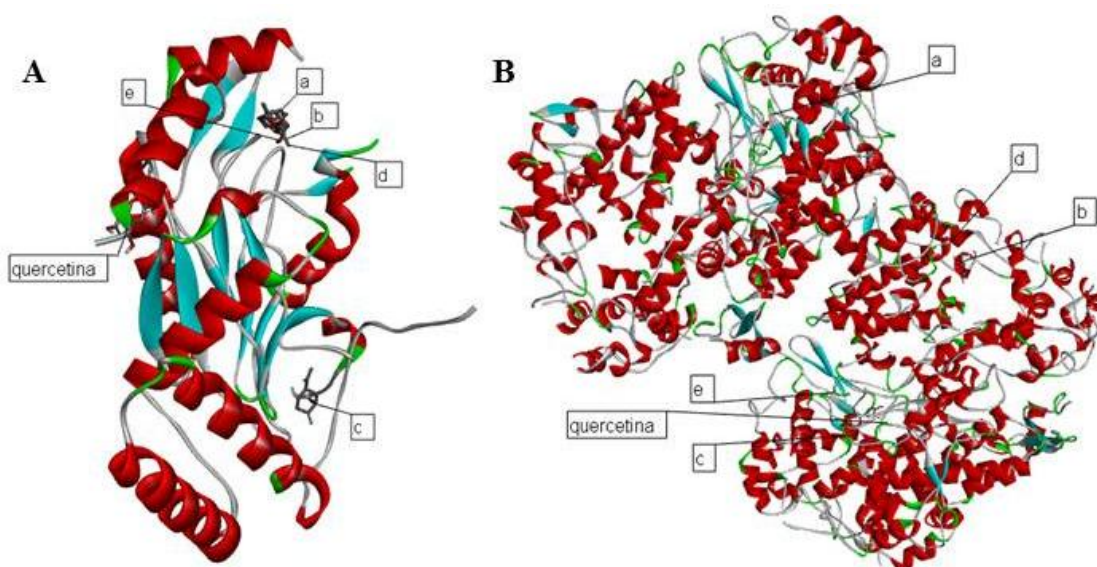


Figura 31: Diagrama 3D demonstrando o sítio de ligação dos compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (A) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (B). a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis*-piperitol.

Tabela 17: Análise da ligação molecular entre os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Ligante	Energia de ligação (kJ/mol)	Interação de H	Interação eletrostática	Interação hidrofóbica
a	-5,9	MET368	-	MET325, TRP340, VAL416, TYR367, PHE420
b	-5,5	MET368	-	VAL416, TYR367, TRP340
c	-5,6	ILE494	-	HIS493, ARG252, PRO489, LYS248
d	-5,6	MET368	-	TRP340, PHE420, TYR367, ILE427, VAL416, LEU417
e	-5,9	TRP340	-	TRP340, VAL416, TYR367
Quercetina	-7,8	LEU203, ASN443, ASN233	LYS439	ASN202

a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis*-piperitol.

Segundo Zhang *et al.* (2012), os resíduos MET368, TRP366, GLY365, TYR367, PHE363, PRO344, GLN257, VAL346, ASN364, MET349, THR370, GLU371 e TYR485 são aminoácidos essenciais para a atividade enzimática da iNOS e uma ação dos inibidores dessa enzima é consistente com a capacidade de alterar a posição desses importantes resíduos. De acordo com a tabela anterior, uma interação com MET368 e/ou TYR367 foi encontrada para todos os compostos, exceto para (c), o que confirma o potencial anti-inflamatório encontrado previamente.

Sendo assim, a combinação da triagem virtual e produtos naturais representa uma poderosa ferramenta para a identificação econômica de moléculas bioativas. Em trabalho feito por Zhong *et al.* (2014), uma abordagem de ligação molecular para identificar inibidores da iNOS a partir de um banco de dados de produtos naturais ou similares foi realizada. Posteriormente, os compostos que apresentaram os valores mais altos nessa triagem foram avaliados *in vitro* quanto ao seu potencial em inibir a produção de NO, o que confirmou a ação predita. Neste contexto, Wang *et al.* (2014) também avaliaram a interação de diferentes compostos naturais e iNOS, indicando alta confiabilidade na reprodução do modo de ligação experimentalmente observado para os inibidores desta enzima. O monoterpeneo α -terpineol é encontrado no óleo essencial de várias espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, sendo caracterizado pela sua habilidade em inibir COX-2 e modular os níveis de NO. Estudo da ligação molecular entre esse composto e a enzima iNOS foi conduzido e foram encontrados valores de energia de ligação próximos a fármacos já conhecidos pela ação inibitória dessa enzima, como dexametasona e L-NAME (GOUVEIA *et al.*, 2018).

Tabela 18: Análise da ligação molecular entre os compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* e a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2).

Ligante	Energia de ligação (kJ/mol)	Interação eletrostática	Interação hidrofóbica
a	-6,3	-	VAL291, LEU294
b	-6,1	-	VAL291, HIS207
c	-6,4	-	VAL291, LEU294
d	-6,4	-	VAL291, LEU294, HIS207
e	-6,2	-	ARG43, ARG469, LEU152, LYS468, PRO153
Quercetina	-9,5	ASP125, ARG469	ARG43

a) *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol; b) *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol; c) *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; d) *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol; e) *cis*-piperitol.

Ramírez-Cisneros *et al.* (2015) avaliaram diferentes iridóides sobre ação da COX-2, sendo o ácido logânico o mais promissor com inibição acima de 80%. O estudo da ligação molecular entre esse composto e a enzima demonstrou que a interação C4-COOH com os resíduos SER530 e TYR385 de COX-2 podem ser críticos para uma potencial inibição enzimática. TYR385 é conhecida por ser importante na manutenção catalítica de COX-2 e esse tipo de interação também foi demonstrada por Zhang *et al.* (2011). Além disso, os resultados de complexação entre um derivado de genipina e COX-2 revelaram uma ocupação no sítio “R” da enzima, o qual é composto pelos resíduos PHE518, HIS90, ARG513, VAL523 e SER353 (SUN *et al.*, 2016). No entanto, pode-se sugerir que outras regiões também são cruciais para a reprodução desse efeito, uma vez que foi possível observar uma inibição da COX-2, embora essas unidades sejam diferentes das encontradas no presente trabalho. Esta variedade de resíduos foi observada por Shukla *et al.* (2014), os quais demonstraram a interação de mais de 20 compostos naturais com a COX-2 e foi possível observar diferentes tipos de ligações de acordo com o ligante, sendo destacadas as regiões SER516 e TYR371.

Em síntese, os resultados da modelagem molecular do *cis*-piperitol e iNOS estão de acordo com a análise *in silico* da atividade anti-inflamatória descrita anteriormente, indicando seu potencial tanto na inibição da enzima quanto na redução dos níveis de NO. Além deste componente, *trans-p*-menta-2,8-dien-1-ol também seria o responsável por impedir a ação dessa enzima. Por outro lado, os isômeros *p*-menta-1(7),8-dien-2-ol atuariam sobre a COX-2 e juntamente com os outros compostos produziram o efeito anti-inflamatório revelado pelo óleo. Esses resultados reforçam as vantagens do uso de óleos essenciais como princípios ativos, uma vez que sua estrutura complexa permite a

atuação em sítios biológicos distintos e, conseqüentemente a apresentação de diversos efeitos.

No entanto, embora vários estudos reportem extratos e compostos isolados obtidos a partir de plantas e algas com potencial para o tratamento da doença de Chagas, pouco é conhecido sobre seus mecanismos de ação. Sendo assim, nenhum dado na literatura referente ao efeito tripanocida do óleo essencial de *C. densiflorus* e a atividade anti-inflamatória foi encontrado, bem como, a relação das vias envolvidas durante esses processos. Esta realidade justifica a importância do projeto desenvolvido e impulsiona cada vez mais o interesse nesta linha de pesquisa.

5. CONSIDERAÇÕES

Na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* do óleo de *C. densiflorus* não foi possível observar aumento nos níveis de TNF, IFN- γ , MCP-1 e IL-6 entre os controles e tratamentos mesmo após estímulo com LPS+IFN- γ . Em contrapartida, a produção de IL-10 foi reduzida significativamente. Dessa forma, espera-se que o efeito dessas citocinas inflamatórias contra o parasito poderia ser mantido mesmo na presença do fármaco.

Por outro lado, as concentrações de óxido nítrico foram reduzidas significativamente, assim como, a expressão das enzimas iNOS e COX-2. Estes achados sugerem um efeito anti-inflamatório do óleo de *C. densiflorus* independente das citocinas dosadas, bem como, um possível efeito modulador no estresse oxidativo, uma vez que a ação tripanocida não estaria relacionada à presença desses radicais livres.

O estudo *in silico* indicou que os compostos *trans-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol devem ser os principais responsáveis pelo efeito anti-inflamatório demonstrado para o óleo essencial de *C. densiflorus*, o qual ocorre principalmente devido ao seu potencial em inibir os níveis elevados de NO. Além disso, a avaliação da ligação molecular entre os compostos majoritários deste óleo e as enzimas iNOS e COX-2 confirmou a capacidade do óleo em impedir a atividade dessas enzimas.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”

(Jean Cocteau)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 592 p., 2011.
- ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E. L.; SILVA, K. T.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 514–521, 2008.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1688–1713, 2006.
- ABEL, L. C.; RIZZO, L. V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Autoimmunity*, v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.
- ABREU, F. O. M. S.; OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 1277-1282, 2012.
- ABRIATA, J. P.; ELOY, J. O.; RIUL, T. B.; CAMPOS, P. M.; BARUFFI, M. D.; MARCHETTI, J. M. Polyepsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid *in vivo* efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. *Materials Science and Engineering C*, v. 77, p. 1196-1203, 2017.
- ACEVEDO-FANI, A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, v. 47, p. 168-177, 2015.
- ADAMS, M.; ZIMMERMANN, S.; KÜENZI, P.; JULIANTI, T.; HATA, Y.; BRUN, R.; HAMBURGER, M. *In vitro* and *in vivo* activity of cynaropicrin against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Planta Médica*, v. 76, p. 1180, 2010.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils ion trap mass spectroscopy. San Diego: Academic Press Inc., 1989.
- ADEYEMI, O. S.; MOLEFE, N. I.; AWAKAN, O. J.; NWONUMA, C. O.; ALEJOLOWO, O. O.; OLAOLU, T.; MAIMAKO, R. F.; SUGANUMA, K.; HAN, Y.; KATO, K. Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 46, n. 3, p. S86-S94, 2018.
- AGUIAR, R. W. S.; OOTANI, M. A.; ASCENCIO, S. D.; FERREIRA, T. P. S.; SANTOS, M. M.; SANTOS, G. R. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. *The Scientific World Journal*, 2014.
- AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potencial. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, v. 48, p. 171-176, 2006.
- AHUJAA, A.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. *Protium javanicum* Burm. Metanol extract attenuates LPS-induced inflammatory activities in macrophage-like RAW264.7 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2019, p. 1-12, 2019.
- AKHILA, A. Essential oil-bearing grasses: The genus *Cymbopogon*. *Medicinal and aromatic plants - industrial profiles*, v. 46, 2010.
- ALEXANDRE, T. R.; LIMA, M. L.; GALUPPO, M. K.; MESQUITA, J. T.; NASCIMENTO, M. A.; SANTOS, A. L.; SARTORELLI, P.; PIMENTA, D. C.; TEMPONE, A. G. Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 23, n. 30, 2017.
- ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 4819-4826, 1999.
- ALIBERT, J. C.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice and is produced by normal murine macrophage in response to live trypomastigote. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 1961-1967, 1996.

