



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

---



**NILZA DE LUCAS RODRIGUES BITTENCOURT**

**ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E  
SUBFRAÇÕES OBTIDAS DE *Anthemis tinctoria***

---

Maringá, 2007

---

**NILZA DE LUCAS RODRIGUES BITTENCOURT**

**ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E  
SUBFRAÇÕES OBTIDAS DE *Anthemis tinctoria***

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Co-orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez

Maringá, 2007

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho com muito amor e carinho às minhas sobrinhas, Natalia e Giovanna.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, obrigada por guiar meus passos. Obrigada por mais uma batalha vencida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao professor e doutor Celso Vataru Nakamura pela atenção, ensino e paciência neste nosso período de aprendizagem e aperfeiçoamento de meus conhecimentos.

Ao professor doutor Diógenes Aparício Garcia Cortez por todo seu conhecimento e grande contribuição no estudo dos parâmetros fitoquímicos.

Ao doutor Cirino Correia Junior da EMATER-PR que muito contribuiu para a realização deste trabalho com a identificação da planta estudada.

A doutora Cláudia Moraes de Rezende pela análise cromatográfica realizada no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos professores, Tânia Ueda Nakamura, Benício Alves de Abreu Filho, Benedito Prado Dias Filho, Maria Cristina, Tognim obrigado por todo o aprendizado nestes longos anos de jornada.

A toda minha família, meu pai, minha mãe, meu irmão e cunhada, obrigada pela participação e incentivo.

À Carlos Henrique Lopez, meu muito obrigada por estar ao meu lado sempre com entusiasmo, reanimando-me nos momentos difíceis e não me deixando desistir nunca. Você é meu melhor amigo e companheiro. É meu porto seguro.

A Adriana de Oliveira Santos meu muito obrigada pela ajuda na parte de microscopia e outras dúvidas, sempre disposta e prestativa.

As Éricas: Izume e Ramos, pelas dicas e orientações na utilização dos equipamentos.

As colegas de turma, Simone Hernandez, Eliana H. Endo e Telma Onozato, obrigada por terem sido prestativas no transcorrer dos créditos, num momento onde eu precisei de apoio e ajuda.

Ao colega Rodrigo Hinojosa Valdez, pelas nossas longas jornadas em alguns experimentos.

A Raissa Pedroso Bocchi por estar sempre disposta e alegre, mesmo quando estava ensinando a montar pranchas

A Andréia Koroishi e Amanda, obrigada pela amizade sincera.

A sempre colega Marinete Martinez Vicentim, obrigada pelo apoio e, desculpe-me por alguma chatice.

A Márcio Guilhermeti, a professora Lourdes Botelho Garcia e ao professor Celso Luis Cardoso, que apesar de alguns contratempos muito contribuíram para meu conhecimento no trabalho de laboratório em Microbiologia

A D. Prisciliana , D. Zelita e Maria, muito obrigada, por toda a dedicação e trabalho prestados, pois sem vocês a estrada teria sido muito mais longa, trabalhosa e com certeza cansativa.

A todos os colegas que por aqui passaram, para outros caso tenha esquecido e para os novos: obrigada pela convivência em harmonia, de respeito e cooperação.

A todos que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

## **PARA ALGUMAS PESSOAS MUITO ESPECIAIS**

**Minha família:** meu Pai, minha Mãe, meu irmão Roberto, minha cunhada Valdete e as minhas sobrinhas Nathalia e Giovanna. Vocês são muito importantes para mim. Não tenho palavras , em fim só tenho que agradecê-los por mais esta vitória, apesar de tantos contratempos. Vocês dão sentido maior a tudo que busco e faço de melhor para minha vida.

**Carlos Henrique Lopez:** sem você tudo seria mais difícil e sem graça. Obrigada meu amor por ter estado junto a mim, sempre.

**Antônio Rodrigues de Souza:** Tio Antonio: ao senhor serei eternamente grata. Ensinou-me a não desistir nunca e, principalmente, o valor da humildade. Sempre me incentivou com o seu otimismo, mesmo que não o soubesse. Sua batalha em seus estudos, sua conseqüente vitória, e entusiasmo por sua profissão é um exemplo para todos.

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3 CONCLUSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>17</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>23</b>

## Revisão Bibliográfica

Os tripanosomatídeos pertencente a família Trypanosomatidae, compreendem numerosas espécies de protozoários uniflagelados, sem cloroplastos, e com uma estrutura citoplasmática característica constituída por uma rede de DNA extranuclear compactada na mitocôndria única, o cinetoplasto (HONIGBERG et al., 1964; LEVINE et al., 1980), que parasitam protozoários, metazoários invertebrados, metazoários vertebrados, incluindo o homem e vegetais (VICKERMAN, 1976).

A família Trypanosomatidae abriga protozoários que são agentes de importantes doenças em humanos e animais como a leishimaniose e a doença de Chagas. Nesta família também estão incluídos protozoários causadores de doenças em plantas como as *Phytomonas*, e ainda alguns tripanosomatídeos como a *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas*, que são protozoários monoxênicos geralmente encontrados em hospedeiros que não são capazes de transmitir doenças parasitárias em hospedeiros vertebrados (WALLACE, 1966).

A doença de Chagas é um importante problema médico da América Latina, afetando 18 milhões de pessoas e causando doença em 45000 pacientes anualmente (WHO, 2002). A espécie *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que pertence ao filo Protozoa, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Tripanosomatina, família Trypanosomatidae, sub-família Triatominae, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum* (PESSOA, 1972) e, sendo portanto, o agente etiológico da doença de Chagas, endêmica em muitos países da América Central e do Sul. O *T. cruzi* é transmitido por hospedeiros mamíferos, incluindo o homem (MacRae, 2006).

Em anos recentes, importantes programas para a doença têm sido estabelecidos para o controle e transmissão do parasita do inseto para o homem e, de pessoa para pessoa durante a transfusão de sangue. Estudos usando análise enzimática, análise por marcação, atividade promotora do RNAr, seqüenciamento gênico e marcação por sonda tem mostrado claras evidências que o *T. Cruzi* não é uma espécie separada mas corresponde a dois subgrupos altamente divergentes geneticamente, designado como Tipo 1 e 2 (BRIONES, 1999). O Tipo 1 predomina no ciclo doméstico enquanto o Tipo 2 é muito mais representativa no ciclo silvestre (BRISSE, 2001). Ambos subgrupos são patogênicas para o homem. Portanto, é importante intensificar trabalhos básicos sobre a biologia do parasita e na seqüência desenvolver novas estratégias no controle da doença. (De SOUZA, 2002).

Os protozoários da família Trypanosomatidae apresentam durante seu ciclo de vida, algumas formas que podem facilmente ser identificadas por microscopia de campo claro e em preparações por coloração de Giemsa. No caso do *T. Cruzi* as seguintes formas podem ser identificadas: Amastigota, também conhecida como esferomastigota, forma aflagelada, ou forma leishimaniã. Estudos realizados usando formas amastigotas obtidas de diferentes origens têm mostrado que eles são capazes de se dividirem e também infectar células de vertebrados (CARVALHO e De SOUZA, 1986; LEY et al., 1990). Os

epimastigotas tem flagelo longo com 20-40  $\mu\text{m}$  com kinetoplasto localizado anterior ao núcleo. Estas formas são capazes de se dividir e podem ser observadas na fase logarítmica de crescimento e em culturas axênicas. Epimastigotas são também encontradas em células de vertebrados no final do ciclo intracelular quando as esferomastigotas transformam-se em tripomastigota (MEYER e DE OLIVEIRA, 1948; TYLER e ENGMAN, 2001). Os tripomastigotas são formas que tem comprimento aproximado de 25  $\mu\text{m}$  e diâmetro em torno de 2  $\mu\text{m}$ . O kinetoplasto está localizado posteriormente ao núcleo. Eles podem ser observados em cultura de células e em sangue de hospedeiros vertebrados, no intestino posterior, nas fezes e urina de hospedeiros invertebrados, na fase estacionária de crescimento de culturas axênicas e na fase líquida em culturas de células (ZELEDON, 1997).

O *T. cruzi* apresenta ciclo de vida complexo em diferentes hospedeiros (BRENER, 1973). Em mamíferos multiplica-se intracelularmente como amastigota e em seguida ao chegar a corrente sanguínea passa a forma tripomastigota. Estas formas podem infectar novas células ao serem ingeridas pela picada do triatomíneo. No intestino médio do inseto, formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas sendo estas diferenciadas em tripomastigotas metacíclicas, formas infectantes, as quais são disseminadas juntamente com as fezes do invertebrado penetrando via mucosa no momento da picada. Essas formas infectantes podem chegar a circulação sanguínea e finalmente penetrar nas células, completando assim o ciclo de vida do parasita (MENDONÇA-PREVIATO et al., 1983).

A estrutura organizacional da composição bioquímica da membrana plasmática de *T. cruzi* tem sido objeto de vários estudos (De SOUZA, 2002). Um dos aspectos característicos dos protozoários Trypanosomatidae é a presença de uma camada de microtúbulos localizada abaixo da membrana plasmática e designada como microtúbulos subpeliculares. Esta associação é provavelmente responsável pela rigidez da célula e dificulta encontrar a forma do mecanismo de ruptura da célula. Ocasionalmente um ou mais microtúbulos podem ser necessários especialmente na região de conexão do flagelo ao corpo celular do protozoário (BAETA SOARES e De SOUZA, 1977; SOUTO-PADRON et al., 1984).

Os membros da família Trypanosomatidae têm um flagelo que emerge de uma invaginação chamada de bolsa flagelar. A proporção do comprimento total do flagelo depois que ele sai da região da bolsa flagelar é variável de acordo com o estágio de desenvolvimento. As formas esferomastigotas do *T. cruzi* têm um flagelo curto com comprimento de 1  $\mu\text{m}$ . Entretanto no final do ciclo intracelular do parasito ocorre uma elongação do flagelo para aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . Este fato faz com que o flagelo do *T. cruzi* seja um modelo de estudo adequado para estudar o efeito no crescimento natural desta estrutura (MARTINEZ-PALOMO et al., 1976; De SOUZA, 1978). Todo tripanosomatídeo apresenta uma região conhecida como bolsa flagelar com aparência de uma depressão encontrada na região anterior da célula de onde emerge o flagelo (WEBSTER e RUSSEL, 1993). Ela é formada por uma invaginação da membrana plasmática a qual estabelece uma continuidade direta com a membrana do flagelo (De SOUZA, 1989).