- ALITONOU, G. A.; AVLESSI, F.; SOHOUNHLOUE, D. K.; AGNANIET, H.; BESSIERE, J. M.; MENUT, C. Investigations on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 16, p. 37-41, 2006.
- ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 16, n. 1-4, p. 3-27, 1999.
- ALLOUCHE, J. Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods, in: R. Brayner, F. Fiévet, T. Coradin (Eds.), *Nanomaterials: A Danger or a Promise? A Chemical and Biological Perspective*, Springer, London, p. 27–74, 2013.
- ALMEIDA, T. C.; SEIBERT, J. B.; ALMEIDA, S. H. S.; AMPARO, T. R.; TEIXEIRA, L. F. M.; BARICHELLO, J. M.; POSTACCHINI, B. B.; DOS SANTOS, O. D. H.; DA SILVA, G. N. Polymeric micelles containing resveratrol: development, characterization, cytotoxicity on tumor cells and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019.
- ALMEIDA, F. S. A alelopatia e as plantas. IAPAR, v. 55, 62 p, 1993.
- AMPARO, T. R.; SEIBERT, J. B.; MATHIAS, F. A. S.; VIEIRA, J. F. P.; SOARES, R. D. O. A.; FREITAS, K. M.; CABRAL, V. A. R.; BRANDÃO, G. C.; SANTOS, O. D. H.; SOUZA, G. H. B.; VIEIRA, P. M. A. Anti-inflammatory activity of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler is associated to immunomodulation and enzymes inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 241, 112024, 2019.
- AMPARO, T. R. Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 151 p., 2016.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; GOMES, M. S.; AZEREDO, C. M. O.; BATISTA, L. R.; SOARES, M. J.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.
- ANDRADE, B. F. M. T.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; JÚNIOR, A. F.; SFORCIN, J. M. *Cymbopogon martinii* essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, p. 1491-1496, 2014.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. & KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- ANDRADE, L. O. & ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 819-23, 2005.
- ANDRADE, Z. A. The pathology of Chagas disease in man. *Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale*, v. 65, suppl. 1, p. 15-30, 1985.
- ANDREU, G. L. P.; INADA, N. M.; PELLÓN, R. F.; DOCAMPO, M. L.; FASCIO, M. L.; D'ACCORSO, N. B.; VERCESI, A. E. *In vitro* effect of a new cinnamic acid derivative against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittelforschung*, v. 59, n. 4, p. 207-211, 2009.
- ANEVA, I.; ZHELEV, P.; KOZUHAROVA, E.; DANOVA, K.; NABAVI, S. F.; BEHZAD, S. Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 261, p. 1-15, 2019.
- ANGSHUMAN, B.; BHATTACHARJEE, S. K.; MAHANTA, R.; BISWANATH, M.; BANDYOPADHAYAY, S. K. Alginate based nanoparticles drug delivery for anti HIV drug lopinavir. *Journal of Global Pharma Technology*, v. 2, n. 3, p. 126-132, 2009.
- ANJOS, D. O.; ALVEZ, E. S. S.; GONÇALVES, V. T.; FONTES, S. S.; NOGUEIRA, M. L.; SUAREZ-FONTES, A. M.; COSTA, J. B. N.; RIOS-SANTOS, F.; VANNIER-SANTOS, M. A. Effects of a novel β -lapachone derivate on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy

- and necrosis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 6, p. 207-219, 2016.
- ANWEKER, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A. K. Liposome as drug carriers. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, v. 2, p. 945-951, 2011.
- ANWER, M. K.; JAMIL, S.; IBNOUF, E. O.; SHAKEEL, F. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. *Journal of Oleo Science*, v. 63, p. 347-354, 2014.
- ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *American Journal of Pathology*, v. 164, n. 4, p. 1361-1368, 2004.
- ARAUJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos. *Ciência Animal*, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.
- ARAÚJO, M. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E.; BRENER, Z. A combination of benzimidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 45, p. 819-24, 2000.
- ARISTATILE, B.; AL-ASSAF, A. H.; PUGALENDI, K. V. Carvacrol suppresses the expression of inflammatory marker genes in D-galactosamine-hepatotoxic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 6, n. 3, p. 205-211, 2013.
- ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 6, p. 643-649, 2009.
- ATTAMA, A. A.; MOMOH, M.; BUILDERS, A.; PHILIP, F. Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. In: *Recent Advances in Drug Delivery Systems*, p. 107-140, 2012.
- ATTILI-QADRI, S.; KARRA, N.; NEMIROVSKI, A.; SCHWOB, O.; TALMON, Y.; NASSAR, T.; BENITA, S. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *Proceeding of the National Academy of Science*, v. 110, p. 17498-17503, 2013.
- AZAD, R.; BABU, N. K.; GUPTA, A. D.; REDDANNA, P. Evaluation of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Premna integrifolia* extracts and assay-guided isolation of a COX-2/5-LOX dual inhibitor. *Fitoterapia*, v. 131, p. 189-199, 2018.
- AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; IGBAL, Z.; KHAR, R. K.; AGIL, M.; TALEGAONKAR, S. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 1, p. 69-76, 2009.
- AZEREDO, C. M. O.; SANTOS, T. G.; MAIA, B. H. L. N. S.; SOARES, M. J. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, 309, 2014.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 909-913, 2011.
- BAHNSON, E. S.; KASSAM, H. A.; MOYER, T. J.; JIANG, W.; MORGAN, C. E.; VERCAMMEN, J. M.; JIANG, Q.; FLYNN, M. E.; STUPP, S. I.; KIBBE, M. R. Targeted nitric oxide delivery by supramolecular nanofibers for the prevention of restenosis after arterial injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 24, n. 8, p. 401-418, 2016.
- BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; BENDER, E. A.; FREDDO, R. J.; BRUXEL, F.; HAAS, S. E. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: An update on preparation and biological applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 347-363, 2016.
- BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; DE SOUZA, C. F.; COSSETIN, L. F.; DA SILVA, A. P. T.; GIONGO, J. L.; MONTEIRO, S. G. A nanotechnology based new approach for *Trypanosoma evansi* chemotherapy: *in vitro* and *vivo* trypanocidal effect of (-)-alpha-bisabolol. *Experimental Parasitology*, v. 170, p. 156-160, 2016.

- BALDISSERA, M. D.; DA SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; ZIMMERMANN, C. E.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C.; RECH, V. C.; TONIN, A. A.; GIONGO, J. L.; MATTOS, C. B.; KOESTER, L.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: *in vitro* tests. *Experimental Parasitology*, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.
- BALLIGAND, J. L.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; SIMMONS, W. W.; PIMENTAL, D.; MALINSKI, T. A.; KAPTURCZAK, M.; TAHA, Z.; LOWENSTEIN, C. J.; DAVIDOFF, A. J.; KELLY, R. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 44, p.27580-27588, 1994.
- BANERJEE, J.; DAS, A.; SINHA, M.; SAHA, S. Biological efficacy of medicinal plant extracts in preventing oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, n. 7904349, 2018.
- BANGHAM, A. D.; DE GIER, J.; GREVILLE, G. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 1, p. 225–246, 1967.
- BARBOSA, L. C. S. Morfo-anatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae). Universidade Federal de Goiás, 2007.
- BARICHELLO, J. M.; ROSA, J. S.; SEIBERT, J. B.; ALMEIDA, T. C.; AMPARO, T. R.; TEIXEIRA, L. F. M. T.; SANTOS, O. D. H.; VIEIRA, P. M. A.; SOUZA, G. H. B. Lipossoma contendo óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus*, processo de obtenção, composição farmacêutica e usos. BR 1020170134040, 2017.
- BARNARD, D. R. & XUE, R. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 41, n. 4, p. 726-730, 2004.
- BARNWAL, P.; VAFA, A.; AFZAL, S. M.; SHAHID, A.; HASAN, S. K.; ALPASHREE; SULTANA, S. Benzo(a)pyrene induces lung toxicity and inflammation in mice: prevention by carvacrol. *Human and Experimental Toxicology*, v. 37, n. 7, p. 752-761, 2018.
- BARRADAS, T. N.; SENNA, J. P.; CARDOSO, S. A.; NICOLE, S.; PADULA, C.; SANTI, P.; ROSSI, F.; DE HOLANDA E SILVA, K. G.; MANSUR, C. R. E. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oil for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 116, p. 38-50, 2017.
- BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 21–37, 2003.
- BARROS, L. M.; DUARTE, A. E.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; WACZUK, E. P.; VEGA, C.; LEITE, N. F.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ROCHA, J. B. T.; KAMDEM, J. P. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) essential oil. *Molecules*, n. 21, p. 209, 2016.
- BATISTA, D. D. A. G.; BATISTA, M. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; BRITTO, C. C.; RODRIGUES, A. C.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. Combined treatment of heterocyclic analogues and benzimidazole upon *Trypanosoma cruzi* *in vivo*. *PLoS One*, v. 6, e22155, 2011.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BENÍTEZ, D.; CASANOVA, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Initial studies on mechanism of action and cell death of active N-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. *Parasitology*, v. 141, p. 682-696, 2014.
- BERN, C. An Trypanosomal Therapy for Chronic Chagas Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 34, p. 2527, 2011.
- BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.
- BERRY, G.; BILLINGHAM, M.; ALDERMAN, E.; RICHARDSON, P.; TORTI, F.; LUM, B.; PATEK, A.; MARTIN, F. J. The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS

- Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Annals of Oncology*, v. 9, n. 7, p. 711-716, 1998.
- BEYKI, M.; ZHAVEH, S.; KHALILI, S. T.; RAHMANI-CHERATI, T.; ABOLLAHI, A.; BAYAT, M.; TABATABAEI, M.; MOHSENIFAR, A. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oil in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 310-319, 2014.
- BHAWANA; BASNIWAL, R. K.; BUTTAR, H. S.; JAIN, V. K.; JAIN, N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 5, p. 2056-2061, 2011.
- BI, X.; HAN, L.; QU, T.; MU, Y.; GUAN, P.; QU, X.; WANG, Z.; HUANG, X. Anti-inflammatory effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from *Radix Paeoniae Alba* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Molecules*, v. 22, n. 5, p. 1-9, 2017.
- BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G.; FERNANDES, J. B.; ALBUQUERQUE, S.; MAGALHÃES, C. M.; PAGNOCCA, F. C. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. *Phytomedicine*, v. 8, 121-124, 2001.
- BILATI, U.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E. Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 8, p. 1-9, 2003.
- BLANKSCHTEIN, D.; THURSTON, G. M.; BENEDEK, G. B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. *The Journal of Chemical Physics*, v. 85, p. 7268-7288, 1986.
- BLECHER, K.; NASIR, A.; FRIEDMAN, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, v. 2, n. 5, p. 395-401, 2011.
- BOMBAÇA, A. C. S.; DOSSOW, D. V.; BARBOSA, J. M. C.; PAZ, C.; BURGOS, V.; MENNA-BARRETO, R. F. S. Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*, v. 23, n. 2800, p. 1-14, 2018.
- BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, v. 7, p. 81-89, 1999.
- BONFERONI, M. C.; SANDRI, G.; ROSSI, S.; USAI, D.; LIAKOS, I.; GARZONI, A.; FIAMMA, M.; ZANETTI, S.; ATHANASSIOU, A.; CARAMELLA, C.; FERRARI, F. A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 152, p. 385-392, 2017.
- BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; MENEZES JR., A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S. & LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.
- BORGES, A. R.; AIRES, J. R.; HIGINO, T. M.; MEDEIROS, M. D.; CITÓ, A. M.; LOPES, J. A.; FIGUEIREDO, R. C. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, v.132, p. 123-128, 2012.
- BORGES, C. R. B.; JUNIOR, V. R.; REIS, M. A.; CASTELLANO, L. R.; CHICA, J. E. L.; PEREIRA, S. A. L.; SANTOS, E. S.; RODRIGUES, D. B. R. Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, p. 170-174, 2009.
- BOU, D. D.; TEMPONE, A. G.; PINTO, E. G.; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia syvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*, v. 21, p. 676-681, 2014.
- BOUKHATEM, M. N.; FERHAT, M. A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*, v. 9, p. 25431, 2014.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, v. 161, p. 839-851, 2001.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, M. V.; MAGARACI, F.; LORENTE, S. O.; GILBERT, I.; SOUZA, W. Effects of inhibitors of $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*, v. 11, p. 506-515, 2005.
- BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, v. 435, p. 297-312, 2011.
- BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C.; DE OLIVEIRA-SILVA, J. C.; SIMÕES-SILVA, M. R.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; DE LANA, M. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 4, p. 2067-2075, 2014.
- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, suppl. 1, p. 205-213, 1987.
- BRINKMAN, W. J & XUAN, V. T. *Melaleuca leucadendron*: a useful and versatile tree for acid sulphate soils and some other poor environments. *International Tree Croops Journal*, v. 6, n. 4, p. 261-274, 1991.
- BRITO, D.V.; OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; SERTÃO, W. C.; AGUIAR, R. W. S. Effect of citronella oil, eucalipto and citronellal compound of mycoflora and development of maize plants. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.3, n. 4, p. 184-192, 2012a.
- BRITO, R. G.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; SANTOS, M. R. V.; SOUSA, D. P.; BADAUE-PASSOS, D. Jr.; LUCCA, W. Jr.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; OLIVEIRA, A. P.; QUINTANS, L. J. Jr. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *Journal of Natural Medicines*, v. 66, p. 637-644, 2012b.
- BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, n. 2, p. 54-57, 2002.
- BUCKNER, F.; VERLINDE, C. L. M. J.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 40, p. 2592-2597, 1996.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, p. 367-375, 2007.
- BULBOVAS, P.; RINALDI, M. C. S.; DELITTI, W. B. C. & DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, n. 4, p. 687-696, 2005.
- BURLEIGH, B. A. & ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 175-200, 1995.
- BUSTOS, P. L.; PERRONE, A. E.; MILDUBERGER, N.; POSTAN, M.; BUA, J. Oxidative stress damage in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is inhibited by cyclosporine A. *Parasitology*, v. 142, n. 8, p. 1024-1032, 2015.
- CAPEK, I. Sterically and electrosterically stabilized emulsion polymerization: Kinetics and preparation. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 99, p. 77-162, 2002.
- CARNEIRO, Z. A.; DA S MAIA, P. I.; SESTI-COSTA, R.; LOPES, C. D.; PEREIRA, T. A.; MILANEZI, C. M.; DA SILVA, M. A. P.; LOPES, R. F. V.; SILVA, J. S.; DEFLON, V. M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of H2bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, e2847, 2014.
- CARNESECHI, S.; SCHNEIDER, Y.; CERALINE, J.; DURANTON, B.; GOSSE, F.; SEILER, N.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits a growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, v. 298, n. 1, p. 197-200, 2001.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CASSIANO, D. S. A.; BRANCO, A.; SILVA, T. R. dos S.; SANTOS, A. K. A. Caracterização morfoanatômica de folhas e caules de *Microlicia hatschbachii* Wurdack, Melastomataceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n. 4, p. 529-535, 2010.

- CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R. & LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição de óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.
- CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A.B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.
- CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. & BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, p. 471-479, 2006.
- CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; ALVES, K.; ROCHA, M. V. A. P.; LIMA, C. C.; CECATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, p. 240-247, 2012.
- CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Screening of essential oils' antifungal activity on *Candida* strains. *Recife: Odontologia Clínica-Científica*, v. 10, n.3, p. 243-246, 2011a.
- CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Antifungal activity of three essential oils on *Candida* Strains - - *Revista Odontologia Brasil Central*, v. 20, n. 52, 2011b.
- CDC, Centers for disease control and prevention. DPDx - American Trypanosomiasis. <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acessado em 07 de dezembro de 2016.
- CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Evaluation of benzimidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 40, p. 527-532, 2012.
- CEOLE, L. F.; GRANDHI, H.; VILLAMIZAR, L. H.; SOARES, M. J.; O'SULLIVAN, T. P. Synthesis of novel quinine analogs and evaluation of their effects on *Trypanosoma cruzi*. *Future Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 4, p. 391-408, 2018.
- CERQUEIRA, N. F. & YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- CHACÓN, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMÁN, M.; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.
- CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J. & FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, tomo 1, p. 159-218, 1909.
- CHANDRASHEKAR, K. S. & PRASANNA, K. S. Analgesic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Pharmacognosy Journal*, v. 2, n. 14, p. 23-25, 2010.
- CHANG, C. W.; CHEN, Y. H.; LIN, Y. H.; PENG, W. H. Association of activation of induced COX-2, iNOS and cytokines with NF-kappa β depression by Taiwan wild grape ethanolic extract in mice. *Chinese Journal of Physiology*, v. 60, n. 4, p. 242-252, 2017.
- CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 10, p. 2306-2312, 2014.
- CHEN, C.; YU, Y.; WANG, X.; SHI, P.; WANG, Y.; WANG, P. Manipulation of pH-sensitive interactions between podophyllotoxin-chitosan for enhanced controlled drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 95, p. 451-461, 2017.
- CHENG, Y.; MORSHED, R. A.; AUFFINGER, B.; TOBIAS, A. L.; LESNIAK, M. S. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Advance Drug Delivery Reviews*, v. 66, p. 42-57, 2014.
- CHISOWA, E. H. Chemical composition of flower and leaf oils of *Cymbopogon densiflorus* Stapf from Zambia. *Journal of Essential Oil Research*, v. 9, p. 469-470, 1997.

- CHOPRA, L.; SINGH, G.; JENA, K. K.; SAHOO, D. K. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific Reports*, v. 5, n. 13412, 2015.
- CHU, H.; LIU, N.; WANG, X.; JIAO, Z.; CHEN, Z. Morphology and *in vitro* release kinetics of drug-loaded micelles based on well-defined PMPC-b-PBMA copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 371, n. 1-2, p. 190-196, 2009.
- CLEMONS, K. V.; SOBEL, R. A.; MARTINEZ, M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; STEVENS, D. A. Lack of efficacy of liposomal amphotericin B against acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 4, p. 1141-1146, 2017.
- COIMBRA, M.; ISACCHI, B.; VAN BLOOIS, L.; TORANO, J. S.; KET, A.; WU, X.; BROERE, F.; METSELAAR, J. M.; RIJCKEN, C. J.; STORM, G.; BILIA, R.; SCHIFFELERS, R. M. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 416, n. 2, p. 433-442, 2011.
- COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; SOUSA, C. S.; RIBEIRO, F. L. B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 41, p. 1209-1211, 2006.
- CONTRERAS LANCHEROS, C. A.; PELEGRINO, M. T.; KIAN, D.; TAVARES, E. R.; HIRAIWA, P. M.; GOLDENBERG, S.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M.; PINGE-FILHO, P.; SEABRA, A. B.; YAMADA-OGATTA, S. F. Selective antiprotozoal activity of nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles against *Trypanosoma cruzi*: toxicity and mechanisms of action. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 7, p. 830-839, 2018.
- CORTES, L. A.; CASTRO, L.; PESCE, B.; MAYA, J. D.; FERREIRA, J.; CASTRO-CASTILLO, V.; PARRA, E.; JARA, J. A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. Novel gallate triphenylphosphonium derivatives with potent antichagasic activity. *PLoS One*, v. 10, n. 8, 2015.
- COSTA, C. A. R.; BIDINOTTO, L. T.; TAKAHIRA, R. K.; SALVADORI, D. M. F.; BARBISAN, L. F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 2268-2272, 2011.
- COURA, J. R. & VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465(7301), S6-7, 2010.
- COURA, J. R. & DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, suppl. 1, p. 31-40, 2009.
- COURA, J. R. & DE CASTRO, S. L. Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, suppl. 1, p. 3-24, 2002.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1417-1450, 2006.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M. & LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.
- CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*, v. 80, p. 771-784, 2017.
- CRUCHO, C. I. C. Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine. *ChemMedChem*, v. 10, p. 24-38, 2015.
- CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer*, v. 68, p. 41-46, 2015.
- CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. Natural products from plants. CRC Press - Editora, ed. 2, 632 p, 2006.
- CUI, H.; LI, W.; LI, C.; VITTAYAPADUNG, S.; LIN, L. Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biofouling*, v. 32, n. 2, p. 215-225, 2016.
- CUI, J. Y. F.; HAN, X.; WANG, Y. S.; YANG, L.; YU, Y. W.; LI, Q. P. Study of the preparation of sustained-release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion-solvent-diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil. *Colloids and Surfaces B*, v. 48, p. 35-41, 2006.

- CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, P. C.; NOGUEIRA, L. G.; MADY, C.; LANNI, B.; STOLF, N.; FIORELLI, A.; HONORATO, R.; KALIL, J. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 59-62, 2006.
- CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Médica*, v. 69, p. 470-472, 2003.
- DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes, v. 12, n. 1, p. 134-139, 2007.
- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, v. 1263, p. 243-250, 2015.
- DALWADI, G.; BENSON, H. A. E.; CHEN, Y. Comparison of diafiltration and tangential flow filtration for purification of nanoparticle suspensions. *Pharmaceutical Research*, v. 22, p. 2152-2162, 2005.
- DAMAS, J. K.; AUKRUST, P.; UELAND, T.; ODEGAARD, A.; EIKEN, H. G.; GULLESTAD, L.; SEJERSTED, O. M.; CHRISTENSEN, G. Monocyte chemoattractante protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, v. 96, n. 4, p. 345-52, 2001.
- D'AMBROSIO, D. & SINIGAGLIA, F. Chemokines and their receptors: trafficking cues for Th1 and Th2 cells. *European Cytokine Network*, v. 11, n. 3, p. 495-6, 2000.
- DEAMER, D.; BANGHAM, A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta BBA – Biomembranes*, v. 443, p. 629-634, 1976.
- DE FRIES, R.; MISTUHASHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of Alamar Blue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 9, p. 89-95, 1995.
- DE MELLO, C. G. C.; BRANQUINHO, R. T.; OLIVEIRA, M. T.; MILAGRE, M. M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; LANA, M. D. Efficacy of lychnopholide polymeric nanocapsules after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 9, p. 5215-5222, 2016.
- DE MELO, P. N.; BARBOSA, E. G.; GARNERO, C.; DE CALAND, L. B.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; LONGHI, M. R.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Interaction pathways of specific cosolvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benznidazole in liquid and solid phase. *Journal of Molecular Liquids*, v. 223, p. 350-359, 2016.
- DE MELO, P. N.; BARBOSA, E. G.; DE CALAND, L. B.; CARPEGIANNI, H.; GARNERO, C.; LONGHI, M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Host-guest interactions between benznidazole and beta-cyclodextrin in multicomponent complex systems involving hydrophilic polymers and triethanolamine in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids*, v. 186, p. 147-156, 2013.
- DE MORAIS, F. A. P.; ENUMO, A. JR.; GONÇALVES, R. S.; CESAR, G. B.; MIRANDA, N.; VILSINSKI, B. H.; COMBUCA DA SILVA, R.; VATARU NAKAMURA, C.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Hypericin photodynamic activity. Part III: *in vitro* evaluation in different nanocarriers against trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 18, n. 2, p. 487-494, 2019.
- DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, L. B.; DA SILVA CARDOSO, V.; RODRIGUES, I. A.; DOS SANTOS, E. P.; DA COSTA LEAL RIBEIRO GUIMARÃES, B.; DOS SANTOS CERQUEIRA COUTINHO, C.; VERMELHO, A. B.; JUNIOR, E. R. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology*, v. 28, n. 6, 2017.
- DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 113, p. 146-151, 2014.
- DESOTI, V. C.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; SUDATTI, D. B.; PEREIRA, R. C.; ALONSO, A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, S. O. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Marine Drugs*, v. 10, p. 1631-1646, 2012.
- DETONI, C. B.; DE OLIVEIRA, D. M.; SANTO, I. E.; PEDRO, A. S.; EL-BACHA, R.; DA SILVA VELOZO, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; DE MAGALHÃES CABRAL-

- ALBUQUERQUE, E. C. Evaluation of thermal-oxidative stability and anti glioma activity of *Zanthoxylum tingoassuiba* essential oil entrapped into multi- and unilamellar liposomes. *Journal of Liposome Research*, v. 22, p. 1–7, 2012.
- DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *The Journal of Pathology*, v. 225, n. 4, p. 583-596, 2011.
- DHORM PIMENTEL DE MORAES, A. R.; TAVARES, G. D.; ROCHA, F. J. S.; DE PAULA, E.; GIORGIO, S. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaíba and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. *Experimental Parasitology*, v. 187, p. 12-21, 2018.
- DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Ed. da UNESP: 230p, 1996.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions*, v. 73, p. 1-27, 1990.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. J. Free radical metabolismo of antiparasitic agentes. *Federation Proceedings*, v. 45, p. 2471, 1986.
- DOMAZOU, A.; LUIGI-LUISI, P. Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. *Journal of Liposome Research*, v. 12, p. 205–220, 2002.
- DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, v. 233, p. 106-120, 2016.
- DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Science and Technology*, v. 44, p. 1908-1914, 2011.
- DOS SANTOS-SILVA, A. M.; DE CALAND, L. B.; DE S. L. OLIVEIRA, A. L. C.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, R. F.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; CORNÉLIO, A. M.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Designing structural features of novel benzimidazole-loaded cationic nanoparticles for inducing slow drug release and improvement of biological efficacy. *Materials Science and Engineering C – Materials for Biological Applications*, v. 78, p. 978-987, 2017.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.; MAGALHÃES, L. M. D.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.
- EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, p. 220-243, 2015.
- ELIZONDO, E.; VECIANA, J.; VENTOSA, N. Nanostructuring molecular materials as particles and vesicles for drug delivery, using compressed and supercritical fluids. *Nanomedicine*, v. 7, p. 1391–1408, 2012.
- ESCOBAR, P.; LEAL, S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 184-190, 2010.
- DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Annals of Medicine*, v. 27, n. 3, p. 395-406, 1995.
- FALL, R.; NGOM, S.; SALL, D.; SEMBÈNE, M.; SAMB, A. Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.) and *Melaleuca leucadendron* (Linn.). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, doi: 10.1016/j.apjtb.2017.01.004, 2017.
- FARAG, R. S.; SHALABY, A. S.; EL-BAROTY, G. A.; IBRAHIM, N. A.; ALI, M. A.; HASSAN, E. M. Chemical and biological evaluation of the essential oil of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 30-35, 2004.
- FAÚNDEZ, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; TORRES, G.; MORELLO, A.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLAN, M.; MAYA, J. D. Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in

- a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1837–9, 2008.
- FERNANDES, M. P.; INADA, N. M.; CHIARATTI, M. R.; ARAÚJO, F. F. B.; MEIRELLES, F. V.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; ALVES, M. J. M.; GADELHA, F. R.; VERCESI, A. E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 42, p. 69-78, 2010.
- FERRAZ, L. R. M.; ALVES, A. É. G.; NASCIMENTO, D. D. S. D. S.; AMARIZ, I. A. E.; FERREIRA, A. S.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, Á. A. N.; ROLIM-NETO, P. J. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benzimidazole. *Acta Tropica*, v. 185, p. 127-132, 2018.
- FERREIRA, R. G.; MATSUI, T. C.; GODIN, A. M.; GOMIDES, L. F.; PEREIRA-SILVA, P. E. M.; DUARTE, I. D. G.; MENEZES, G. B.; COELHO, M. M.; KLEIN, A. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 685, p. 198-204, 2012.
- FERREIRA, R. C.; IANNI, B. M.; ABEL, L. C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 407-11, 2003.
- FERREIRA, A. G. & AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, n. 1, p. 175-204, 2000.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, R1–R4, 1989.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.
- FIGUEIRINHA, A.; CRUZ, M. T.; FRANCISCO, V.; LOPES, M. C.; BATISTA, M. T. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 3, p. 681-690, 2010.
- FILHO, R. F. & ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- FONSECA-BERZAL, C.; PALMEIRO-ROLDÁN, R.; ESCARIO, J. A.; TORRADO, S.; ARÁN, V. J.; TORRADO-SANTIAGO, S.; GÓMEZ-BARRIO, A. Novel solid dispersions of benzimidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. *Experimental Parasitology*, v. 149, p. 84–91, 2015.
- FONTE, P.; LINO, P. R.; SEABRA, V.; ALMEIDA, A. J.; REIS, S.; SARMENTO, B. Annealing as a tool for the optimization of lyophilization and ensuring to the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles. *International journal of Pharmaceutics*, v. 503, n. 1-2, p. 163-173, 2016.
- FONTE, P.; SOARES, S.; SOUSA, F.; COSTA, A.; SEABRA, V.; REIS, S.; SARMENTO, B. Stability study perspective of the effect of freeze-drying using cryoprotectants on the structure of insulin loaded into PLGA nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 15, n. 10, p. 3753-3765, 2014.
- FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nanoemulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, v. 17, p. 2076-2083, 2001.
- FORMAN, B. M.; TONTONOV, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, v. 83, n. 5, p. 803–812, 1995.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cádmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006.
- FRANCISCO, V.; COSTA, G.; FIGUEIRINHA, A.; MARQUES, C.; PEREIRA, P.; NEVES, B. M.; LOPES, M. C.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. Antin-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 148, n. 1, p. 126-134, 2013.