O kinetoplasto e a mitocôndria são estruturas presentes em *T. cruzi*. Este protozoário bem como outros membros da família Trypanosomatidae possuem somente uma mitocôndria, a qual se estende por

todo o corpo celular. Numa porção da mitocôndria localizada perto do corpo basal, há um arranjo complexo de fibras de DNA na matriz mitocondrial o qual forma a estrutura conhecida como Kinetoplasto. Esta estrutura identifica a ordem kinetoplastida a qual a família Trypanosomatidae pertence (SIMPSON, 1972)

O estágio epimastigota dos membros do gênero *Trypanosoma*, pertencente ao sub-gênero *Schizotrypanum*, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma vespertilionis* e *Trypanosoma dionisii*, apresentam uma bolsa flagelar que difere na forma daquelas encontradas em outros estágios de desenvolvimento. No caso das formas epimastigota e amastigota dos membros do sub-gênero *Schizotrypanum* há uma estrutura altamente especializada conhecida como citóstoma. Esta estrutura tem forma de funil formada por uma invaginação profunda da membrana plasmática que pode alcançar a região nuclear. Esta complexa abertura conhecida como citóstoma pode atingir um diâmetro de 0,3 µm (MARTINEZ-PALOMO et al.,1976; De SOUZA et al.,1978). Outra forma de estrutura tubular pode ser observada na porção mais central desses protozoários (SOARES, 1992), os reservossomas. Todas as formas epimastigotas apresentam diversos reservossomas localizados principalmente na região posterior da célula. Esta organela pode ter diâmetro de 0,7 µm e estudos citoquímicos têm mostrado que a matriz é formada principalmente de proteínas e inclusões contendo lipídeos (SOARES e De SOUZA, 1988).

Em cortes ultrafinos e longitudinais de tripanosomatídeos o retículo endoplasmático é visto por toda parte do corpo do protozoário. Em alguns casos o corte do retículo endoplasmático atinge a periferia da célula estabelecendo contato com a membrana plasmática e microtúbulos (PIMENTA e De SOUZA, 1985). As cisternas do complexo de Golgi, as quais variam em tamanho de acordo com espécie são também observadas no interior da porção do corpo próximo do kinetoplasto e da bolsa flagelar (ENGEL, 2000). O núcleo em *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos têm uma estrutura organizacional parecida com a de outras células eucarióticas. Ele é pequeno medindo aproximadamente 2,5 µm. Portanto o núcleo contém toda informação importante para a vida dos tripanosomatídeos e o controle de seus processos de diferenciação e poucos estudos foram feitos com esta estrutura. Em tripomastigotas o núcleo é alongado e localizado na porção central da célula (JOHNSTON et al., 1999).

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica. A doença na fase aguda pode ser sintomática (aparente) ou assintomática (inaparente), a mais freqüente. Ambas estão relacionadas com o estágio imunológico do hospedeiro. Há predomínio da forma aguda sintomática na primeira infância, levando a morte em cerca de 10% dos casos. A fase aguda inicia-se através de manifestações locais, quando o *protozoário* penetra na conjuntiva, sinal de Romanã, ou na pele, chagoma de inoculação. Estas lesões aparecem em 50% dos casos agudos dentro de 4 a 10 dias após a picada do barbeiro, regredindo em um ou dois meses. A fase crônica também pode apresentar-se de forma assintomática e sintomática. A fase crônica assintomática ocorre após a fase aguda sendo chamada de fase indeterminada ou latente, onde ocorre a positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos; ausência de sintomas e/ou sinais da doença; eletrocardiograma convencional normal e coração, esôfago e colón radiologicamente normais

(NEVES, 2000). Portanto, fase aguda é frequentemente assintomática e o desenvolvimento da fase crônica da doença ocorre geralmente 10 a 20 anos após a infecção afetando cerca de 10 a 30% dos indivíduos infectados, sendo as manifestações comuns da fase crônica as patologias gastrointestinais e cardíacas (VIOTTI et al., 1994).

A partir de 1985 passou-se a acreditar que os fatores autoimunes poderiam ser o primeiro fator associado com a patologia da fase crônica da doença de Chagas (KALIL e CUNHA-NETO, 1996). Investigações recentes mostram o parasita ligado com o desequilíbrio da resposta imune que pode incluir reações autoimunes (ENGMAN e LEON, 2002) gerando a manutenção da resposta inflamatória nos tecidos que estão sujeitos a lesões características da fase crônica da doença de Chagas (TARLETON, 2001). Esta descoberta indica que a eliminação do *T. cruzi* do paciente infectado pode ser um pré-requisito para impedir a evolução da doença e evitar a longo prazo suas consequências irreversíveis (SOSA et al., 1998).

Infelizmente, apesar do impressionante avanço no entendimento da biologia do *T. cruzi*, as drogas disponíveis para o tratamento são somente aquelas registradas a mais de 30 anos atrás, sendo estas o nifurtimox e o benzonidazol desenvolvidos em 1960 e 1970. Estes compostos são ativos nos estágios agudos da doença de Chagas com eficácia em torno de 80%, e o benzonidazol é eficaz em infecções crônicas recentes (SOSA, 1998), mas tem efeito limitado na fase crônica avançada da doença. O efeito colateral de ambos pode ser bastante severo (CROFT, 2005), como efeitos incluindo anorexia, vômito, polineuropatia periférica e alergias dermatológicas (URBINA, 2002). São drogas altamente tóxicas ao hospedeiro e possuem atividade limitada conforme a susceptibilidade de diferentes cepas de *T. cruzi* (MAYA, 1997; VELOSO, 2001). O mecanismo de ação de drogas ativas contra o *T. cruzi* parece ser através da liberação de radicais livres como no caso do nifurtimox e pela inibição da respiração, da síntese de proteínas e RNA exercido pelo benzonidazol (POLAK & RICHLE, 1978; DOCAMPO & MORENO, 1985).

As substâncias que agem na biossíntese de esterol têm sido uma alternativa na quimioterapia antimicrobiana. Muitos agentes antifúngicos que agem em enzimas ou produtos da biossíntese de esterol, incluindo os antifúngicos azoles, alilamina e polienos, têm mostrado potente efeito contra *T. cruzi* (VIVAS, 1996; URBINA, 2003). O itraconazol usado no tratamento da doença de Chagas tem mostrado cura parasitológica de 53% (APT, 1998). A terbinafina, droga antifúngica alilamina, mostrou ser sinérgica com o cetoconazol contra culturas de *T. cruzi* (LAZARDI et al., 1990). Portanto vários outros caminhos são promissores, como por exemplo os inibidores da síntese da tripanotona (SCHMID et al., 2002) e inibidor do metabolismo da guanina hipoxantina fosforibose transferase (URBINA, 2003)

Drogas tripanocidas com menos efeitos colaterais são urgentemente necessárias. Neste contexto as plantas fornecem diversidade química e biológica a qual tem ajudado no desenvolvimento de centenas de drogas farmacêuticas (CALIXTO, 2000). Diversos estudos têm mostrado que os extratos de plantas

apresentam notável atividade antiprotozoário. Serrano e colaboradores (2000) selecionaram 79 extratos de diferentes famílias de plantas da América e testaram suas atividades frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y. Neste estudo nove extratos mostraram-se ativos.

Portanto, como pode ser visto, o uso de plantas medicinais como medicamentos para o tratamento de várias doenças é bastante comum e vêm de tempos antigos, sendo que até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais (SCHENKEL et al., 2000). As plantas são um recurso ao alcance do ser humano. Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seus conhecimentos afim de melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. É de supor que no passado o homem quando acometido de seus males, recorria à alguma fonte de poder curativo. O homem intuitivamente buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas, como nutrição, reprodução e proteção humana. Gerido pela experiência, manifestava inteligência, fruto de sua própria evolução biológica para a produção de alternativas que atendessem suas necessidades. Nesta perspectiva da pesquisa natural, o homem encontrou nas chamadas plantas medicinais, virtudes, cujo valor tornou-se reconhecido e por tantas vezes, foi considerado como mágico e até alquimista, sendo transmitido de geração à geração (MIGUEL, 2000).

Nas origens da história, a noção das plantas terapêuticas e tóxicas passou a ser objeto de interesse. Estudos realizados na Tanzânia, com chimpanzés, verificaram que estes ingeriam em jejum, folhas de certas plantas que os livraram de vermes intestinais. Arqueólogos encontraram em túmulos pré-históricos, partes de plantas tidas como medicinais. No ano de 1975, no território atual do Iraque, foi descoberto um esqueleto humano de quase 60 mil anos de idade. Junto a este foi encontrado petrificada pequena quantidade de pólen concentrado de achilea e jacinto, utilizados até hoje por camponeses da região (OTTE, 1994).

Inúmeros documentos importantes que marcaram a evolução histórica das plantas medicinais são citados por Pelt (1993) e Otte (1994) entre eles, como, os fragmentos do **Papyrus Ebers**, considerado o primeiro tratado de medicina egípcia, datado do séc. XVI a.C., o qual já relatava sedativos, extraídos de Ephedra, o uso habitual do salgueiro e acácia. Da casca do salgueiro em 1829 foi isolado pela primeira vez uma substância denominada salicina, que muitos anos depois na Alemanha viria a servir de precursor na síntese química do ácido salicílico. Posteriormente em 1889 a Bayer alemã, produzia o ácido acetil salicílico, analgésico de uso universal (GEREZ, 1993).

Num estágio mais avançado da história do uso de plantas medicinais foram criadas teorias e observações que muito contribuíram para a atualidade da ciência médica moderna. Surge assim a Fitoterapia, nome vindo da palavra grega *phiton* (plantas) e *therapeia* (tratamento), ou seja tratamento por meio de plantas (GUYOT, 1990). No entanto, os produtos naturais, especialmente após a Segunda Guerra Mundial, foram esquecidos, acreditando-se obter fármacos somente através da síntese de um grande número de compostos e seu teste ao acaso, sem nenhuma orientação. Somente por volta de 1970, quando a Organização Mundial da Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa (paradigma oriental à base de extratos = misturas), e com o surgimento de alguns importantes medicamentos obtidos de fontes

naturais, foi que cientistas e indústrias voltaram a se interessar por este ramo. Pode-se, assim, observar que, atualmente, os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem é de aproximadamente 70%.

Durante estes anos, foi se realizando um processo de mudanças muito importantes. Podemos indicar os avanços na área da biologia molecular que, com o mapeamento genético, possibilitou o surgimento de novos alvos biológicos, passando de cerca de 5 mil para 10 a 15 mil. A pesquisa orgânica sintética, através da química combinatória, e em pouco tempo mais da química biocombinatória, permite sintetizar milhares de compostos em curto espaço de tempo, enquanto um bom químico medicinal conseguiria, anteriormente, obter no máximo 100 novos compostos por ano (YUNES e CALIXTO, 2001).