- FRANCISCO, V.; FIGUEIRINHA, A.; NEVES, B. M.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 818-827, 2011.
- FRANCISCO, A. F.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; ARANTES, J. M.; SILVA, M.; PEDROSA, M. L.; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M. S.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. *Redox Report*, v. 15, n. 4, p. 185-190, 2010.
- FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; FRISCIA, E.; PISTELLI, L.; GIUSTI, G.; CERRI, D. A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research*, v. 195, p. 11-17, 2016.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 47, n. 2, p. 125-132, 1999.
- FRICK, J.S.; GRÜNEBACH, F.; AUTENRIETH, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 300, n. 1, p. 19-24, 2010.
- FRITSCH, P. W.; ALMEDA, F.; RENNER, S. S.; MARTINS, A. B.; CRUZ, B.C. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *American Journal of Botanic*, v. 91, n. 7, p. 1105-1114, 2004.
- FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, p. 558-566, 2004.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GALLWITZ, H.; BONSE, S.; MARTINEZ-CRUZ, A.; SCHLICHTING, I.; SCHUMACHER, K.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: Crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 364-372, 1999.
- GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, v. 3, p. 56-65, 2009.
- GARCÍA, M. C.; MANZO, R. H.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. Polysaccharides-based multiparticulated interpolyelectrolyte complexes for controlled benzimidazole release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 545, n. 1-2, p. 366-377, 2018.
- GASCON, J.; BERN, C. & PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, 2010.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology*, v. 22, n. 10, p. 2501-2506, 1992.
- GBENOU, J. D.; AHOUNOU, J. F.; AKAKPO, H. B.; LALEYE, A.; YAYI, EL.; GBAGUIDI, F.; BABA-MOUSSA, L.; DARBOUX, R.; DANSOU, P.; MOUDACHIROU, M.; KOTCHONI, S. O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular Biology Reports*, v. 40, p. 1127-1134, 2013.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosana review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International Journal*, v. 40, p. 1107-1121, 2007.
- GHOSH, D.; PRAMANIK, A.; SIKDAR, N.; GHOSH, S. K.; PRAMANIK, P. Amelioration studies on optimization of low molecular weight chitosan nanoparticle preparation, characterization with potassium per sulphate and silver nitrate combined action with aid of drug delivery to tetracycline

- resistant bacteria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 2, p. 247-253, 2010.
- GOBBI, P.; BAEZ, A.; LO PRESTI, M. S.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. A.; RIVAROLA, H. W. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 107, p. 1279–83, 2010.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOEL, R. K.; SINGH, D.; LAGUNIN, A.; POROIKOV, V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Medicinal Chemistry Research*, v. 20, p. 1509-14, 2011.
- GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.
- GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 267-285, 1998.
- GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.
- GONG, J.; CHEN, M.; ZHENG, Y.; WANG, S.; WANG, Y. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. *Journal of Controlled Release*, v. 159, n. 3, p. 312–323, 2012.
- GOTTLIEB, P.; SHEN, L. G.; CHIMEZIE, E.; BAHNG, S.; KENNEY, M. E.; HOROWITZ, B.; BENCHUR, E. Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components by photodynamic treatment with phthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology*, v. 62, p. 869-874, 1995.
- GOU, K. J.; ZENG, R.; REN, X. D.; DOU, Q. L.; YANG, Q. B.; DONG, Y.; QU, Y. Anti-rheumatoid arthritis effects in adjuvant-induced arthritis in rats and molecular docking studies of *Polygonum orientale* L. extracts. *Immunology Letters*, v. 201, p. 59-69, 2018.
- GOU, M.; MEN, K.; SHI, H.; XIANG, M.; ZHANG, J.; SONG, J.; LONG, J.; WAN, Y.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy *in vitro* and *in vivo*. *Nanoscale*, v. 3, n. 4, p. 1558-1567, 2011.
- GOUBEIA, D. N.; COSTA, J. S.; OLIVEIRA, M. A.; RABELO, T. K.; DE OLIVEIRA E SILVA, A. M.; CARVALHO, A. A.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; LAUTON-SANTOS, S.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; DOS SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; GUIMARÃES, A. G. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 105, p. 652-661, 2018.
- GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, v. 32, p. 195-198, 1973.
- GRECCO, S. S.; COSTA-SILVA, T. A.; JERZ, G.; SOUSA, F. S.; LONDERO, V. S.; GALUPPO, M. K.; LIMA, M. L.; NEVES, B. J.; ANDRADE, C. H.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G. Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (Lauraceae) display *in vitro* antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. *Chemico-Biological Interactions*, v. 1, n. 277, p. 55-61, 2017.
- GREINER, A.; WENDORFF, J. H.; YARIN, A. L.; ZUSSMAN, E. Biohybrid nanosystems with polymer nanofibers and nanotubes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 4, p. 387-393, 2006.
- GUERRA, M. P. & NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, capítulo 1, p. 13-26, 2001.
- GÜNDEL, S. S.; SOUZA, M. E.; QUATRIN, P. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microbial Pathogenesis*, v. 118, p. 268-276, 2018.

- GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J. J.; WU, Y.; HUANG, M. H.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, n. 10, p. 1414–1421, 2009.
- GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, p. 8, 2009.
- HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 151-165, 2003.
- HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, 2003.
- HIERRO, I. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s. I. L3 larvae. *Phytomedicine*, v. 11, p. 77-82, 2004.
- HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHAUB, G. A.; MOSSMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 4075-83.
- HOLSCHIER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 3, p. 1208-1215, 1998.
- HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p. 50-56, 2013a.
- HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; DEGHAN, S.; KHAKSAR, R. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 582-588, 2013b.
- HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *The Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 1, p. 132–139, 2010.
- HSU, W. S.; YEN, J. H.; WANG, Y. S. Formulas of components of citronella oil against mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 48, p. 1014-1019, 2013.
- HU, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the resistant era. *Journal of Controlled Release*, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.
- HYUN, T. K.; KO, Y.; KIM, E.; CHUNG, MIN.; KIM, J. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax moribifera* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 263-270, 2015.
- INOUE, H.; TANABE, T.; UMESONO, K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR gamma. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 36, p. 28028–28032, 2000.
- ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed.; Academic Press: London, 1991.
- JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 7, p. 1663-1676, 2008.
- JEONG, D.; DONG, G. Z.; LEE, H. J.; RYU, J. H. Anti-inflammatory compounds from *Atractylodes macrocephala*. *Molecules*, v. 24, n. 1859, p. 1-11, 2019.
- JHAVERI, A. M.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, p. 14, 2014.
- KALHAPURE, R. S.; SULEMAN, N.; MOCKTAR, C.; SEEDAT, N.; GOVENDER, T. Nanoengineered drug delivery systems for enhancing antibiotic therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 3, p. 872-905, 2015.
- KANDIMALLA, R.; KALITA, S.; CHOUDHURY, B.; DASH, S.; KALITA, K.; KOTOKY, J. Chemical composition and anti-candidiasis mediated wound healing property of *Cymbopogon nardus* essential oil on chronic diabetic wounds. *Frontiers in Pharmacology*, v. 7, 2016.
- KANG, T.; ZHU, Q.; JIANG, D.; FENG, X.; FENG, J.; JIANG, T.; YAO, J.; JING, Y.; SONG, Q.; JIANG, X.; GAO, X.; CHEN, J. Synergistic targeting tenascin C and neuropilin-1 for specific penetration of nanoparticles for anti-glioblastoma treatment. *Biomaterials*, v. 101, p. 60–75, 2016.

- KATSUKAWA, M.; NAKATA, R.; TAKIZAWA, Y.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1801, p. 1214-1220, 2010.
- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanocapsules. *Colloids and Surfaces B*, v. 84, p. 163-171, 2011.
- KENNEDY, P. G. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology*, v. 12, n. 2, p. 186-194, 2013.
- KHALLAAYOUNE, K.; BIRON J. M.; CHAOUI, A.; DUVALLET, G. Efficacy of 1% geraniol (Fultec) as a tick repellent. *Parasite*, v.16, p. 223-226, 2009.
- KHANUJA, S. P. S.; SHASANY, A. K.; PAWAR, A.; LAL, R. K.; DAROKAR, M. P.; NAQVI, A. A.; RAJKUMAR, S.; SUNDARESAN, V.; LAL, N.; KUMAR, S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, p. 171-86, 2005.
- KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 2392–2399, 2009.
- KIMURA, E.; LAY, W. H.; FERNANDEZ, J. F. Extracellular *in vitro* evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *Trypanosoma cruzi* culture. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 20, n. 3, p. 133-138, 1978.
- KOH, T. J. & DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, e. 23, 2011.
- KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, p. 331-352, 2016.
- KOMMURU, T. R.; GURLEY, B.; KHAN, M. A.; REDDY, I. K. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 233-246, 2001.
- KÖNIG, F. G.; SCHUMACHER, M. V.; BRUN, E. J.; SELING, I. Avaliação da sazonalidade da produção de serapilheira numa floresta estacional decidual no município de Santa Maria - RS. *Revista Árvore, Viçosa - MG*, v. 26, n. 4, p. 429-435, 2002.
- KORE, G.; KOLATE, A.; NEJ, A.; MISRA, A. Polymeric micelle as multifunctional pharmaceutical carriers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, p. 288-307, 2014.
- KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CLAYTON, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, v. 35, p. 542-552, 2000.
- KRISHNA, A. K.; FLANAGAN, D. R. Micellar solubilization of a new antimalarial drug, β -arteether. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 78, p. 574–576, 1989.
- KROUBI, M.; DAULOUEDE, S.; KAREMBE, H.; JALLOULI, Y.; HOWSAM, M.; MOSSALAYI, D.; VINCENDEAU, P.; BETBEDER, D. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology*, v. 21, n. 50, 505102, 2010.
- KWON, H. Y.; LEE, J. Y.; CHOI, S. W.; JANG, Y.; KIM, J. H. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 182, p. 123–130, 2001.
- KYRIAZI, M. E.; GIUST, D.; EL-SAGHEER, A. H.; LACKIE, P. M.; MUSKENS, O. L.; BROW, T.; KANARAS, A. G. Multiplexed mRNA sensing and combinatorial-targeted drug delivery using DNA-gold nanoparticle dimers. *ACS Nano*, v. 12, n. 4, p. 3333-3340, 2018.
- LADJ-MINOST, A. Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée: étude pharmacotechnique, devenir in situ et efficacité. PhD Thesis. Université Claude Bernard, Lyon I, 2012.
- LAFEPE, LAFEPE produzirá Benzimidazol. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes, 2007.
- LAHMAR, I.; BELGHITH, H.; BEN ABDALLAH, F.; BELGHITH, K. Nutritional composition and phytochemical, antioxidative, and antifungal activities of *Pergularia tomentosa* L. *BioMed Research International*, v. 2017, n. 6903817, p. 1-9, 2017.