Devemos considerar que a diversidade molecular, associada aos produtos naturais, é maior que qualquer outra fonte (HENKEL et al., 1999). Assim, a diversidade molecular é um fator importante para a procura em plantas de novas moléculas, significa, também, diferentes propriedades físico-químicas, que representam um desafio para o químico que pretende isolar e determinar a estrutura de compostos ativos, uma vez que um extrato de determinada planta pode conter centenas ou milhares de compostos (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991). Desta forma, numerosos métodos de extração e estudo de compostos, oriundos de plantas, têm sido sugeridos pela literatura pertinente. Porém, no caso da procura de princípios ativos, não interessa o composto mais fácil de separar, ou aquele que se encontra em maior concentração, ou ainda, aquele que possui a estrutura mais complexa. O que realmente interessa, neste caso, é descobrir compostos que apresentam atividade biológica. Daí a importância e necessidade de estudos fitoquímicos guiados pelos bioensaios, seja *in vivo* ou *in vitro* (YUNES e CALIXTO, 2001)

As plantas, como medicamento, têm sido utilizadas por grande parte de nossa população, em diversos países industrializados, estas possuem significativa representação, pois, como afirma Jorquera (1993), dos 173 bilhões de dólares em fármacos consumidos em 1990, a quase vinte anos, cerca de 25% já continham pelo menos um componente de origem vegetal, ou eram sintetizados a partir destes. As plantas são utilizadas em quase todo mundo como matéria-prima, na forma de extratos, óleos essenciais e substâncias químicas puras e semi-sintéticas. No entanto, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, em proporção majoritária, oriundos de pesquisas científicas realizadas na China, na Coreia e no Japão, sendo que a contribuição dos países ocidentais neste período foi bem menor (LOSOYA, 1997).

Muitas plantas estudadas cientificamente com efeito farmacológico já comprovado, marcam importante contribuição à Fitoterapia, no uso cotidiano, como exemplo pode-se citar algumas como ipecacuanha *Cephaelis ipecacuanha* (Rubiaceae) de onde se extrai a emetina, poderoso emético que, em doses menores pode ser usado como expectorante, ou no combate às disenterias amebianas. Outra planta muito utilizada é a beladona, *Atropa belladonna* (Solanaceae), da qual se extrai atropina e hiosciamina utilizada como estimulante do sistema nervoso e antiespasmódica, ou então o alho *Allium sativum* (família

Liliaceae) do qual se extrai a alicina com ação antimicrobiana e inibidor da agregação plaquetária, rico em vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, ácido nicotínico (GUYOT, 1990). Assim poderíamos enumerar centenas de vegetais já estudados e identificados.

Portanto, plantas medicinais têm sido usadas desde tempos antigos como medicamentos para o tratamento de várias doenças. As plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos, e pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SCHENKEL et al., 2000). Apesar do grande avanço observado na medicina moderna em décadas recentes, as plantas ainda têm uma importante contribuição nos cuidados com a saúde (CALIXTO, 2000). Um acentuado crescimento no mercado de fitoterápicos mundial tem ocorrido nos últimos 15 anos. Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas (FARNSWORTH et al., 1976; DE SMET, 1997; CRAGG et al., 1997; SHU, 1998). Assim, cerca de 75% dos compostos puros naturais, empregados na indústria farmacêutica, foram isolados, seguindo recomendações da medicina popular. Outros aspectos importantes que devem ser levados em consideração são as informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas. Como a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes da planta (CECHINEL e YUNES, 1998), parece mais viável estudar, inicialmente, aquela empregada na medicina popular e, posteriormente, as outras partes da planta, que também podem conter princípios ativos. Outro ponto a ser enfatizado é sobre a influência dos fatores ambientais na biossíntese dos metabólitos secundários, como clima, tipo de solo, época de coleta, etc. (VANHAELEN et al., 1991; BAUER; TITTEL 1996; HOUGHTON; RAMAN, 1998).

Portanto, as plantas medicinais têm significado um marco na história do desenvolvimento de diversas nações. Alguns países tem tomado consciência de seu potencial em recursos naturais, e tem convertido seus esforços em favorecimento de programas de desenvolvimento agrícola e industrial. A Índia, por exemplo, tornou-se um dos maiores exportadores de grandes variedades de plantas medicinais e condimentares; o Kênia satisfaz 70% das necessidades mundiais de piretrina utilizada como inseticida; Servia e Montenegro (antiga Yugoslávia) destaca-se na exportação de sálvia; o República democrática do Congo (antigo Zaire) na exportação de papaína e quinina; o Marrocos de verbena e sene; e o Panamá de ipecacuanha (UGAZ, 1994).

Neste contexto, o Brasil tem exportado itens como o guaraná, as algas medicinais, o cumarú e a arruda, resultando em arrecadação de um milhão de dólares. Por outro lado, importa em maiores quantidades alcaçúz (*Glycyrrhiza glabra*), o orégano (*Origanum sativum*) e o boldo (*Peumus boldus*). Nossa potencialidade agrícola poderia reverter tal quadro se houvessem programas de incentivo ao cultivo de espécies medicinais (MIGUEL, 2000), uma vez que, muitas plantas do bioma brasileiro, como cerrado, floresta atlântica e amazônica tem sido usada pela medicina natural (ALVES et. al., 2000). Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil e incorporadas na medicina folclórica (DUARTE, 2005).

Mesmo sendo grande a utilização de plantas na medicina popular, para a grande maioria dos fitoterápicos comercializados faltam evidências laboratoriais comprovatórias de eficácia e segurança, sendo que seus supostos méritos terapêuticos devem-se principalmente a informações empíricas e subjetivas da medicina folclórica (BRAGANÇA, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde, por causa da pobreza e a dificuldade no acesso na medicina moderna, 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para cuidados primários com a saúde (BRAGANÇA, 1996). Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas (FARNSWORTH et al., 1976) e há dados que indicam a alta correlação entre o uso popular e experimentos de atividade farmacológica (BRITO et al., 1993). A maioria das Companhias Farmacêuticas tem demonstrado interesse na investigação de plantas como fontes de novas estruturas e também para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados que mostrem eficácia, segurança e qualidade (BREVOORT, 1995; DE SMET, 1997; BLUMENTHAL, 1999).

Urge neste momento um estudo sistematizado, amplo e globalizador, sob o enfoque interdisciplinar, com a finalidade de viabilizar o desenvolvimento científico-tecnológico dos fitoterápicos pela indústria nacional. De acordo com as perspectivas da modernidade, a saúde do futuro estará voltada para a medicina preventiva, onde a ciência buscará na natureza meios profiláticos que auxiliem o homem na defesa de seus males (MIGUEL, 2000). Portanto, as plantas as quais produzem uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas, permitem o desenvolvimento de novas drogas como tratamento (AHMAD e BEG, 2001) para as mais variadas doenças, entre elas a doença de Chagas. Assim, a planta *Anthemis tinctoria* L. do gênero *Anthemis*, é uma das plantas estudadas na tentativa de se obter uma nova droga que seja capaz de auxiliar no tratamento da doença de Chagas. O gênero *Anthemis* pertence à ordem Asterales e a família Asteraceae ou Compositae, sendo que este compreende cerca de 1.100 gêneros com aproximadamente 25.000 espécies de ampla distribuição, bem representadas em regiões subtropicais e temperadas (BARROSO, 1986).

A família Compositae é uma das mais numerosas entre as plantas do grupo das que produzem flores, as Angiospermae. Esta família está distribuída através do mundo e seu desenvolvimento dentro do processo evolutivo tem sido bastante ativo, estão incluídas entre as polinizadas por insetos e também pelo vento (CRONQUIST, 1988). Pouco frequentemente, Compositae polinizadas por insetos podem ter seu pólen produzindo sintomas alérgicos (LEWEIS, 1979 e COHEN, 1979). Desta maneira diversos casos de reações anafiláticas têm sido relatadas depois da aplicação de cataplasma com chás de ervas contaminado com pólen da camomila (*Matricaria chamomila*), planta também pertencente a esta mesma família (BENNER, 1973 e SUBIZA, 1989).

O gênero *Anthemis* L., apontado por Brener (1994) tribo Anthemideae (sub-tribo Anthemidinae a família Asteraceae abrange 210 espécies (ÇELIK, 2005) as quais ocorrem em regiões do Mediterrâneo, sudeste e Ásia central e oeste e sul da África (OBERPRIELER, 2001). Sendo que 62 espécies encontram-se na Europa (Fernandes, 1976) e 50 têm sido relatadas na Turquia (Daves, 1975) representando uma taxa

endêmica de 54% de seu total nessas regiões e ainda presentes em outras regiões do globo. Essas plantas preferem lugares secos, abertos, florestas de estepes e terrenos com declive onde crescem especialmente em sustratos calcários naturais (UZEL, 2004).

As espécies do gênero *Anthemis* são largamente usadas na indústria farmacêutica de cosméticos e alimentos. Desde a antiguidade até o presente algumas delas são usadas como ervas medicinais, inseticidas e tintas ou corantes (MABBERLEY, 1997) As flores têm seu uso bem conhecido como anti-séptico e propriedades medicinais e apresentam compostos do tipo flavonóides bem como óleos essenciais (VAVERKOA et al., 2001). Na Europa extratos, tinturas, chás e pomadas, são largamente usados como anti-inflamatórios, antibacterianos, antiespasmódicos e agentes sedativos (MANN e STABA, 1986). O gênero *Anthemis* apresenta-se bastante rico em número de espécies, e com base em seu uso pela medicina popular suas espécies têm sido muito estudadas quanto a suas propriedades. Entre as espécies estudadas pode-se verificar uma grande variação de compostos químicos e óleos essenciais o que as tornam também um grupo de estudo de grande interesse. Portanto, alguns grupos em especial podem ser destacados. *Anthemis xylopoda* é uma planta endêmica da região da Turquia de distribuição bastante restrita. Ela está incluída numa categoria de plantas perigosas (EKIM et al., 2000). No entanto, é conhecida com relação a sua atividade antimicrobiana, característica de seu óleo essencial (UZEL, 2004). Na Turquia ainda se pode encontrar distribuída de maneira endêmica a espécie *Anthemis wiedemanniana*, bem como em outras regiões do oriente médio e também em muitas partes do mediterrâneo (DAVIS, 1975; STRID e TAN, 1999). Esta espécie é conhecida pela medicina folclórica no tratamento de tosse e resfriados (ÖZTÜRK e ÖZÇELİK, 1991). *A. wiedemanniana* é uma espécie muito diferente de aparência em relação a outras de mesmo parentesco, no entanto suas folhas são bastante parecidas com *A. tinctoria* (KONSTANTINOPOULOU et al., 2003). Foi verificada a presença de lactonas sesquiterpênicas em *A. wiedemanniana* por Çelik (2005).

*Anthemis aetnensis* cresce em cinzas vulcânicas do monte Étna na Sicília (FLORA EUROPAEA, 1976). Estudos com as partes aéreas da planta *Anthemis hydruntina* endêmica no sul da Itália tem levado ao isolamento do composto hidruntinolideo (DI BENEDETTO, 1991). Pavlivić e colaboradores (2005) descreveram a presença de constituintes fenólicos em uma erva perene *A. triumfetti* com 30-90 cm de altura que cresce em bosque e lugares rochosos e montanhosos da região de Montenegro. Em terrenos arenosos na parte leste da Sérvia cresce a *A. arvensis*. Nesta espécie foram encontrados cinco poliacetilenos na raiz e seis nas folhas (BOHLMANN et al., 1963, 1965), e isolados lactonas sesquiterpênicas por (VUCKOVIC et al., 2006).

*Anthemis cotula*, popularmente conhecida como “manzanilla del campo” é uma espécie nativa da Europa e também cresce como uma erva daninha na Argentina. Ela é usada como febrífugo e antiespasmódico, e para o tratamento da disenteria e gota. A decocção das flores e folhas são também usadas como inseticida (AMAT, 1983; ZARDINI, 1984). Seu extrato contém flavonóides que quando testado em concentrações de 200 µg/ml, apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas (QUARENGHI, 2000). Foi encontrado como constituinte de *A cotula* dentre as variedades de lactonas, uma delas de estrutura não comum apresentando propriedades alérgicas (BOHLMANN et al., 1969; BARUAH, 1985). *A. pseudocotula* é uma espécie comum cultivada em lugares próximos ao monte Sinai. O estudo feito com o extrato de suas partes aéreas revelou a presença lactonas sesquiterpênicas (ABOU EL-ELA, 1990).

As espécies *Anthemis cretica* e *Anthemis montana* são originárias da parte norte posicionada entre a Servia e a Macedônia. Estas espécies, geralmente ocorrem em terrenos altos, rochosos e cobertos por gramíneas no sul da península dos Balquimas (GAJIC, 1975). Dois novos tipos de guanolídeos foram identificados em *A. cretica* por Vajs e colaboradores, em 1999. Foram feitos também estudos da parte aérea de *A. carpatica* coletada em locais diferentes das montanhas e foram descobertos vinte novos guanolídeos oxigenados e seis deles contendo um grupo hidroperóxido (BULATOVIC et al., 1998). O sul da Itália é uma região endêmica para a *A. plutonia* e o estudo com esta espécie demonstrou a presença de lactona sesquiterpênica muito similar aos guaianolídeos já encontrados em *A. hydrundina* e *A. aetnenses*. Um estudo feito com as partes aéreas de *A. alpestre* coletada na região da Espanha também revelou a presença de uma lactona sesquiterpênica (BRUNO, 1998; 2002).

*Anthemis nobilis* L. ou camomila Romana é nativa no norte da Europa e oeste da Ásia, e é uma das mais importantes ervas medicinais cultivadas no mundo. Suas flores têm sido usadas com finalidade medicinal e seu óleo essencial geralmente obtido de suas partes aéreas é usado como fragrância em shampoos, sabonetes e perfumes. O azuleno presente no óleo essencial tem excelente valor medicinal pois apresenta propriedades anti-inflamatórias (ARCTANDER, 1960). Muitos estudos fitoquímicos têm sido realizados com o óleo essencial de *A. nobilis* que crescem nos campos e já foram identificadas em torno de 100 substâncias (KLIMES, 1984; BICCHI, 1987). Omoto (1998) detectou um composto presente nas raízes da planta que geralmente não é encontrado em outras plantas parentais de *A. Nobilis* chamado de geranil.

Segundo Masterová (2005) a planta *Anthemis tinctoria* L. é uma erva perene cultivada nos países do mediterrâneo, sendo que alguns metabólicos secundários foram identificados nesta espécie como óleos voláteis, triterpenos, poliacetilenos, flavonóides entre outros. Na medicina tradicional, esta planta é usada no tratamento da insuficiência hepática e icterícia (LISZT et. al., 1972).

Informações sobre o emprego medicinal ou uso popular de *A. tinctoria* têm sido bastante incomum e escassas. No entanto recentemente foram isolados alguns flavonóides do capítulo floral desta planta. Um novo estudo do material da planta e uma cromatografia cuidadosa resultou em frações contendo flavonóides procedentes de um glicosídeo flavonóide esterificado com ácido cafeínico o qual é um novo composto natural. O fracionamento do extrato metanólico das flores de *A. tinctoria* com solventes orgânicos seguidos por separação em coluna de Sephadex produziu patuletina, patulitrina e cafeoil

esterificado, um cristal amarelo. Portanto a patuletina 7-O-β-D-6''-cafeoilglicosídeo) foi obtida do extrato metanólico das flores de *A. tinctoria* L (MASTEROVÁ, 2005).

O composto isolado foi identificado por espectroscopia seguido por comparação com amostra autêntica depois de hidrólise enzimática. O novo flavonóide glicosilado, tintosídeo, de *A. tinctoria* foi isolado desta planta pela primeira vez. Assim, alguns flavonóides junto com ácido cafeico podem indicar possibilidade de uso terapêutico, com função antioxidativa e pro-oxidativa. Geralmente a substituição de grupos hidroxila demonstra uma forte atividade antioxidativa e pro-oxidativa (MASTEROVÁ, 2005).

Portanto estudos químicos prévios vêm indicar que lactonas sesquiterpênicas são sistematicamente importantes dentro do gênero. A presença de lactonas sesquiterpênicas em várias espécies de *Anthemis* têm sido descritas por muitos pesquisadores. O primeiro relato na literatura trouxe informação sobre o sabor amargo da nobilina, lactona sesquiterpênica da *Anthemis nobilis* L., uma planta medicinal bem conhecida (BENESOVA et al., 1964). Foi isolada uma lactona acíclica e considerada comum de *Anthemis cotula* L. (BOHLMANN et al., 1969; BARUAH et al., 1985), outras espécies de *Anthemis* inclui a representação dos três maiores tipos de lactonas sesquiterpênicas sendo estes os germacrolídeos, eudesmanolídeos e guaianolídeos (VAJS et al., 1999). Assim, a atividade antimicrobiana do óleo essencial do extrato de diferentes espécies de *Anthemis* têm sido estudadas (HOLLA et al., 2000; GRACE, 2002).

## Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

- Investigar a atividade biológica dos extratos, frações e subfrações sesquiterpênicas obtidos de flores de *Anthemis tinctoria* em formas epimastigotas e trypomastigota de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.
- Verificar alterações morfológicas e ultraestruturais das células tratadas com a subfração ativa o composto obtido das flores de *Anthemis tinctoria* através da utilização de técnica de microscopia ótica e eletrônica de varredura e de transmissão.
- Avaliar o potencial tóxico do extrato bruto, frações e subfrações composto isolados das flores de *Anthemis tinctoria* sobre as células LLCMK<sub>2</sub>.

## **Conclusão**

O extrato, frações e a subfração constituída por composto sesquiterpênico de *Anthemis tinctoria* mostraram ser bastante eficientes sobre *T. cruzi*. Através dos resultados obtidos neste estudo foi possível verificar que as plantas utilizadas na medicina popular podem apresentar, de fato, efeito curativo. Portanto, produtos naturais podem ser uma fonte de novas drogas com alta atividade antiprotozoária e baixa toxicidade. No entanto é necessário que se faça estudos complementares na investigação sobre a aplicabilidade dos compostos isolados na terapia de doenças infecto parasitárias como na doença de Chagas.

## Referências

- ABOU EL-ELA, M.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; AHMED, A. A.; SEIF EL-DIN, A.; KHAFAGI, S.; SABRI, N.; EL-GHAZOULY, M. Seco-germacranolides from *Anthemis pseudocotula*. **Phytochemistry**. V. 29, n°8, p. 2704-2706, **1990**.
- ACTANDER, S. Perfume and flavor materials of natural origins. USA: **Allured Publishing**, **1960**.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 74, p. 113-123, **2001**.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA Jr.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 95, p. 367-373, **2000**.
- AMAT, A. G. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. p. 2-23, **1983**.
- ARCTANDER, S. **Perfume and Flavor Materials of Natural Origin**. p. 154, **1956**.
- BAETA SOARES, T. C.; De SOUZA, W. Z. **Parasitenkd**. V. 53, p. 149, **1977**.
- BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas no Brasil. Viçosa, UFV, **Imprensa . Universitária**. Viçosa, Minas Gerais. V. 03, p.230-272, **1986**.
- BARUAH, R. N.; BOHLMANN, F.; HING, R. M. **Planta Medica**. Vol. 6, p. 551, 1985. *Collect. Czech. Chem. Commun.* Vol.29, p. 30, **1964**.
- BARUAH, R. N.; BOHLMANN, F.; KING, R. M. **Planta Médica**. V. 31, p. 531, **1985**.
- BAUER, R.; TITTEL, G.; **Phytomedicine**. V. 2, p. 193, **1996**.
- BENNER, M.; LEE, H. J. Anaphylatic reaction to chamomile tea. **Journal. Allergy of Clinical Immunology**. V. 52, p. 307-308, **1973**.
- BICCHI, C.; FRATTINI, C.; RAVERDINO, V. L. **Chromatography**. p.411-237, **1987**.
- BLUMENTHAL, M. Herbal industry (?), acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. **HerbalGram**. V. 45, p. 67-68, **1999**.

- BOHLIMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M. **Tetrahedron Letters**. p. 2417, **1969**.
- BRAGANÇA, L. A<sup>a</sup> R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: Universidade Federal Fluminense, p.300, **1996**.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual. Review. Microbiology**. V. 27, p. 347-382, **1973**.
- BREVOORT, P. The U.S. botanical market. An overview. **HerbalGram**. V. 36, p. 49-59, **1995**.
- BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular Biochemistry Parasitology**. V. 104, p. 219-232, **1999**.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**. V.31, p. 1218-1226, **2001**.
- BRITO, A. R. M. S. and BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 39 p. 53-67, **1993**.
- BRUNO, M.; BONDI, L. M.; VASSALLO, N.; GEDRIS, E. T.; HERZ, W. Guaianolides and other terpenoids from *Anthemis aetnensis*. **Phytochemistry**. V. 45, n<sup>o</sup>. 2, p 375-377, **1997**.
- BRUNO, M.; MAGGIO, A.; ARNOLD, A. N.; DIAZ, G.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones from *Anthemis plutonia*. **Phytochemistry**. V. 49, n<sup>o</sup> 6, p. 1739-1740, **1998**.
- BRUNO, M.; ROSSELLI, S.; BONDI, M. L.; GEDRIS, E. T.; HERZ, W. Ssequiterpene lactones of *Anthemis alpestris*. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 30, p. 891-895, **2002**.
- BULATOVIĆ, V. Comparative examination of chemical constituents of species *Anthemis carpatica* and *Anthemis montana*. PhD thesis, **Faculty of Chemistry, University of Belgrade**. p. 57-66, **1998**.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto. V. 33, n<sup>o</sup>. 2, p. 179-189, **2000**.