- LAI, X.; YE, Y.; SUN, C.; HUANG, X.; TANG, X.; ZENG, X.; YIN, P.; ZENG, Y. Icaritin exhibits anti-inflammatory effects in the mouse peritoneal macrophages and peritonitis model. *International Immunopharmacology*, v. 16, p. 41-49, 2013.
- LAI, F.; WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; FADDA, A. M. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, v. 7, n. 1, 2006.
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 34, n. 11, p. 2097-2105, 1990.
- LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y.; HONG, J. T. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-κB activation in RAW264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, v. 31, n. 3, p. 342-349, 2008.
- LEITE, B. L. S.; BONFIM, R. R.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M.; ARAÚJO, A. A. S.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; CAMBUI, E. V. F.; BONJARDIM, L. R.; ALBUQUERQUE, R. L. C. Jr.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidante properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 10, p. 1164-1169, 2010.
- LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M. E.; SALOMON, C. J. Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 543-548, 2013.
- LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P. Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil. *Pharmazie*, v. 66, n. 12, p. 911-915, 2011.
- LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 856-860, 2009.
- LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 209-214, 2008.
- LESCANO, C. H.; DE LIMA, F. F.; MENDES-SILVÉRIOS, C. B.; JUSTO, A. F. O.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, C. P.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; MÓNICA, F. Z.; OLIVEIRA, I. P. Effect of polyphenols from *Campomanesia adamantium* on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: Molecular docking and *in vitro* analysis.
- LHERM, C.; COUVREUR, P.; LOISEAU, P.; ORIES, C.; GAYRAL, P. Unloaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: efficiency against bloodstream trypanosomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 39, n. 8, p. 650-652, 1987.
- LI, C. C.; YU, H. F.; CHANG, C. H.; LIU, Y. T.; YAO, H. T. Effects of lemongrass oil and citral on hepatic drug-metabolizing enzymes, oxidative stress, and acetaminophen toxicity in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 26, p. 432-438, 2018.
- LI, X. J.; YANG, Y. J.; LI, Y. S.; ZHANG, W. K.; TANG, H. B. α-Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 179, p. 22-26, 2016.
- LI, W.; CHEN, H.; HE, Z.; HAN, C.; LIU, S.; LI, Y. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. *LWT – Food Science and Technology*, v. 62, p. 39-47, 2015.
- LI, P.; DOU, X.; TANG, Y.; ZHU, S.; GU, J.; FENG, C.; ZHANG, D. Gelator-polysaccharide hybrid hydrogel for selective and controllable dye release. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 387, p. 115-122, 2012.
- LI, M.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A. K.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, v. 24, p. 99-146, 2006.
- LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S. E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interactions of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 145, n. 2, p. 357-364, 2006.

- LIMA, A. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, J. L.; CORRÊA-JUNIOR, R. A. C.; LYRA, M. A. M.; SANTOS, F. L. A.; OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, p. 2443–2451, 2011.
- LIN, J.; ZHANG, H.; CHEN, Z.; ZHENG, Y. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship, *ACS Nano*, v. 4, p. 5421–5429, 2010.
- LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolet from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 112, n. 1, p. 77-83, 2009.
- LOPES, L. Q.; SANTOS, C. G.; DE ALMEIDA VAUCHER, R.; GENDE, L.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. Evaluation of antimicrobial activity of glycerol monolaurate nanocapsules against *American foulbrood* disease agent and toxicity on bees. *Microbial Pathogenesis*, v. 97, p. 183-188, 2016.
- LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 2, p. 626-639, 2011.
- MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J.; TEIXEIRA, M. M.; FACTOR, S. M.; WEISS, L. M.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.
- MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F. & ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAHALWAL, V. S. & ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 18, n. 1, p. 73-76, 2003.
- MALL, S.; BUCKTON, G.; RAWLINS, D. A. Dissolution behavior of sulphonamides into sodium dodecyl sulphate micelles: A thermodynamic approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 75–78, 1996.
- MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M.; LOVO-MARTINS, M. I.; ZANLUQUI, N. G.; TATAKIHARA, V. L. H.; RIZZO, L. V.; VERRI JR, W. A.; MARTINS-PINGE, M. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; PINGE-FILHO, P. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- MAMANI-MATSUDA, M.; RAMBERT, J.; MALVY, D.; LEJOLY-BOISSEAU, H.; DAULOUÈDE, S.; THIOLAT, D.; COVES, S.; COURTOIS, O.; VINCENDEAUS, P.; MOSSALAYI, M. D. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 48, p. 924-929, 2004.
- MANCHANDA, R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; NAGESETTI, A.; MCGORON, A. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agentes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, p. 260–267, 2010.
- MANCONI, M.; PETRETTO, G.; D’HALLEWIN, G.; ESCRIBANO, E.; MILIA, E.; PINNA, R.; PALMIERI, A.; FIROZNEZHAD, M.; PERIS, J. E.; USACH, I.; FADDA, A. M.; CADDEO, C.; MANCA, M. L. *Thymus* essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 171, p. 115-122, 2018.
- MANUJA, A.; KUMAR, B.; CHOPRA, M.; BAJAJ, A.; KUMAR, R.; DILBAGHI, N.; KUMAR, S.; SINGH, S.; RIYESH, T.; YADAV, S. C. Cytotoxicity and genotoxicity of a trypanocidal drug quinapyramine sulfate loaded-sodium alginate nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 88, p. 146-155, 2016.

- MANUJA, A.; KUMAR, S.; DILBAGHI, N.; BHANJANA, G.; CHOPRA, M.; KAUR, H.; KUMAR, R.; MANUJA, B. K.; SINGH, S. K.; YADAV, S. C. Quinapyramine sulfate-loaded sodium alginate nanoparticles show enhanced trypanocidal activity. *Nanomedicine*, v. 9, n. 11, p. 1625-1634, 2014.
- MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p.429-432, 2007.
- MARIN, E.; BRICEÑO, M. I.; CABALLERO-GEORGE, C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 3071–3091, 2013.
- MARQUES, M. C. M. & OLIVEIRA, P. E. A. M. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 4, p. 713-723, 2004.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A.; BURILLO, J.; DE LA HERAS, L.; DEL PRADO, G.; AGULLÓ-ORTUNO, M. T.; JULIO, L. F.; GOZÁLES-COLOMA, A. Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic componentes of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 693-699, 2015.
- MARTINEZ, L. R.; HAN, G.; CHACKO, M.; MIHU, M. R.; JACOBSON, M.; GIALANELLA, P.; FRIEDMAN, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; FRIEDMAN, J. M. Antimicrobial and healing efficacy os sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. *Journal of Inveitigative Dermatology*, v. 129, p. 2463-2469, 2009.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas medicinais, Viçosa: UFV, 1995.
- MASALOVA, O.; KULIKOUSKAYA, V.; SHUTAVA, T.; AGABEKOV, V. Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment. *Physics Procedia*, v. 40, p. 69-75, 2013.
- MATTOS, S. H. Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. Holmes como produtora de mentol no Ceará, Tese de doutorado, Fortaleza: UFC, 98 p, 2000.
- MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M.A. The Trypanosomiasis. CABI Publishing, Wallingford, p. 1150, 2004.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.
- MEIRA, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LANFREDI-RANGEL, A.; GUIMARÃES, E. T.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivates reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. *Experimental Parasitology*, v. 166, p. 108-115, 2016.
- MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; DOS SANTOS, J. A.; MOREIRA, D. R.; NOGUEIRA, R. C.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO, I. M.; DE SOUZA, C. V.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; SOARES, M. B. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, v. 15, n. 11, p. 969-974, 2015.
- MENG, J.; NI, J.; WU, Z.; JIANG, M.; ZHU, A.; QING, H.; NAKANISHI, H. The critical role of IL-10 in the antineuroinflammatory and antioxidative effects of *Rheum tanguticum* on activated microglia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, n. 1083596, 2018.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons - Cell death mechanisms in trypanosomatid parasites. In *Cell Death-Autophagy, Necrosis and Apoptosis*, 1st ed.; Ntuli, T., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, p. 195–230, 2015.
- MENNA-BARRETO, R.F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotalrole of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Research International*, v. 2014, 14 p., 2014.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; SANTA-RITA, R. M.; SOARES, M. J.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron*, v. 40, p. 157-168, 2009a.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONÇALVES, R. L. S.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V., OLIVEIRA, M. F.; CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, p. 644-653, 2009b.

- MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJAS, G. A.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the majos bioactive componente. *Parasitology Research*, v. 103, p. 111-117, 2008.
- MIAO, Q.; XU, D.; WANG, Z.; XUB, L.; WANG, T.; WUA, Y.; LOVEJOY, D. B.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R.; NIE, G.; ZHAO, Y. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine Amphiphilic hyper-branched co-polymer nanoparticles for the controlled delivery of anti-tumor agentes. *Biomaterials*, v. 31, p. 133-143, 2010.
- MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. C. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, v. 111, p. 71-79, 2005.
- MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica*, v. 66, p. 366-368, 2000.
- MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília - DF, 60 p., 2006.
- MISHRA, S.; SRIVASTAVA, N.; SUNDARESAN, V.; SHANKER, K. Amruthapala (*Decalepis arayalpathra* (J. Joseph and V. Chandras.) Venter): A comprehensive review on diversity, therapeutic uses, and valorization of bioactive constituents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 20, n. 5, p. 376-389, 2019.
- MISHRA, G. P.; BAGUI, M.; TAMBOLI, V.; MITRA, A. K. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *Journal of Drug Delivery*, v. 2011, p. 14, 2011.
- MOBARAK, D. H.; SALAH, S.; ELKHESHEN, S. A Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: optimization of technique and process variables. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 19, p. 891-900, 2014.
- MOGHIMI, R.; GHADERI, L.; RAFATI, H.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. J. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, v. 194, p. 410-415, 2016.
- MOGHIMIPOUR, E.; AGHEL, N.; MAHMOUDABADI, A. Z.; RAMEZANI, Z.; SOMAYED, H.. Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, v. 7, p. 117-22, 2012.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 577-91, 2003.
- MONDON, K.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; GURNY, R.; MÖLLER, M. Novel cyclosporin A formulations using MPEG-hexyl-substituted polylactide micelles: a suitability study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 77, n. 1, p. 56-65, 2011.
- MONTANHA, M. C.; SILVA, L. L.; PANGONI, F. B. B.; CESAR, G. B.; GONÇALVES, R. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; TOMINAGA, T. T.; CONSOLARO, M. E. L.; DINIZ, A.; KIMURA, E. Response surface method optimization of a novel hypericin formulation in P123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 170, p. 247-255, 2017.
- MOORE, K. W.; de WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORAES, K. C.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p. 181-191, 2015.
- MORGEN, M.; BLOOM, C.; BEYERINCK, R.; BELLO, A.; SONG, W.; WILKINSON, K.; STEENWYK, R.; SHAMBLIN, S. Polymeric nanoparticles for increased oral bioavailability and

- rapid absorption using celecoxib as a model of a low-solubility, high-permeability drug. *Pharmaceutical Research*, v. 29, p. 427–440, 2012.
- MORILLA, M. J.; PRIETO, M. J.; ROMERO, E. L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 213-219, 2005.
- MORILLA, J. M.; MONTANARI, J.; FRANK, F.; MALCHIODI, E.; CORRAL, R.; PETRAY, P.; ROMERO, E. L. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: Design, characterization and *in vitro/in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Journal of Controlled Release*, v. 103, p. 599-607, 2005.
- MORILLA, M. J.; MONTANARI, J. A.; PRIETO, M. J.; LOPEZ, M. O.; PETRAY, P. B.; ROMERO, E. L. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 311–318, 2004.
- MORILLA, M. J.; BENAVIDEZ, P.; LOPEZ, M. O.; BAKAS, L.; ROMERO, E.L. Development and *in vitro* characterisation of a benznidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 89–99, 2002.
- MORRIS, G. A.; KOK, M. S.; STEPHEN, E.; HARDING, S. E.; ADAMS, G. G. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 27, p. 257-284, 2010.
- MOSER, B. & LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology*, v. 2., n. 2, p. 123-8, 2001.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology Letters*, v. 33, n. 1, p. 35-40, 1992.
- MURTA, A. C.; PERSECHINI, P. M.; PADRON, T. D.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J. A.; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 43, n. 1, p. 27-38, 1990.
- MURUGESU, S.; IBRAHIM, Z.; AHMED, Q. U.; UZIR, B. F.; YUSOFF, N. I. N.; PERUMAL, V.; ABAS, F.; SHAARI, K.; KHATIB, A. Identification of α -glucosidase inhibitors from *Clinacanthus mutans* leaf extract using liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics and protein-ligand interaction with molecular docking. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 9, p. 91-99, 2019.
- MUSAZZI, U. M.; YOUM, I.; MUROWCHICK, J. B.; EZOULIN, M. J.; YOUN, B. B. C. Resveratrol loaded nanocarriers: formulation, optimization, characterization and *in vitro* toxicity on cochlear cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 118, p. 234–242, 2014.
- NAVARRO, M. C.; LIMA, A. R.; ASKUE, J.; CONTRERAS, V. T. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 83-91, 2003.
- NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. São Paulo: Editora Atheneu, 12^a ed., 2011.
- NIBRET, E. & WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*, v. 17, p. 911-920, 2010.
- NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, n. 3, p. 630–648, 2006.
- OBERDÖRSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; CASTRANOVA, V.; FITZPATRICK, J.; AUSMAN, K.; CARTER, J.; KARN, B.; KREYLING, W.; LAI, D.; OLIN, S.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; WARHEIT, D.; YANG, H.; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. Principles for characterization the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 2, n. 8, 2005.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

- OCHENG, F.; BWANGA, F.; BOSTRÖM, E. A.; JOLOBA, M.; BORG-KARLSON, A. K.; YUCEL-LINDBERG, T.; OBUA, C.; GUSTAFSSON, A. Essential oils from Ugandan medicinal plants: *In vitro* cytotoxicity and effects on IL-1 β -induced proinflammatory mediators by human gingival fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 8, 2016.
- OLAGNIER, D.; COSTES, P.; BERRY, A.; LINAS, M. D.; URRUTIGOITY, M.; DECHY-CABARET, O.; BENOIT-VICAL, F. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, p. 6075-6078, 2007.
- OLIVEIRA, C. A.; GOUVÊA, M. M.; ANTUNES, G. R.; DE FREITAS, Z. M. F.; MARQUES, F. F. C.; RICCI-JUNIOR, E. Nanoemulsion containing 8-methoxypsoralen for topical treatment of dermatoses: Development, characterization and *ex vivo* permeation in porcine skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 547, p. 1-9, 2018.
- OLIVEIRA, C. B.; MEURER, Y. S.; MEDEIROS, T. L.; POHLIT, A. M.; SILVA, M. V.; MINEO, T. W.; ANDRADE-NETO, V. F. Anti-toxoplasma activity of estragole and thymol in murina models of congenital and noncongenital toxoplasmosis. *Journal of Parasitology*, v. 102, n. 3, p. 369-376, 2016.
- OLIVEIRA, L. G. Avaliação da eficácia do sistema poli(ϵ -caprolactona) de liberação controlada de metotrexato em um modelo murino de inflamação e angiogênese. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, p. 71, 2014.
- OLIVEIRA, M. L. G.; ASSENCO, R. A. G.; SILVA, G. D. F.; LOPES, J. C. D.; SILVA, F. C.; LANNA, M. C. S.; DE MAGALHÃES, J. C.; DUARTE, L. P.; FILHO, S. A. V. Cytotoxicity, anti-poliovirus activity and *in silico* biological evaluation from *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 130-137, 2014.
- OLIVEIRA, L. G.; KUEHN, C. C.; SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; DO PRADO JR, J. C. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, v. 32, p. 245-51, 2010.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- OGUNGBE, I. V. & SETZER, W. N. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases – Part III: *In-silico* molecular docking investigations. *Molecules*, v. 21, p. 1389, 2016.
- OH, Y.A.; OH, Y. J.; SONG, A. Y.; WON, J. S.; SONG, K. B.; MIN, S. C. Comparison of effectiveness of edible coatings using emulsions containing lemongrass oil of different size droplets on grape berry safety and preservation. *LWT- Food Science and Technology*, v. 75, p. 742-750, 2017.
- OOSTENDORP, R. L.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treatment Reviews*, v. 35, p. 137-147, 2009.
- OPANASOPIT, P.; APIRAKARAMWONG, A.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; RUKTANONCHAI, U. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 9, p. 67-74, 2008.
- ORTAN, A.; CAMPEANU, G.; DINU-PIRV, C.; POPESCU, L. Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 14, p. 4411-4417, 2009.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 388, p. 95-102, 2012.
- OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A.; JAMES, S. L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 89, n. 18, p. 8676-8680, 1992.
- PAN, S. C. *Trypanosoma cruzi*: intracellular stages grown in a cell-free medium at 37°C. *Experimental Parasitology*, v. 45, n. 2, p. 215-224, 1978.
- PASSOS, L. S. A.; MAGALHÃES, L. M. D.; SOARES, R. P.; MARQUES, A. F.; NUNES, M. D. C. P.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Specific activation of CD4⁺ CD8⁻ double-negative T cells by *Trypanosoma cruzi*-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with

- cardiomyopathy in Chagas patients. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 190, n. 1, p. 122-132, 2017.
- PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 177, p. 8-18, 2014.
- PAULA, H. C. B.; ABREU, F. O. M. S.; DE OLIVEIRA, E. F.; DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 1277-1282, 2012.
- PAULA, H. C. B.; SOMBRA, F. M.; CAVALCANTE, R. F.; ABREU, F. O. M. S.; DE PAULA, R. C. M. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, p. 173-178, 2011.
- PAULA, H. C. B.; DE OLIVEIRA, E. F.; MORAIS, S. M.; FORTE, M. M. C.; ABREU, F. O. M. S.; DE PAULA, R. C. M. ALG/Ca beads as an encapsulation agent of *Croton Zehntneri Pax et Hoffm* essential oil. *Polímeros*, v. 20, p. 112-120, 2010a.
- PAULA, H. C. B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F. O. M. S.; DE PAULA, R. C. M. *Lippia sidoides* essential oil encapsulation by alginate-chitosan nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 2359-2366, 2010b.
- PAVANELLI, W. R. Citocinas e óxido nítrico na Doença de Chagas. *Biosaúde, Londrina*, v. 10, n. 2, p. 147-155, 2008.
- PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos de gênero *Trichophyton*, Dissertação de Mestrado. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; CARMO, V. A. S.; FERRARI, C. S.; REIS, E. C. O.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with ^{99m}Tc-HMPAO. *Nuclear Medicine Communications*, v. 30, p. 749-755, 2009.
- PERIN, L.; MOREIRA DA SILVA, R.; FONSECA, K. D.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A.; REIS, L. E.; MOLINA, I.; CORREA-OLIVEIRA, R.; VIEIRA, P. M.; CARNEIRO, C. M. Pharmacokinetics and tissue distribution of benzimidazole after oral administration in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 4, 2017.
- PERINI, V. B. M.; CASTRO, H. G.; SANTOS, G. R.; AGUIAR, R. W. S.; LEÃO, E. U.; SEIXAS, P. T. L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. *Journal Biotechnology and Biodiversity*, v. 2, n. 2, p. 23-27, 2011.
- PHILION, C.; MA, D.; RUVINOV, I.; MANSOUR, F.; PIGNANELLI, C.; NOEL, M.; SALEEM, A.; ARNASON, J.; RODRIGUES, M.; SINGH, I.; ROPAT, J.; PANDEY, S. *Cymbopogon citratus* and *Camellia sinensis* extracts selectively induce apoptosis in cancer cells and reduce growth of lymphoma xenografts *in vivo*. *Oncotarget*, v. 8, n. 67, p. 110756-110773, 2017.
- PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochemical Journal*, v. 403, n. 2, p. 323-334, 2007.
- PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cellular Immunology*, v. 193, p. 90-98, 1999.
- PINTO, V. V.; FERREIRA, M. J.; SILVA, R.; SANTOS, H. A.; SILVA, F.; PEREIRA, C. M. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 364, n. 1-3, p. 19-25, 2010.
- PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 16, p. 228-237, 2011.
- POTZERNHEIM, M.; BIZZO, H. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; CARVALHO-CILVA, M.; GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, p.10-12, 2006.
- PRANCE, G. T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri Botanical Garden*, v. 64, p. 559-684, 1977.

- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- PRIOTTI, J.; FERREIRA, M. J. G.; LAMAS, M. C.; LEONARDI, D.; SALOMON, C. J.; NUNES, T. G. First solid-state NMR spectroscopy evaluation of complexes of benzimidazole with cyclodextrin derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 131, p. 90–97, 2015.
- PRIOTTO, G.; KASPARIAN, S.; MUTOMBO, W.; NGOUAMA, D.; GHORASHIAN, S.; ARNOLD, U.; GHABRI, S.; BAUDIN, E.; BUARD, V.; KAZADI-KYANZA, S.; ILUNGA, M.; MUTANGALA, W.; POHLIG, G.; SCHMID, C.; KARUNAKARA, U.; TORREELE, E.; KANDE, V. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, noninferiority trial. *The Lancet*, v. 374, n. 9683, p. 56-64, 2009.
- PUENTE, V.; LAURELLA, L. C.; SPINA, R. M.; LOZANO, E.; MARTINO, V. S.; SOSA, M. A.; SÜLSEN, V. P.; LOMBARDO, E. Primary targets of the sesquiterpene lactone deoxymikanolide on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, v. 15, n. 56, p. 27-34, 2019.
- QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 5, p. 1000–1008, 2011.
- QUINTÃO, F. J. O. Caracterização dos óleos essenciais de *Microlicia graveolens*, *Melaleuca leucadendron* e de extratos hidroalcoólicos das folhas e caules de *Vellozia squamata* para o desenvolvimento de nanoemulsões para uso farmacêutico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, p. 116, 2013.
- RACOVITA, S.; VASILIU, S.; POPA, M.; LUCA, C. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*, v. 54, n. 9, p. 709–718, 2009.
- RAHIMI, V. B.; AJAM, F.; RAKHSHANDEH, H.; ASKARI, V. R. A pharmacological review on *Portulaca oleracea* L.: Focusing on anti-inflammatory, anti-oxidant, immune-modulatory and antitumor activities. *Journal of Pharmacopuncture*, v. 22, n. 1, p. 7-15, 2019.
- RAMBO, I. Z.; BRITTA, E. A.; NAKAMURA, C. V. Desenvolvimento e caracterização de nano/micropartículas contendo benzonidazol associado a compostos sinérgicos naturais ou sintéticos para o tratamento da doença de Chagas. In: 24º Encontro Anual de Iniciação Científica, Paraná, 2015.
- RAMÍREZ-CISNEROS, M. A.; RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; RAO, P. P.; ABURTO-AMAR, R.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V. *In vitro* COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activities of iridoids from *Penstemon barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* and *Vitex mollis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 20, p. 4505-4508, 2015.
- RANGEL-YAGUI, C. O.; HSU, H. W. L.; BARBOSA, L. R. S.; CAETANO, W.; PESSOA, A. Jr.; TAVARES, L. C.; ITRI, R. Novel potential drug against *T. cruzi* and its interaction with surfactant micelles. *Pharmaceutical Development and Technology*, v.12, n. 2, p. 183-192, 2007.
- RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA-JR, A.; TAVARES, L. C. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 147–163, 2005.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-61, 2001.
- REA, A.; TEMPONE, A. G.; PINTO, E. G.; MESQUITA, J. T.; RODRIGUES, E.; SILVA, L. G. M.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Soutamarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 12, 2013.
- RENNER, S. S. Bayesian analysis of combined chloroplast loci, using multiple calibrations, supports the recent arrival of melastomataceae in Africa and Madagascar. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 9, p. 1427–1435, 2004.
- RESTREPO, A. E.; ROJAS, J. D.; GARCIA, O. R.; SANCHEZ, L. T.; PINZON, M. I.; VILLA, C. C. Mechanical, barrier, and color properties of banana starch edible films incorporated with nanoemulsions of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils. *Food Science and Technology International*, v. 24, n. 8, p. 705-712, 2018.
- RIBEIRO, L. M. N.; BREITKREITZ, M. C.; GUILHERME, A. V.; SILVA, G. H. R.; COUTO, V. M.; CASTRO, S. R.; DE PAULA, B. O.; MACHADO, D.; DE PAULA, E. Natural lipids-based NLC

- containing lidocaine: from pre-formulation to *in vivo* studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 106, p. 102-122, 2017.
- RIBEIRO, J. C.; RIBEIRO, W. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L.; MACEDO, I. T.; SANTOS, J. M.; PAULA, H. C.; ARAÚJO FILHO, J. V.; MAGALHÃES, R. D.; BEVILAGUA, C. M. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Veterinary Parasitology*, v. 204, n. 3-4, p. 243-248, 2014.
- RIBEIRO C. M.; BUDNI, P.; PEDROSA, R. C.; FARIAS, M. S.; PARISOTTO, E. B.; DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; COLEPICOLO, P.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas heart disease. *International Journal of Cardiology*, v. 145, p. 27-33, 2010.
- RIBEIRO, D. A.; CALVI, S. A.; PICKA, M. M.; PERSI, E.; DE CARVALHO, T. B.; CAETANTO, P. K.; NAGOSHI, L. R.; LIMA, C. R.; MACHADO, J. M.; SALVADORI, D. M. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.
- RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RENIA, L.; AUGUSTO FRAGATA FILHO A.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunology*, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2000.
- RITTER, C. S.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; SOUZA, C. F.; SAGRILLO, M. R.; DA SILVA, A. P. T.; MORESCO, R. N.; GUARDA, N. S.; DA SILVA, A. S.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in nanocapsules reduces cytotoxic damage in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Microbial Pathogenesis*, v. 103, p. 149-154, 2017.
- ROBERTS, G. A. F. *Chitin Chemistry*. London, The Macmillan Press, 1992.
- ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. & MARQUES, M. O. M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, v. 3, n. 1, p. 73-78, 2000.
- ROCO, M.C. International strategy for nanotechnology research and development. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 3, n. 5-6, p. 353-360, 2001.
- RODRIGUES GOULART, H.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; AQUINO DUARTE, F. A.; KATZIN, A. M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2502-2509, 2004.
- RODRÍGUEZ-ROJO, S.; VARONA, S.; NÚÑEZ, M.; COCERO, M. J. Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 137-140, 2012.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Material Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- ROLIM-NETO, P. J.; FERRAZ, L. R. M.; ALVES, A. E. G.; NASCIMENTO, D. D. S. S.; AMARIZ, I. A.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; MELO, C. M.; JÚNIOR, S. A.; SILVA, R. M. F. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de sistemas *Drug Delivery*. Nº BR10 2016 003408 6, 18 jan., 2016.
- ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.
- ROMERO, R. Uma nova espécie de *Microlicia* (Melastomataceae) do estado de Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 61, p. S15-S18, 2010.
- ROMERO, R. Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 4, p. 429-435, 2003.
- ROMERO, D.; GOMEZ-ZAPATA, M.; LUNA, A.; GARCIA-FERNANDEZ, J. A. Morphological characterization of BGM (Buffalo Green Monkey) cell line exposed to low doses of cadmium chloride. *Toxicology in Vitro*, v. 17, p. 293-299, 2003.

- RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type I regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, v. 212, p. 28-50, 2006.
- RONDINELLI, E.; SILVA, R.; CARVALHO, J. F.; SOARES, C. M. A.; DE CARVALHO, E. F.; DE CASTRO, F. T. *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* cycle of cell differentiation in axenic culture. *Experimental Parasitology*, v. 66, n. 2, p. 197-204, 1988.
- ROSSI, G. G.; GUTERRES, K. B.; BONEZ, P. C.; GUNDEL, S. S.; AGGERTT, V. A.; SIQUEIRA, F. S.; OURIQUE, A. F.; WAGNER, R.; KLEIN, B.; SANTOS, R. C. V.; CAMPOS, M. M. A. Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 335-341, 2017.
- ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Fifth Edition. London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA, 2005.
- RUNGQU, P.; OYEDEJI, O.; NKEH-CHUNGAG, B.; SONGCA, S.; OLUWAFEMI, O.; OYEDEJI, A. Anti-inflammatory activity of the essential oils of *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burt Davy from Eastern Cape, South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 5, p. 426-431, 2016.
- SAHOO, S.; SASMAL, A.; NANDA, R.; PHANI, A. R.; NAYAK, P. L. Synthesis of chitosan-polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 106-113, 2010.
- SAINSBURY, F.; ZENG, B.; MIDDELBERG, A. P. Towards designer nanoemulsions for precision delivery of therapeutics. *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 4, p. 11-17, 2014.
- SAJID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, L. S.; MCKERROW, J. H. Cruzain – The path from target validation to the clinic. In: *Cysteine proteases of pathogenic organisms*, ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. Ed. Springer, New York, chapter 7, 2011.
- SALEHI, B.; ARMSTRONG, L.; RESCIGNO, A.; YESKALIYEVA, B.; SEITIMOVA, G.; BEYATLI, A.; SHARMEEN, J.; MAHOMOODALLY, M. F.; SHAROPOV, F.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SANTINI, A.; ABENAVOLI, L.; CAPASSO, R.; SHARIFI-RAD, J. *Lamium* plants – A comprehensive review on health benefits and biological activities. *Molecules*, v. 24, n. 1913, p. 1-23, 2019.
- SÁNCHEZ, G.; CUELLAR, D.; ZULANTAY, I.; GAJARDO, M.; GONZÁLEZ-MARTIN, G. Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biological Research*, v. 35, n. 1, p. 39-45, 2002.
- SÁNCHEZ, A.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 99, n. 2-3, p. 263-273, 1993.
- SANS-SERRAMITJANA, E.; FUSTÉ, E.; MARTÍNEZ-GARRIGA, B.; MERLOS, A.; PASTOR, M.; PEDRAZ, J. L.; ESQUISABEL, A.; BACHILLER, D.; VINUESA, T.; VIÑAS, M. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 15, n. 5, p. 611-618, 2016.
- SANTA-RITA, R. M.; LIRA, R.; BARBOSA, H. S.; URBINA, J. A.; CASTRO, S. L. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, p. 780-784, 2005.
- SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. DAS G.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SOARES, M. J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa:Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, Berlin, v. 100, p. 783-790, 2007a.
- SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 116, p. 283-290, 2007b.
- SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on

- intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*, Cambridge, v. 134, p. 1649–1656, 2007c.
- SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 1-7, 2006.
- SAYIN, O.; ARSLAN, N.; ALTUN, Z. S.; AKDOĞAN, G. *In vitro* effect of resveratrol against oxidative injury of human coronary artery endothelial cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 41, n. 2, p. 211–218, 2011.
- SCALISE, M. L.; ARRÚA, E. C.; RIAL, M. S.; ESTEVA, M. I.; SALOMON, C. J.; FICHERA, L. E. Promising efficacy of benznidazole nanoparticles in acute *Trypanosoma cruzi* murina model: *In vitro* and *in vivo* studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 388-393, 2016.
- SCHLUNS, K. S. & LEFRANCOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 4, p. 269-79, 2003.
- SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. DE N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drug or leads against protozoan neglected diseases – Part I. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 2128-2175, 2012a.
- SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. DE N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases – Part II. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 2176-2228, 2012b.
- SCHMIDT, T. J.; WILLUHN, G.; BRUN, R.; KHALID, S. A. AntiTrypanosomal activity of helenalin and some related sesquiterpene lactones. *Planta Médica*, v. 68, p. 750-751, 2002.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J. & SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.
- SCHUMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, suppl. 1, p. 75-85, 2007.
- SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, v. 178, p. 52-62, 2015.
- SEIBERT, J. B.; RODRIGUES, I. V.; CARNEIRO, S. P.; AMPARO, T. R.; LANZA, J. S.; FRÉZARD, F. J. G.; SOUZA, G. H. B.; SANTOS, O. D. H. Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion with antioxidant activity. *Flavour and Fragrance Journal*, p. 1-10, 2019.
- SEIBERT, J. B. Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 83 p., 2015.
- SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n. 9, p. 839–846, 2008.
- SENEL, S.; KREMER, M. J.; KAS, S.; WERTZ, P. W.; HMNCAL, A. A.; SQUIER, C. A. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*, v. 21, p. 2067-2071, 2000.
- SEREMETA, K. P.; ARRÚA, E. C.; OKULIK, N. B.; SALOMON, C. J. Development and characterization of benznidazole nano- and microparticles: A new tool for pediatric treatment of Chagas disease? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 177, p. 169-177, 2019.
- SETZER, W. N.; STOKES, S. L.; BANSAL, A.; HABER, W. A.; CAFFREY, C. R.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark

- essential oil from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, v. 2, p. 685-689, 2007.
- SETZER, W. N.; TAKAKU, S.; STOKES, S. L.; PENTON, A. F. Inhibition of cruzain by *Ocotea* leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. *Pharmacologyonline*, v. 3, p. 785-793, 2006.
- SEVERINO, P.; CHAUD, M. V.; SHIMOJO, A.; ANTONINI, D.; LANCELLOTTI, M.; SANTANA, M. H. A.; SOUTO, E. B. Sodium alginate-cross-linked polymyxin B sulphate-loaded solid lipid nanoparticles: Antibiotic resistance tests and HaCat and NIH/3T3 cell viability studies. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v. 129, p. 191-197, 2015.
- SHALABY, K. S.; SOLIMAN, M. E.; CASETTARI, L.; BONACUCINA, G.; CESPI, G.; PALMIERI, G. F.; SAMMOUR, O. A.; EL SHAMY, A. A. Determination of factors controlling the particle size and entrapment efficiency of noscapine in PEG/PLA nanoparticles using artificial neural networks. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 4953-4964, 2014.
- SHARMA, A.; KUMAR ARYA, D.; DUA, M.; CHHATWAL, G. S.; JOHRI, A. K. Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, n. 11, p. 1325-1332, 2012.
- SHEN, Y.; CHEN, B. L.; ZHANG, Q. X.; ZHENG, Y. Z.; FU, Q. Traditional uses, secondary metabolites, and pharmacology of *Celastrus* species – a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 111934, 2019.
- SHERRY, M.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H.; GREIGE-GERGES, H. Essential oils encapsulated in liposomes: A review. *Journal of Liposome Research*, v. 23, p. 268–275, 2013.
- SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nanoletters*, v. 10, p. 3223-3230, 2010.
- SHIN, H. C.; ALANI, A. W.; RAO, D. A.; ROCKICH, N. C.; KWON, G. S. Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 140, n. 3, p. 294–300, 2009.
- SHIRAZINIA, R.; RAHIMI, V. B.; KEHKHAIE, A. R.; SAHEBKAR, A.; RAKHSHANDEH, H.; ASKARI, V. R. *Opuntia dillenii*: A forgotten plant with promising pharmacological properties. *Journal of Pharmacopuncture*, v. 22, n. 1, p. 16-27, 2019.
- SHUKLA, S.; BAFNA, H.; SUNDAR, D.; THORAT, S. S. The bitter barricading of prostaglandin biosynthesis pathway: Understanding the molecular mechanism of selective cyclooxygenase-2 inhibition by amarogentin, a secoiridoid glycoside from *Swertia chirayita*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v. 59, p. 201–222, 1995.
- SILVA, C. F.; MOURA, F. C.; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P. Extraction of citronela (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO₂: Experimental data and mathematical modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 2, p. 343-350, 2011.
- SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, I. V.; GONCALVES, A. R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, p. 1–10, 2006.
- SIMÕES, C. M. O. & SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.
- SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 4, p. 465-472, 2016.
- SINGH, S. P.; KONWAR, B. K. Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *SpringerPlus*, v. 1, n. 69, 2012.
- SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M.; MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronela, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 68, p. 71-77, 2014.
- SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 1-33, 2004.

- SINICO, C.; DE LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M.. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 1, p. 161–168, 2005.
- SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 1202–1205, 1996.
- SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, v. 8, p. 71-78, 1990.
- SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, v. 5, p. 21-30, 2011.
- SOENARKO, S. The genus *Cymbopogon* Sprengel (Gramineae). *Reinwardtia*, v. 9, n. 3, p. 225-375, 1977.
- SON, S.; KIM, W. J. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery. *Biomaterials*, v. 31, p. 133–143, 2010.
- SONAWANE, S. J.; KALHAPURE, R. S.; JADHAV, M.; RAMBHAROSE, S.; MOCKTAR, C.; GOVENDER, T. Transforming linoleic acid into a nanoemulsion for enhanced activity against methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, v. 5, p. 90482-90492, 2015.
- SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Letters*, v. 582, n. 1, p. 2–9, 2008.
- SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C. A.; CHAVES, A. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.
- STOKES, S. L.; COLE, R. A.; RANGELOVA, M. P.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Cruzain inhibitory activity of the leaf essential oil from an undescribed species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, v. 2, p. 1211-1213, 2007.
- STRECK, L.; SARMENTO, V. H. V.; DE MENIEZES, R. P. R. P. B.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; MARTINS, A. M. C.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Tailoring microstructural, drug release properties, and antichagasic efficacy of biocompatible oil-in-water benzimidazol-loaded nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 555, p. 36-48, 2019.
- STRECK, L.; SARMENTO, V. H. V.; MACHADO, P. R. L.; FARIAS, K. J. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; SILVA-JÚNIOR, A. A. Phase transitions of isotropic to anisotropic biocompatible lipid-based drug delivery systems overcoming insoluble benzimidazole loading. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, 981, 2016.
- SU, V.; KING, D.; WOODROW, I.; MCFADDEN, G.; GLEADOW, R. *Plasmodium falciparum* growth is arrested by monoterpenes from eucalyptus oil. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 23, p. 315-318, 2008.
- SUFFREDINI, G.; EAST, J. E.; LEVY, L. M. New applications of nanotechnology for neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, v. 35, n. 7, p. 1246-1253, 2014.
- SÜLSEN, V. P.; PUENTE, V.; PAPADEMÉTRIO, D.; BATLLE, A.; MARTINO, V. S.; FRANK, F. M.; LOMBARDO, M. E. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, v. 11, n. 3, 2016.
- SUN, L. L.; WU, H.; ZHANG, Y. Z.; WANG, R.; WANG, W. Y.; WANG, W.; LI, S. P.; DAI, L.; ZHANG, Z. R. Design, synthesis and preliminary evaluation of the anti-inflammatory of the specific selective targeting druggable enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) small molecule. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 11, p. 2505-2514, 2016.
- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 11, p. 1-13, 2010.
- TABASSUM, R.; VAIBHAV, K.; SHRIVASTAVA, P.; KHAN, A.; AHMED, M. E.; ASHAFAG, M.; KHAN, M. B.; ISLAM, F.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Perillyl alcohol improves functional and histological outcomes against ischemia-reperfusion injury by attenuation of oxidative stress and repression of COX-2, NOS-2 and NK-κB in middle cerebral artery occlusion rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 747, p. 190-199, 2015.

- TAKAISI-KIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 69-71, 2000.
- TAKAISI-KIKUNI, N. B.; KRUGER, D.; GNANN, W.; WECKE, J. Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, v. 88, p. 55-62, 1996.
- TAKÁTS, Z.; VÉKEY, K.; HEGEDÜS, L. Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, v. 15, n. 10, p. 805-810, 2001.
- TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 8, p. 851-866, 2000.
- TANAKA, K.; MASUMORI, M.; YAMANOSHITA, T.; TANGE, T. Morphological and anatomical changes of *Melaleuca cajuputi* under submergence. *Trees*, Tokyo, v. 25, p. 695-704, 2011.
- TANFORD, C. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. Wiley: New York, 1980.
- TATAKIHARA, V. L. H.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, v. 52, p. 47-58, 2008.
- TAVARES, F.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; FIGUEIRINHA, A.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. *Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 13, p. 2652-2659, 2015.
- TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.
- TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2913-2919, 2010.
- TRAN, H. T.; GAO, X.; KRETSCHMER, N.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; RAAB, P.; PIRKER, T.; TEMML, V.; SCHUSTER, D.; KUNERT, O.; HUYNH, L.; BAUER, R. Anti-inflammatory and antiproliferative compounds from *Sphaeranthus africanus*. *Phytomedicine*, v. 62, n. 152951, 2019.
- TSAI, M. L.; LIN, C. C.; LIN, W. C.; YANG, C. H. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 75, n. 10, p. 1977-1983, 2011.
- TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, v. 334, n. 6179, p. 260-262, 1988,
- TIWARI, M. & KAKKAR, P. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 295-301, 2009.
- TOLEDO, L. G.; RAMOS, M. A. S.; SPÓSITO, L.; CASTILHO, E. M.; PAVAN, F. R.; LOPES, E. O.; ZOCOLO, G. J.; SILVA, F. A. N.; SOARES, T. H.; SANTOS, A. G.; BAUAB, T. M.; ALMEIDA, M. T. G. Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: a strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 1252, 2016.
- TOMAZ, M. A.; COSTA, A. V.; RODRIGUES, W. N.; PINHEIRO, P. F.; PARREIRA, L. A.; RINALDO, D.; QUEIROZ, V. T. Chemical composition and allelopathic activity of the *Eucalyptus* essential oil. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 30, p. 475-483, 2014.
- TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-base drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 73, p. 137-172, 2001.
- TOUDAHL, A. B.; FILHO, S. A. V.; SOUZA, G. H. B.; MORAIS, L. D.; SANTOS, O. D. H.; JÄGER, A. K. Chemical composition of the essential oil from *Microlicia graveolens* growing wild in Minas Gerais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 3, p. 680-681, 2012.