- CARVALHO, T. U.; De SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**. V. 28, p. 205-212, **1986**.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Quimica Nova**. V. 21, p. 99, **1998**.
- ÇELIK, S.; ROSSELLI, S.; MAGGIO, M. A.; RACCUGLIA, A. R.; UYSAL, I.; KISIEL, W.; BRUNO, M. Sesquiterpene lactones from *Anthemis wiedemanniana*. **Biochemical Systematics and Ecology**. V.33, p. 952-956, **2005**.
- COHEN, S. H.; YUNYINGER, J. W. ; ROSEMBERG, N.; FINK, N. Acute allergic reaction after composite pollen ingestion. **Journal. Allergy Clinical Immunology**. V.64, p. 270-274, **1979**.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. and SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural products**. V. 60, p. 52-60, **1997**.
- CROFT, L. SIMON; BARRET, P. MICHAEL; URBINA A. JULIO. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**. V. 21 n° 11 novembro **2005**.
- CRONQUIST, A. Subclasses and families of dicotyledons. In: The New York Botanical Garden Bronx, ed. The evolution and classification of flowering plants. New York. p. 261-450, **1988**.
- DAVIS, P. H.. Flora of Turkey and Aegean Islands. **University press, Edinburgh**, U. K. V. 5, p.193-194, **1975**.
- DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**. V. 54, p. 801-840, **1997**.
- De SOUSA, W. **Prog. Protistol**. V. 3, p. 87, **1989**.
- De SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Design**. V .8, p. 269-285, **2002**.
- De SOUZA, W. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. **Micron**. V. 26, p. 405-430, **1995**.
- De SOUZA, W.; ARTINEZ-PALOMO, A.; GONZALES-ROBBLES, A. **Journal. of Cell Science**. V. 33, p. 285, **1978**.
- DI BENEDETTO, R.;MENICHINI, F.; GACS-BAITZ, E. And delle MONACHE, F. **Phytochemistry**. V. 30, p. 3657, **1991**.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of american trypanosomiasis (Chagas, disease). **Rev. Biochem. Toxic**. V. 7, p. 159, **1985**.
- DUARTE, T. C. M.; FIGUEIRA, M. G.; SARTORATTO, A.; REHDER, G. L. V.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 97, p. 305-311, **2005**.
- EKIM, T.; KOYUNCU, M.; VURAL, M.; DUMAN, H.; AYTAC, Z.; ADIGUZEL, N. Red Data Book of Turkish Plants. **Bariscan Offset, Ankara**. **2000**.

- ENGEL, J. C.; GARCIA, C. T.; HSICH, I. DOYKE, P. S.; MCKERROW, J. H. **Journal. of Cell Science.** V.113,p.1345, **2000.**
- ENGMAN, D. M. E LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Tropica.** V. 81, p.123-132, **2002.**
- FARNSWORTH, N. R. and MORRIS, R. W. Higher plants – the sleeping giant of drug development. **American Journal of pharmaceutical Education.** V. 148, p. 46-52, **1976.**
- FERNANDES, R. Genus Anthemis, L. In: Tutin et al.(Eds), **Flora Europaea**, vol. 4 Cambridge University Press, Cambridge, London. p. 145-159, **1976.**
- FLORA EUROPAEA**, V. 4, p.149. **1976.**
- FRANCO, L. L. **As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo.** 4<sup>a</sup> ed. Editora O Naturalista. Curitiba-Pr. **1999.**
- GAJIC, M. In:m. Josifovic, Flore de la Republique Socialiste de Serbie. Beograd: **Academic Serbe des Sciences et des Arts.** V.7, p. 83-90, **1975.**
- GEREZ, J. A. Industria farmacêutica: histórico mercado e competição. *Ciência Hoje.* V. 15, n<sup>o</sup> 89, p. 21-30, **1993.**
- GRACE, M. H. Chemical composition and Biological Activity of the Volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea discoridis*. **Phytoterapy Research.** V. 16, p. 183-185, **2002.**
- GRASSI, A.; PALERMI, G.; PARADISI, M. Study of tolerance and efficacy of cosmetic preparations with lenitive action in atopic dermatitis in children *Clin. Ter.* V. 151, p. 77-80, **2000.**
- GUYOT, M. A. M. Perspectivas da fitoterapia. **Acta. Farmaceutical. Bonaerense.** V. 9, n<sup>o</sup> 2, p. 131-138, **1990.**
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. **Phytochemistry.** V. 30, p. 3864, **1991.**
- HENKEL, T.; BRUNNE, R. N.; MULLER, H.; REICHEL, F. V. **Angew Chem.** V. 38, p.643, **1999.**
- HOLLA, M.; SVAJDLENKA, S.; ZIBRUNOVA, B.; TEKEL, J.; HAVRANEK, E. Composition of the oil from the flowerheads of *Anthemis tinctoria* L. cultivated in Slovak Republic. **Journal of Essential Oil Research.** V. 12, p. 714-716, **2000.**
- HONIGBERG, B. M.; BALAMUTH, W.; BOVEE, E. C.; CORLISS, J. O.; GJIDICS, M.; HALL, R. P.; KIDO, R. R.; LEEVINE, N.; D. A revised classification of the phylum Protozoa. **Journal Protozoology.** V. 11, p. 7-10, **1964.**
- HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. **Chapman & Hall**, London, **1998.**
- JOHNSTON, D. A.; BLAXTER, M. L.; DEGRAVE, W. M. **Bioessays.** V. 21, p. 131, **1999.**
- JORQUEIRA, C. S. Utilization industrial de plantas medicinales. **Workshop presented in UNIDO in Latin America**, Panajachel, Guatemala 11-17 july, **1993.**
- KALIL, J. e CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? **Parasitology. Today** 12, p. 396-399, **1996.**
- KLIMES, I. e LAMPARSKY, D. **Perfumer and Flavorist.** V.9, n<sup>o</sup>. 4, p. 1-13, **1984.**
- KONSTANTINOPOULOU, M.; KARIOTI, A.; SKALTSAS, S.; SKAL TSA, H. *Nat. Prod.* pp. 66-669, **2003.**
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda. V.34, p.2097-2005, **1990.**

- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDADE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, F.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of protozoa. **Journal. Protozoa.** V. 27, p. 37-58, **1980.**
- LEWIS, W. ; VINAY, P. North American pollinosis due to insect-pollinated plants. **Annual Allergy.** V. 42, p. 309-318, **1979.**
- LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. The exit of ing the pH of acidic compartments. **Journal of. Experimental Medical.** V. 168, p. 649-659, **1990.**
- LISZT, P. M.; HÖRHAMMER, L. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. **Springer Verlag Heidelberg III.** p.113, **1972.**
- LOZOYA, X. **Investigacion y Ciencia.** 254, p. 4, **1997.**
- MacRae, I. J.; OBADO, O. S.; TURNOCK, C. D.; ROPER, R. J.; KIERANS, M.; KELLY, M. J.; FERGUSON, J. A. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Molecular & Biochemical Parasitology.** V. 14, p. 26-136, **2006.**
- MANN, C.; STABA, E. Spices and Medical Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, v. I. **Food Products Press, USA.** p. 235-280, **1986.**
- MARBBERLEY, J. The Plant-Book. **Cambridge University Press, Cambridge, UK.** p. 43, **1997.**
- MARTINEZ-PALOMO, A.; De SOUZA, E.; GONZALES-ROBLES, A.J. **Cell Biol.** V. 69, p.507, **1976.**
- MAŠTEROVÁ, I.; GRANČAI, D.; GRANČAIOVÁ, Z.; POUR, M.; UBIK, K. A new flavonoid: tinctosid from *Anthemis tinctoria* L. **Short communications. Pharmazie.** V. 60, p. 956-957, **2005.**
- MAYA, J. D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J. M.; TLLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of Nifurtimox and benznidazole ipon glutatione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Tripanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** V. 86, p. 101-106, **1997.**
- MENDONÇA-PREVIATO, L.; GORIN, P. <sup>a</sup> S.; ANRDADE, A. F. B.; SCHARFSTEIN, J. Chemical Struture and Antigenic of complexes Obtained from Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry.** V. 22, p. 4880-4987, **1993.**
- MEYER, H. De OLIVEIRA, M. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four year study. **Parasitology.** V. 39, p. 91-94, **1948.**
- MIGUEL, D. M. e MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de Fitoterápicos.** Robe Editorial, São Paulo-S.P. **2000.**
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana.** 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, **2000.**
- OBERPRIELER, C. **Taxon.** V.50, p. 745, **2001.**
- OMOTO, T.; ASAI, I.; ISHIMARU, K.; SHIMOMURA. GERALY isovalerate accumulation in adventitious root culture of *Anthemis nobilis*. **Phytochemistry.** V. 41, n<sup>o</sup>. 06, p. 971-974, **1998.**
- OTTE, S. Los aceites esenciales medina redescubierta. **Dragoco.** V. 39, n<sup>o</sup> 3, p. 91-109, **1994.**
- ÖZTÜRK, M. ;ÖZÇELIK, H. Useful Plants of East Anatolia. Sirkav, Ankara. pp. 104-105, **1991.**

- PAVLOVIĆ, M. ; KOVAČEVIĆ, N.; COULADIS, M.; TZAKOU, O. Phenolic constituents of *Anthemis triumfetti* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 34, p.449-452, **2005**.
- PELT, J. M. As plantas medicinais voltam a florescer. **O correio da Unesco**. Rio de Janeiro. Ano 1, v.. 1, jan.. **1993**.
- PESSÔA, S. B. **Parasitologia médica**. 8ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. P. 1031, **1972**.
- PIMENTA, P. F.; De SOUZA, W. **Jouranal of .Submicroscopy. Cytology**. V. 17, p. 503, **1985**.
- POLAK, A. & RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitromidazole derivative benzonidazole. **Annual. Tropical. Medical. Parasitology**. V. 72, p. 45-54, **1978**.
- QUARENGHI, M. V.; TERESCHUK, M. L.; BAIGORI, M. D. ABDALA, R. L. Antibacterial activity of flowers from *Anthemis cotula*. **Fitoterapia**. N°. 71, p. 710-712, **2000**.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC. Cap. 15, p. 291-320, **2000**.
- SCHMIDT, A. e KRAUTH-SIEGEL, R. L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Curr. Top. Med. Chem**. V. 2, p. 1239-1259, **2002**.
- SERRANO, D. P.; HOLZMULLER, AND J. L. LEMESRE. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, V. 74, p. 25-31, **2000**.
- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**. V.. 61, p. 1053-1071, **1998**.
- SIMPSON, L. **International. Review. Cytology**. V. 32, p. 139, **1972**.
- SOARES, M. J.; De SOUZA, W. **Journal. Submicroscopy. Cytology. and Pathology**. V. 20, p.349, **1988**.
- SOARES, M. J.; SOUTO-PADRON, T. De SOUZA, W. **Journal. of Cell Science**. V. 102, p. 157, **1992**.
- SOSA, E. S. et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. **American. Journal of. Tropical. Medicine. Hygiene**. V. 59, p. 526-529, **1998**.
- SOUTO-PADRON, T.; De SOUZA, W. Z.; HEUSER, J. E. **Journal of. Cell Science**. V. 69, p. 167, **1984**.
- STRID, A.; TAN. K. In: Greuter, W., Raus, Th. (Eds), **Med-Checklist Notulae** 18, Willdenowia 29 (1-2), s, 51-57, **1999**.
- SUBIZA, J.; SUBIZA, J. L.; HINOJOSA, M.; GARCIA, R.; JEREZ, M.; SUBIZA, E. Anaphylactic reaction after the ingestion of chamomile tea: a study of cross-rection with other composite pollens. **Journal. Allergy Clinical Immunology**. V. 84, p. 353-358, **1989**.
- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International. Journal. for Parasitology**. V. 31, p. 550-554. **2001**.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for. Parasitology**. V. 31, p. 472-481, **2001**.
- UGAZ, O. L. Investigación Fitoquímica, 2a. ed. **Pontificia Universidad Catolica del Peru**. Fondo Editorial, Lima, Peru, p. 300, **1994**.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**. V. 8, p. 287-295, **2002**.
- URBINA, J. A. e DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversis and advances. **Trends Parasitology**. V. 19, p. 495-501, **2003**.

- UZEL, A.; GUVENSEN, A.; CETIN, E. Chemical composition activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwartz from Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**. V.95, p.151-154, **2004**.
- VAJS, V.; BULATOVIC, V. ; FODULOVIC-SAVIKIN, K.; MENTOVIC, N.; MACURA, S.; JURANIC, N.; MILOSAVLJEVIC, S. Highly oxygenated guaianolides from *Anthemis cretica* subsp. *Cretica*. **Phytochemistry**. V.50, p. 287-291, **1999**.
- VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M.; MOLLE, L. In: **The Medicinal Plant Industry**, Wijesekera, R. O.B.;CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, p. 59, **1991**.
- VAVERKOVA, S.; HABAN, M.; EERNA, K. Qualitative properties of *Anthemis tinctoria* and *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*) under different environmental conditions. Ecophysiology of plant production processes in stress conditions. **Abstracts of the fourth International Conference**, Račkova dolina, Slovakia. V. 2, no. 1-2, **2001**.
- VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J. °; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. V. 96, n° 7, p. 1005-1011, **2001**.
- VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. IN: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. *Biology of Kinetoplastida*. **New York, Academic Press**. V. 1, **1976**.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long term follow-up. **Am. Heart J.** V. 127, p. 151-162, **1994**.
- VUČKOVIĆ, I.; VUJISIĆ, L.; VAJS, V.; TEŠEVIĆ, V.; MACURA, S.; JANAČKOVIĆ, P.; MILOSAVLJEVIĆ, S. Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Anthemis arvensis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 34, p. 303-309, **2006**.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insect and arachnids. **Experimentall Parasitology**. V. 18, p. 124-193, **1966**.
- WEBSTER, P.; RUSSEL, D. G. **Parasitology Today**. V. 9, p. 201, **1993**.
- World Health Organization, Control of Chagas disease, Tech. Rep. Ser., . **WHO**. 905, 1-109, **2002**.
- World Health Organization. **WHO**. p. 134, **1993**.
- YUNES, A. R. e CALIXTO, B. J. Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Argos, Editora Universitária, **UNOEST** – Campus Chapecó, Chapecó-SC. P. 522, **2001**.
- ZARDINI, E. M. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. Vol. 3, p 169, **1984**.
- ZELADON, R.; ALVARENGA, N. J.; SCHOSINSKY, K. In “ **Chagas Disease**”, p.59. Pan American Health Organization. Publ. N° 347, **1997**.
- ZELEDON, R. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In “**Atlas of Chagas’s Disease Vectors in the Americas**”. Editora Fiocruz. V. 1, p. 271-287, **1997**.

# **ANEXO**

# ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBFRAÇÃO OBTIDA DE *Anthemis tinctoria*

Nilza de Lucas Rodrigues Bittencourt<sup>1</sup>; Tânia Ueda-Nakamura<sup>1,2</sup>; Benedito Prado Dias Filho<sup>1,2</sup>; Diógenes  
Aparício Garcia Cortez<sup>1</sup>; Celso Vataru Nakamura<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

\* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Fax: +55 44 3261-4860; E-mail: [cvnakamura@uem.br](mailto:cvnakamura@uem.br)

## Resumo

A doença de Chagas constitui ainda hoje no Brasil e em diversos países da América Latina um grave problema médico e social, no que reside a necessidade de se obter novas drogas mais potentes e com menores efeitos colaterais. No presente trabalho foi investigado o efeito de extrato bruto, frações e mistura sesquiterpênica obtida de extrato de flores de *Anthemis tinctoria* em *Trypanosoma cruzi*. O extrato bruto aquoso apresentou um IC<sub>50</sub> de 2,3 µg/ml, a fração diclorometano de 1,8 µg/ml e a mistura de sesquiterpeno, com atividade dose dependente com IC<sub>50</sub> de 1,5 µg/ml. Os resultados obtidos revelam que há um aumento na atividade inibitória à medida que o composto vai sendo purificado. Para a investigação do efeito citotóxico do extrato bruto aquoso, fração diclorometano e mistura sesquiterpênica foram utilizadas células LLCMK<sub>2</sub>. A fração diclorometano foi a que apresentou maior citotoxicidade com CC<sub>50</sub> de 4,0 µg/ml. Foram observadas alterações morfológicas e ultraestruturais como arredondamento das células, formação de “blebs” na membrana flagelar e citoplasmática em formas epimastigotas, tratadas com a mistura de sesquiterpeno, através de técnicas de microscopia ótica e eletrônica de transmissão e de varredura. Esses resultados mostram uma boa atividade *in vitro* de *A. tinctoria* em *T. cruzi* provavelmente associado a um efeito de desestabilização da membrana celular do parasita e demonstram também que produtos naturais podem ser uma fonte de novas drogas com atividade antiprotozoário e baixa toxicidade. No entanto é necessário que se façam estudos complementares para validar cientificamente a utilização dos compostos isolados de *A. tinctoria* no tratamento de doenças infecto parasitárias como a doença de Chagas.

## 1. Introdução

O uso de plantas medicinais como medicamentos para o tratamento de várias doenças vêm de tempos antigos, sendo que até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais (SCHENKEL *et al.*, 2000). Muitas plantas do bioma brasileiro, como cerrado, floresta atlântica e amazônica tem sido usada pela medicina natural (ALVES *et al.*, 2000), sendo que, muitas plantas exóticas foram ainda introduzidas no Brasil e incorporadas na medicina folclórica (DUARTE, 2005). As plantas produzem uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas o que permite desenvolver novas drogas para o tratamento de doenças infecciosas (AHMAD e BEG, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, por causa da pobreza e a dificuldade no acesso na medicina moderna, 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para cuidados primários com a saúde (BRAGANÇA, 1996). Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas (FARNSWORTH *et al.*, 1976) e há dados que indicam que é alta a correlação entre o uso popular e experimentos de atividade farmacológica (BRITO *et al.*, 1993).

O gênero *Anthemis* pertence à ordem Asterales e a família Asteraceae ou Compositae, sendo que este compreende cerca de 1.100 gêneros com aproximadamente 25.000 espécies de ampla distribuição, bem representadas em regiões subtropicais e temperadas (BARROSO, 1986). As espécies do gênero *Anthemis* são largamente usadas na Indústria Farmacêutica de Cosméticos e Alimentos. As flores têm seu uso bem conhecido como anti-séptico e propriedades medicinais e apresentam compostos do tipo flavonóides bem como óleos essenciais (VAVERKOA *et al.*, 2001). Na Europa extratos, tinturas, chás e pomadas, são largamente usados como anti-inflamatórios, antibacterianos, antiespasmódicos e agentes sedativos (MANN e STABA, 1986). A planta *Anthemis tinctoria* L. é uma erva perene cultivada nos países do mediterrâneo, sendo que alguns metabólitos secundários foram identificados nesta espécie como óleos voláteis, triterpenos, poliacetilenos, flavonóides entre outros (Masterová, 2005). Na medicina tradicional, esta planta é usada no tratamento da insuficiência hepática e “jaundice” icterícia (LISZT *et al.*,

1972). A atividade antimicrobiana do óleo essencial do extrato de diferentes espécies do gênero *Anthemis* têm sido estudadas (HOLLA *et al.*, 2000; GRACE, 2002).

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que constitui ainda hoje no Brasil e em diversos países da América Latina, um problema médico social grave. Estima-se que 18 milhões de pessoas na América do Sul e Central estão infectadas com *T. cruzi*. A doença de Chagas é responsável pela morte de 45.000 pacientes por ano (WHO, 1993). O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, onde o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado o homem ou mamífero, e extracelular no inseto vetor do gênero *Triatoma* (NEVES, 2000). A fase aguda da doença de Chagas é frequentemente assintomática e o desenvolvimento da fase crônica ocorre geralmente 10 a 20 anos após a infecção afetando cerca de 10 a 30% dos indivíduos acometidos. Patologias gastrointestinais são as manifestações mais comuns da fase crônica (VIOTTI, 1994). Infelizmente, apesar do impressionante avanço no entendimento da biologia do *T. cruzi*, as drogas disponíveis nifurtimox e benzonidazol são ativas nos estágios agudos da doença de Chagas com eficácia em torno de 80%, mas é limitado a eficácia contra doença crônica já estabelecida (SOSA, 1998). O efeito colateral de ambos pode ser bastante severo (CROFT, 2005), sendo que os efeitos mais frequentes dessas drogas incluem anorexia, vômitos, polineuropatias periférica e alergia dermatológica (URBINA, 2002). Portanto, drogas tripanocidas com menos efeitos colaterais são necessárias. Neste contexto as plantas fornecem diversidade química e biológica a qual tem ajudado no desenvolvimento de centenas de drogas farmacêuticas (CALIXTO, 2000). O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade biológica dos extratos, frações e composto obtidos da espécie *Anthemis tinctoria* em *T. cruzi*.