- TRESCH, M.; MEVISSSEN, M.; AYRLE, H.; MELZIG, M.; ROOSJE, P.; WALKENHORST, M. Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 174, p. 1-19, 2019.
- TRINDADE, L. A.; OLIVEIRA, J. A.; CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical Oral Investigations*, 2015.
- TSUNAWAKI, S.; SPOM, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, v. 334, p. 260-263, 1998.
- TURINA, A. DEL V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, v. 122, p. 101-113, 2006.
- UBRICH, N.; SCHMIDT, C.; BODMEIER, T.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Oral evaluation in rabbits of cyclosporine-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, n. 1, p. 169-175, 2005.
- UENO, A. K.; BARCELLOS, A. F.; COSTA-SILVA, T. A.; MESQUITA, J. T.; FERREIRA, D. D.; TEMPONE, A. G.; ROMOFF, P.; ANTAR, G. M.; LAGOA, J. H. G. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). *Fitoterapia*, v. 125, p. 55-58, 2018.
- URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, suppl. 1, p. 311-318, 2009.
- URBINA, J. A. & DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 287-295, 2002.
- VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; DIAS FILHO, B. P.; KANESHIMA, E. N.; YAMADA-OGATTA, S. F.; YAMAUCHI, L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal synergistic activity of *N*-butyl-1-(4-dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carboline-3-Carboxamide associated with benznidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 507-12, 2012.
- VALENTI, D.; DE LOGU, A.; LOY, G.; SINICO, C.; BONSIGNORE, L.; COTTIGLIA, F.; GARAU, D.; FADDA, A. M. Liposome-incorporated *Santolina insularis* essential oil: preparation, characterization and *in vitro* antiviral activity. *Journal of Liposome Research*, v. 11, n. 1, p. 73-90, 2001.
- VALENTIM, D. S. S.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; CARVALHO, J. C. T.; CONCEIÇÃO, E. C.; FERNANDES, C. P.; TAVARES-DIAS, M. Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows *in vitro* efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). *Journal of Fish Diseases*, v. 41, n. 3, p. 1-7, 2018.
- VARGAS DE OLIVEIRA, E. C.; CARNEIRO, Z. A.; ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J. M. Development and evaluation of a nanoemulsion containing ursolic acid: A promising trypanocidal agent. *AAPS PharmSciTech*, v. 18, n. 7, p. 2551-2560, 2017.
- VARONA, S.; KARETH, S.; MARTIN, A.; COCERO, M. J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 369-377, 2010.
- VEIGA JR.. V. F.; PINTO, A. C. & MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VEIGA-SANTOS, P.; BARRIAS, E. S.; SANTOS, J. F. C.; MOREIRA, T. L. B.; CARVALHO, T. M. U.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 40, p. 61-71, 2012.
- VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; SANTOS, G. R.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, K. P. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1707-1713, 2012.
- VENKATRAMAN, S. S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B. Y.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 298, n. 1, p. 219-232, 2005.

- VENTURA, T. L. B. Atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana de espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, p. 117, 2011.
- VERCESI, A. E.; BERNARDES, C. F.; HOFFMANN, M. F.; GADELHA, F. R.; DOCAMPO, R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 14431-14434, 1991.
- VERMA, V. K.; RAM, A. Preparation, characterization and *in vitro* release of piroxicam loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, v. 3, p. 1136-1146, 2010.
- VERMA, R. K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmaceutical Technology On-Line*, v. 25, n. 2, p. 1-14, 2001.
- VERRECCHIA, T.; HUVE, P.; BAZILE, D.; VEILLARD, M.; SPENLEHAUER, G.; COUVREUR, P. Adsorption/desorption of human serum albumin at the surface of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a solvent evaporation process. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, n. 8, p. 1019-1028, 1993.
- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.
- VICENTINO, A. R. R. & MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.
- VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.
- VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; KAPPES, J. C.; LIMA, M. F. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP- α and MIP- β induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 4690-4695, 1998.
- VINUESA, T.; HERRÁES, R.; OLIVER, L.; ELIZONDO, E.; ACARREGUI, A.; ESQUISABEL, A.; PEDRAZ, J. L.; VENTOSA, N. VECIANA, J.; VIÑAS, M. Benzimidazole nanformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 5, p. 1469-1476, 2017.
- VITIELLO, M.; GALDIERO, M.; FINAMORE, E.; GALDIERO, S.; GALDIERO, M. NF- κ B as a potential therapeutic target in microbial diseases. *Molecular Biosystems*, v. 8, n. 4, p. 1108-1120, 2012.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C. & WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Pelotas: Embrapa Clima Temperado*, 16 p., 2010.
- VODOVOTZ, Y. Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta 1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry*, v. 1, p. 3-17, 1997.
- VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*, v. 178, n. 2, p. 605-613, 1993.
- VOLPEDO, G.; COSTA, L.; RYAN, N.; HALSEY, G.; SATOSKAR, A.; OGHUMU, S. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. *The journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 25, e144118, 2019.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, v. 16, p.97-110, 2009.
- WALLERT, M.; BAUER, J.; KLUGE, S.; SCHMÖLZ, L.; CHEN, Y. C.; ZIEGLER, M.; SEARLE, A. K.; MAXONES, A.; SCHUBERT, M. THÜRMER, M.; PEIN, H.; KOEBERLE, A.; WERZ, O.; BIRNINGER, M.; PETER, K.; LORKOWSKI, S. The vitamin E derivative garcinoic acid from *Garcinia kola* nut seeds attenuates the inflammatory response. *Redox Biology*, v. 24, p. 1-10, 2019.

- WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chemistry*, v. 291, p. 199-206, 2019.
- WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, J.; LEI, W.; LI, K.; WU, D.; WANG, X. Pharmacokinetics, biodistribution, and bioavailability of gossypol-loaded pluronic F127 nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 45, p. 388-396, 2018.
- WANG, X.; REN, Z.; HE, Y.; XIANG, Y.; ZHANG, Y.; QIAO, Y. A combination of pharmacophore modeling, molecular docking and virtual screening for iNOS inhibitors from Chinese herbs. *Bio-Medical materials and Engineering*, v. 24, p. 1315-1322, 2014.
- WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. *The grass genera of the world*. Wallingford: C.A.B. International. 1081 p., 1992.
- WEI, L. S. & WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 5, n. 2, p. 147-152, 2012.
- WEN, Z.; LIU, B.; ZHENG, Z.; YOU, X.; PU, X.; LI, Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 88, n. 8, p. 1102-1107, 2010.
- WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 369-376, 2005.
- WHO, World Health Organization. *First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*, Geneva, 2010.
- WHO, World Health Organization. *Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases*, Geneva, 2017.
- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.
- WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, p. 578-585, 2013.
- WU, J.; ZHENG, Y.; WEN, X.; LIN, Q.; CHEN, X.; WU, Z. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation *in vitro* and *in vivo*. *Biomedical Materials*, v. 9, n. 3, 2014.
- WU, H.; LIAO, C.; JIAO, Q.; WANG, Z.; CHENG, W.; WAN, Y. Fabrication of core-shell microspheres using alginate and chitosan-polycaprolactone for controlled release of vascular endothelial growth factor. *Reactive and Functional Polymers*, v. 72, p. 427-437, 2012.
- WU, Y.; YANG, W.; WANG, C. H.; HU, J.; FU, S. H. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 295, p. 235-245, 2005.
- WURDACK, J. J. *Uma nova Melastomataceae de Minas Gerais*. *Boletim do Museu Botânico Municipal*, v. 10, p. 1, 1973.
- XIAO, Y.; LI, B.; LIU, J.; MA, X. Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 β -stimulated human chondrocytes. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, p. 3987-3992, 2018.
- XIAO, J.; YU, H.; YANG, J. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum arabic. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1267-1272, 2011.
- YAN, B.; CHENG, L.; JIANG, Z.; CHEN, K.; ZHOU, C.; SUN, L.; CAO, J.; QIAN, W.; LI, J.; SHAN, T.; LEI, J.; MA, Q.; MA, J. Resveratrol inhibits ROS-promoted activation and glycolysis of pancreatic stellate cells via suppression of miR-21. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, n. 1346958, 2018.
- YARDLEY, V.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 61, n. 2, p. 193-197, 1999.
- YOKOYAMA, M.; SATOH, A.; SAKURAI, Y.; OKANO, T.; MATSUMURA, Y.; KAKIZOE, T.; KATAOKA, K. Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size. *Journal of Controlled Release*, v. 55, n. 1-2, p. 219-229, 1998.
- YONGSHENG, Y.; YONGCHUN, O.; CHENGMAI, R.; YUANGUO, C.; FENQIN, Z. Trypanocidal value of liposomal diminazene in experimental *Trypanosoma brucei* evansi infection in mice. *Veterinary Parasitology*, v. 61, n. 3-4, p. 349-352, 1996.

- YOSHIDA, P. A.; YOKOTA, D.; FOGGIO, M. A.; RODRIGUES, R. A. F.; PINHO, S. C. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. *Journal of Microencapsulation*, v. 27, p. 416–425, 2010.
- YU, L.; YAN, J.; SUN, Z. D-limoneno exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, p. 2339-2346, 2017.
- ZAMBAUX, M. F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M. J.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release*, v. 50, p. 31–40, 1998.
- ZHANG, C.; ZHANG, S.; ZHI, D.; CUI, J. Cancer treatment with liposomes based drugs and genes co-delivery systems. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 28, p. 3319- 3332, 2018a.
- ZHANG, Y. R.; LIN, R.; LI, H. J.; HE, W. L.; DU, J. Z.; WANG, J. Strategies to improve tumor penetration of nanomedicines through nanoparticle design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 11, n. 1, e1519, 2018b.
- ZHANG, M.; KIM, J. A.; HUANG, A. Y. Optimizing tumor microenvironment for cancer immunotherapy: beta-glucan-based nanoparticles. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. 341, 2018.
- ZHANG, Y.; FENG, J.; MCMANUS, S. A.; LU, H. D.; RISTROPH, K. D.; CHO, E. J.; DOBRIJEVIC, E. L.; CHAN, H. K.; PRUD'HOMME, R. K. Design and solidification of fast-releasing clofazimine nanoparticles for treatment of cryptosporidiosis. *Molecular Pharmaceutics*, v. 14, n. 10, p. 3480-3488, 2017.
- ZHANG, L.; SALSAC, A. Can sonication enhance release from liquid-core capsules with a hydrogel membrane? *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 368, p. 648–654, 2012.
- ZHANG, H.; ZAN, J.; YU, G.; JIANG, M.; LIU, P. A combination of 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulation studies of benzimidazole-quinolinone derivatives as iNOS inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 11210-11227, 2012.
- ZHANG, L.; FENG, L.; JIA, Q.; XU, J.; WANG, R.; WANG, Z.; WU, Y.; LI, Y. Effects of β -glucosidase hydrolyzed products of harpagide and harpagoside on cyclooxygenase-2 (COX-2) *in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 4882-4886, 2011.
- ZHANG, L.; PORNATTANANGKUL, D.; HU, C. M. J.; HUANG, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 6, p. 585-594, 2010.
- ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 83, p. 761–769, 2008.
- ZHANG, J.; CHEN, X. G.; LI, Y. Y.; LIU, Ch. Sh. Self-assembled nanoparticles based on hydrophobically modified chitosan as carriers for doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3, p. 258–265, 2007.
- ZHONG, Y.; ZEBERL, B. J.; WANG, X.; LUO, J. Combinatorial approaches in postpolymerization modification for rational development of therapeutic delivery systems. *Acta Biomaterialia*, v. 73, p. 21-37, 2018.
- ZHONG, H. J.; LIU, L. J.; CHONG, C. M.; LU, L.; WANG, M.; CHAN, D. S. H.; CHAN, P. W.; H.; LEE, S. M. Y.; MA, D. L.; LEUNG, C. H. Discovery of a natural product-like iNOS inhibitor by molecular docking with potential neuroprotective effects *in vivo*. *PloS ONE*, v. n. 4, 2014.
- ZIANI, K.; CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 6247–6255, 2011.