## 2. Materiais e Métodos

### COLETA DA PLANTA

As flores de *Anthemis tinctoria* foram coletadas em novembro de 2004 no Horto de plantas medicinais “Prof<sup>a</sup>. Irenice Silva” do campus da Universidade Estadual de Maringá. A espécie vegetal foi identificada por comparação autêntica pelo Dr. Cirino Correia Junior da EMATER-PR e uma exsicata está guardada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, com o número de registro HUM 1133. O material coletado foi secado ao abrigo do sol sobre esteiras, em temperatura ambiente por 8 dias, após isso acondicionado e armazenado em local seco e ao abrigo da luz.

### SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES

Das flores secas de *A. tinctoria* (130 g) foram extraídas frações solúveis em água e insolúveis na proporção 1:10 (material vegetal:solvente) pelo processo de maceração durante 8 dias à temperatura ambiente com soluções hidroetanólicas (etanol-água) preparadas à 90 % V/V (PRISTA *et al.*, 1975). O solvente foi removido à pressão reduzida em evaporador rotatório, à temperatura de 32 °C. Após a eliminação do solvente foi adicionada água destilada, sendo a parte solúvel em água, denominada de extrato bruto fase aquosa, que foi posteriormente liofilizada (liofilizador-modelo: 1-2 CHRIST ALPHA). O liofilizado resultou em 21,01 g de extrato-aquoso. A parte do extrato insolúvel em água (resíduo) foi solubilizada em acetato de etila e denominada de extrato bruto fase acetato, com um rendimento de 4,71 g (Esquema 01). O extrato aquoso (13 g) foi submetido à coluna cromatográfica de sílica gel (32 g sílica) e eluído com diclorometano, hexano, acetato de etila, metanol e metanol/água 9:1. Todas as frações foram submetidas a atividade tripanomicida. A fração diclorometano foi cromatografada (500 mg) em coluna cromatográfica de Sephadex-LH-20 eluída com clorofórmio/metanol 1:1 de onde se obteve 14 subfrações denominadas de F<sub>A</sub> a F<sub>H</sub>. A subfração F<sub>G</sub> foi cromatografada por três vezes em Sephadex fase móvel clorofórmio/metanol 1:1. Em seguida foi feita uma acetilação com 20 mg da subfração G e submetida a uma coluna de sílica de onde foi isolada 11 mg do composto que apresentou maior atividade sobre o *T. cruzi*. As frações e subfrações após terem sido

submetidas aos ensaios biológicos, foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), eluídas na fase móvel hexano/acetato de etila (1:1 v/v), observadas através de radiação UV e reveladas com solução de vanilina sulfúrica (2%).

### ***Análise cromatográfica***

A análise cromatográfica foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ pela Dra. Cláudia Moraes de Rezende. A identificação da fração de sesquiterpenos foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de massas computadorizado CGAR-EM. Para a análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo Agilent 6890 Seis II acoplado a um espectro de massas Agilent 5973. Condições do detector: ionização por impacto de elétrons 70eV, interface 280 °C. Condições de operação no cromatógrafo: injetor no modo “splitless” (tempo de válvula 0,5 min) em 250 °C; gás de arraste He com fluxo de 1ml/minuto; programação de aquecimento do forno cromatográfico:  $T_{inicial}$  35 °C a 60 °C (1 °C min<sup>-1</sup>), 200 °C (8 °C min<sup>-1</sup>), e 280 °C (15 °C min<sup>-1</sup>), permanecendo por 5 min. A coluna capilar utilizada foi a DB-5 (J&W) de 30m x 025 nm x 025 µm. Este sesquiterpeno foi utilizado em ensaios com *T. cruzi*.

### **PARASITAS**

Formas epimastigota do *T. cruzi* cepa Y foram cultivadas no meio líquido de LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo 1964) com 10% de soro fetal bovino (Gibco Invitrogen, New York, USA) por 96 h a 28 °C.

## **ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTA DE *T. CRUZI***

Os extratos brutos aquoso e acetato de etila, as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol/água e a subfração G foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) em concentração final que não excedesse a 1%. Os ensaios sobre as formas epimastigota foram realizados nas concentrações de 100 a 1,0 µg/ml em placas de poliestireno de 24 poços com volume final de 1,0 ml. O inóculo ( $1 \times 10^6$  células/ml) utilizado foi obtido a partir de cultura do protozoário em meio de LIT após crescimento por 96 h a 28 °C. O crescimento foi avaliado através da contagem das células em câmara hematocimétrica de Neubauer (Improved Double Neubauer Ruling).

## **EFEITO SOBRE PROTOZOÁRIOS INTRACELULARES**

Formas tripomastigota de *T. cruzi* foram suspensas em meio Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e adicionadas na cultura de células de forma que se obtivesse 10 protozoários por célula LLCMK<sub>2</sub> (células de rim de macaca Mulata). Os protozoários foram colocados em contato com as células durante 24 h e, em seguida, a cultura de células foi lavada 3 vezes com tampão fosfato de potássio (PBS) para remover os parasitas não aderidos. Foi adicionado o meio DMEM e a fração sesquiterpênica nas concentrações determinadas, e as células foram incubadas por 96 h. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS, fixadas com metanol puro por 15 min e lavadas com tampão fosfato pH 7,2 coradas com Giemsa 1:20 durante por 15 minutos, em seguida lavadas com água destilada e posteriormente as lamínulas foram montadas em lâminas com Entellam e observadas em microscópio ótico composto (OLYMPUS CX 31). O índice de internalização foi determinado pelo produto do número de célula infectada e o número de parasita por célula (VIEIRA *et al.*, 2002).

## **ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

Foram colocados 500 µl de uma suspensão padronizada de células LLCMK<sub>2</sub> ( $2,0 \times 10^5$  células/ml) em cada um dos 24 poços de uma placa e incubados em estufa a 37 °C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> por 48 h até a formação de um tapete de células. Posteriormente, foi retirado o meio e adicionados 500 µl das soluções do

extrato bruto, frações e fração sesquiterpênica obtidas das flores de *A. tinctoria*. nas concentrações de 100, 50, 10, 5, e 1 µg/ml. Após 72 e 96 h de incubação em estufa a 37 °C sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub> as células foram fixadas com 50 µl ácido tricloroacético 10% a 4 °C por uma hora, lavadas em água corrente em baixa pressão e após secar espontaneamente foram adicionados 50 µl de sulforodamina B 0,4% e a porcentagem de células viáveis foi determinada através do leitor de microplaca (Bio Tek – Powe wave XS) a 540 nm.

## **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS**

As alterações morfológicas nas formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* causadas pelo composto obtido de *A. tinctoria* foi avaliada mediante tratamento das células com 5,0 µg/ml (IC<sub>50</sub>) da substância em meio de LIT após 96 h a 37 °C de incubação e coradas com o corante de Giemsa. Os aspectos morfológicos das células tratadas foram observados ao microscópio ótico. As fotomicrografias foram obtidas pelo programa Axiovision versão 4.1 acoplado ao microscópio ótico (Zeiss Axioskop).

## ***Avaliação das alterações ultraestruturais***

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As células controle e tratadas com o composto obtido de *A. tinctoria*. foram lavadas em PBS 0,01 M pH 7,2 e fixadas por 2 h com 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Em seguida as células foram pós fixadas por 45 min a temperatura ambiente em solução de 1% de OsO<sub>4</sub> em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,2, contendo 0,8 M de ferrocianeto de potássio e CaCl<sub>2</sub>. As células pós-fixadas foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona e embebidas em Epon. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM-900).

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Na microscopia eletrônica de varredura, as células previamente fixadas foram aderidas a um suporte (chip), lavadas 2 vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e desidratadas em etanol usando concentrações crescentes de 15, 30, 50, 70, 80, 90, 95, e 100% durante 15 min em cada um. Em seguida, o material foi submetido ao ponto crítico, a metalização com ouro e observado em Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu (SS-550).

### 3. Resultados

A análise cromatográfica por CG/EM da fração ativa proveniente do fracionamento da fração diclorometano mostrou duas classes de compostos sesquiterpênicos, o que pode ser evidenciado pelos pesos moleculares observados nos espectros de massas. Esta mistura de sesquiterpenos da fração diclorometano foi utilizada em ensaios com *T. cruzi*.

A Figura 01A mostra a porcentagem de inibição de crescimento de formas epimastigota de *T. cruzi* tratada com extrato bruto aquoso (EBA) e extrato bruto acetato de etila (EBE) obtido de flores de *A. tinctoria*, após 96 h de incubação a 28° C. EBA apresentou uma atividade inibitória maior do que EBE onde concentrações de 5 e 10 µg/ml inibiram 77,4 e 91,9 % no primeiro caso e 31,7 e 76,8 % no segundo, respectivamente. O fracionamento do EBA em coluna de sílica resultou em 5 frações: hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA), metanol (FM) e metanol mais água (FMA). A FD foi a que apresentou maior atividade inibitória (Figura 01B), sendo que concentrações acima de 5 µg/ml inibiram o crescimento de mais de 95% das formas epimastigota do *T. cruzi*. Por outro lado, a FM apresentou a menor atividade inibitória. A FD foi submetida à coluna de Sephadex de onde se obteve 8 subfrações, A, B, C, D, E, F, G e H. Na Figura 01C pode-se observar que as subfrações F, G, e H apresentaram atividade inibitória considerável com um porcentagem de inibição de crescimento de *T. cruzi* acima de 90% para todas as concentrações utilizadas. A subfração A foi a que mostrou menor atividade com 87 % de inibição de crescimento para a concentração de 100 µg/ml.

Os efeitos do EBA, FD e da mistura de compostos sesquiterpenos de *A. tinctoria* no crescimento de formas epimastigota de *T. cruzi* em meio LIT a 28° C está representado na Figura 02. A atividade foi dose dependente, onde foi calculado um IC<sub>50</sub> de 2,3 µg/ml para o

extrato aquoso e inibição de 100 % na concentração de 1000 µg/ml (Figura 02A). Dentre as frações obtidas a FD foi a que apresentou melhor atividade isto é, o menor valor de IC<sub>50</sub> com 1,8 µg/ml e a FM a menor atividade com IC<sub>50</sub> de 145 µg/ml (Figura 02B). O sesquiterpeno apresentou uma atividade dose dependente. O IC<sub>50</sub> foi 1,5 µg/ml, e percentagem de inibição foi maior que 95 % para todas as concentrações utilizadas (Figura 02C). Os resultados obtidos revelaram que há um atividade inibitória dose dependente.

Um importante critério para a investigação de substâncias sobre a atividade contra *T. cruzi* é seu potencial terapêutico, e que eles não apresentem efeito citotóxico sobre as células de hospedeiros mamíferos. Assim, foi avaliada a porcentagem de células LLCMK<sub>2</sub> vivas após 48 horas de tratamento com o extrato bruto aquoso, fração diclorometano e o composto obtido de *A. tinctoria* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/ml. A Figura 03 mostra os valores de citotoxicidade apresentados pelo EBA, FD e a subfração sesquiterpênica. A mistura de sesquiterpeno apresentou uma CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica de 50%) de 7,0 µg/ml e o EBA de 17,3 µg/ml. A FD foi a que apresentou maior citotoxicidade com CC<sub>50</sub> de 4,0 µg/ml.

No presente estudo foi feito uma avaliação do efeito da mistura de sesquiterpêno obtido de *Anthemis tinctoria* na interação do *T. cruzi* com células LLCMK<sub>2</sub>. As formas tripomastigotas foram incubadas por 24 h na presença de células LLCMK<sub>2</sub>, em seguida as células foram tratadas nas concentrações de 10, 5, 1, e 0,5 µg/ml da mistura sesquiterpênica e incubadas por 96 h. Nas concentrações de 0,5 e 1 µg/ml a subfração de sesquiterpeno apresentou uma taxa inibição acima de 50%. O tratamento com 5,0 µg/ml do composto levou a uma diminuição do número de células internalizadas com parasitas e também do número de parasitas internalizados por células LLCMK<sub>2</sub> (Figura 04).

Foram observadas alterações morfológicas através da microscopia ótica comum de formas epimastigota tratadas com 2,0 µg/ml da mistura sesquiterpênica de *A. tinctoria* por um período de 96 h a 28° C. Na Figura 05A pode-se observar as características morfológicas de formas epimastigota não tratadas com uma forma alongada e o flagelo na posição anterior, o cinetoplasto, o núcleo e membrana citoplasmática características. O *T. cruzi* na presença do composto sesquiterpênico (IC<sub>50</sub>), apresentou alterações na sua morfologia com um aumento do volume celular, formato irregular e células arredondadas (Figura 05B, C e D). Na presença do composto (IC<sub>90</sub>) apresentou uma diminuição do número de parasitas por campo e também as células mostraram-se mais finas e com estrutura bastante alteradas (Figura 05 E e F).

A microscopia eletrônica de varredura confirmou as alterações observadas através da microscopia ótica comum. Na Figura 06 (B, C e D) é possível observar as alterações provocadas pelo sesquiterpeno na membrana do parasita e ainda visualizar a presença de mais de um flagelo saindo do mesmo ponto da bolsa flagelar. *T. cruzi* não tratados ou tratados somente com DMSO apresentam uma morfologia alongada com um único flagelo emergindo da bolsa flagelar, típico de formas epimastigota (Figura 06A). A microscopia eletrônica de transmissão mostrou alterações ultraestruturais de formas epimastigota após incubação e tratamento com o composto isolado de *A. tinctoria*. Os parasitas tratados com este composto em concentrações de IC<sub>50</sub> (Figura 07B, C e D) e IC<sub>90</sub> (Figura 07E e F) apresentaram alterações ultraestruturais bem evidentes. Na extremidade inferior do flagelo de epimastigota foi observada a presença de “blebs” na membrana (Figura 07B e D). Porções da membrana se destacaram do corpo celular formando “blebs” sendo que em alguns casos houve até uma separação de partes da membrana do corpo da célula. A células

controle (Figura 07A) mostram uma forma alongada, flagelo terminal, bolsa flagelar, cinetoplasto e membranas intactas característico do protozoário não tratado com a droga.

#### 4. Discussão

Na tentativa de se obter novas drogas para o tratamento da doença de Chagas, vários estudos são realizados tanto com compostos de origem natural quanto sintéticos. Diversas pesquisas têm mostrado que os extratos de plantas apresentam atividade antiprotozoário. Dentre muitos dos estudos realizados pode-se citar o trabalho com extratos brutos de 39 plantas medicinais do México que tiveram suas atividades testadas contra formas epimastigota de *T.cruzi*. Trinta e dois extratos mostraram atividade frente a este protozoário, sendo que, o extrato metabólico das raízes da *Aristolochia taliscana* (Aristolochiaceae) localmente conhecida como “guaco”, imobiliza forma epimastigota. Do fracionamento deste extrato neolignanas e lignanas isoladas, em concentrações de 5 e 75 µg/ml respectivamente, também imobilizam formas epimastigota (ABE *et al.*, 2002). A atividade antitripanosoma também foi investigada com extratos de plantas da Colômbia. Os extratos de *Conobea scoparioides*, *Otoba novogranatensis* e *Otoba paevifolia* mostraram-se ativos contra formas epimastigotas de *T.cruzi* (WENIGER *et al.*, 2001). Panty *et al.* (2004) verificaram que o composto 3-(bifenil-4il)-3-hidroxiquinoclidina (BPQ-OH) apresentou um efeito dose dependente no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y, com um IC<sub>50</sub> de 24,38 ± 2,10 µM. O composto ER27856 mostrou efeito equivalente com um IC<sub>50</sub> de 4,59 ± 0,36 µM. O efeito antiproliferativo *in vitro* contra *T. cruzi* com o eupomatenóide isolado das folhas de *Piper regnellii*, planta da família Compositae, mesma família da *A. tinctoria*, foi recentemente investigado. Este composto mostrou atividade contra formas epimastigota de *T.cruzi* com IC<sub>50</sub> de 7,0 µg/ml (LUIZE *et al.*, 2006). No presente estudo foi observado que uma subfração composta por uma mistura de sesquiterpenos obtida de flores de *A. tinctoria* apresenta um IC<sub>50</sub> de 1,5 µg/ml em formas

epimastigota de *T. cruzi*. Estes resultados mostraram que com fracionamento do extrato bruto houve um aumento da atividade. Em comparação, os resultados obtidos da mistura sesquiterpênica revelaram que este pode ser mais ativo que o Benzonidazol que apresetou um IC<sub>50</sub> de 7 µg/ml e porcentagem de inibição de 84%.

Segundo Vuckovic (2006) três tipos de classes de metabólitos secundários têm sido detectados no gênero *Anthemis*: poliacetilenos (CHRISTENSEN, 1992), flavonóides (WILLIAMS et al., 2001) e lactonas sesquiterpênicas (BULATOVIC, 1998). Estudos químicos prévios vêm indicar que lactonas sesquiterpênicas são sistematicamente importantes dentro do gênero *Anthemis*. A presença de lactonas sesquiterpênicas em várias espécies de *Anthemis* têm sido descritas por muitos pesquisadores. Uma das primeiras literaturas informou sobre o sabor amargo da nobilina, lactona sesquiterpênica da *Anthemis nobilis* L., uma planta medicinal de uso popular bem conhecida (BENESOVA et al., 1964), sendo que foi também isolada um tipo de lactona acíclica considerada comum de *Anthemis cotula* L. (BOHLMANN et al., 1969; BARUAH et al., 1985). Saroglou (2006) realizou um estudo da composição de oito espécies do gênero *Anthemis* nativas da Grécia, entre elas a espécie *Anthemis tinctoria*. A análise foi feita por GC e GC-MS e mostrou a presença de uma mistura complexa de óleos essenciais, onde, os terpenóides foram considerados os compostos majoritários. A taxa de sesquiterpenos variou entre as espécies, entretanto a variedade *Anthemis tinctoria* teve a mais alta taxa de sesquiterpenos com 53,8%. Dentro do grupo das espécies de *Anthemis* estão incluídos os três maiores tipos de lactonas sesquiterpênicas sendo estes os germacrolídeos, eudesmanolídeos e guaianolídeos (VAJS et al., 1999).

Uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso a tratamentos farmacológicos convencionais e o uso da medicina folclórica é muito comum e sugerem

que produtos naturais são inofensivos (RATES, 2001). No entanto, o uso tradicional destes produtos não é garantia de segurança (EDZARD, 1998). Testes de citotoxicidade com produtos naturais são importantes, uma vez que é grande o interesse de drogas obtidas de plantas significando que o tratamento médico convencional pode ser ineficiente ou resultar em efeitos terapêuticos ineficientes (RATES, 2001). Ensaio para a investigação do efeito citotóxico sobre células LLCMK<sub>2</sub> mostraram que a FD obtida a partir da planta *A. tinctoria* foi a que apresentou maior citotoxicidade com CC<sub>50</sub> de 4,0 µg/ml.

Através da microscopia eletrônica de transmissão, em formas epimastigotas tratadas com uma subfração constituída por compostos sesquiterpênicos foi observado a formação de “blebs” na membrana do flagelo. A formação de “blebs” também foi verificada por Braga e colaboradores (2004) em parasita tratado com o composto (3-bifenil-4il)-3-hidroxiquinuclidina BPQ-OH, O ER27856. Estes compostos são inibidores da escalo sintetase (SQS) enzima envolvida na biossíntese de esterol substância presente na membrana celular do *T. cruzi*. Porções da membrana se destacaram do corpo celular formando “blebs” sendo que em alguns casos houve até uma separação de partes da membrana do corpo da célula. Em todos os casos os microtúbulos do flagelo permaneceram associados com as partes da membrana plasmática ou com o axonema flagelar. A mudança na composição química alterando a taxa de fosfolípidos e esterol interfere em alguns caminhos de estabilidade de membranas, especialmente em algum domínio da ligação do corpo celular e o flagelo, a qual inclui abundância de lípidos ricos em esteróis (DENNY *et al.*, 2001). Isto pode explicar as marcantes mudanças morfológicas observadas em células tratadas com drogas particularmente em sistemas de membranas marcadas. A formação da estrutura ramificada da bicamada é intrigante mas pode estar associada a alterações

atribuídas a estabilidade da bicamada modificando sua composição de lipídeos. O resultado, em alguns casos, e toda membrana plasmática perde a conexão com os microtúbulos subpeliculares característicos dessas células (DE SOUZA, 1984; DE SOUSA, 2002).

#### **4. Conclusão**

Os resultados mostraram um forte potencial *in vitro* da atividade antiproliferativa dos extratos, frações e de uma subfração constituída por compostos sesquiterpênicos obtidos de *A. tinctoria* sobre *T. cruzi*. Esta atividade pode estar associada a uma grande desestabilização da membrana celular do parasita. Assim é importante a realização de novos estudos sobre o efeito das flores de *A. tinctoria* nas membranas dos tripanosomatídeos e sua influência nas alterações ultraestruturais dessas células para se determinar os mecanismos de ação em *T. cruzi*. Portanto, produtos naturais podem ser uma fonte de novas drogas com atividade antiprotozoário e baixa toxicidade, que podem ser empregados na terapia de doenças infectos parasitárias como a doença de Chagas.

**Acknowledgements:**

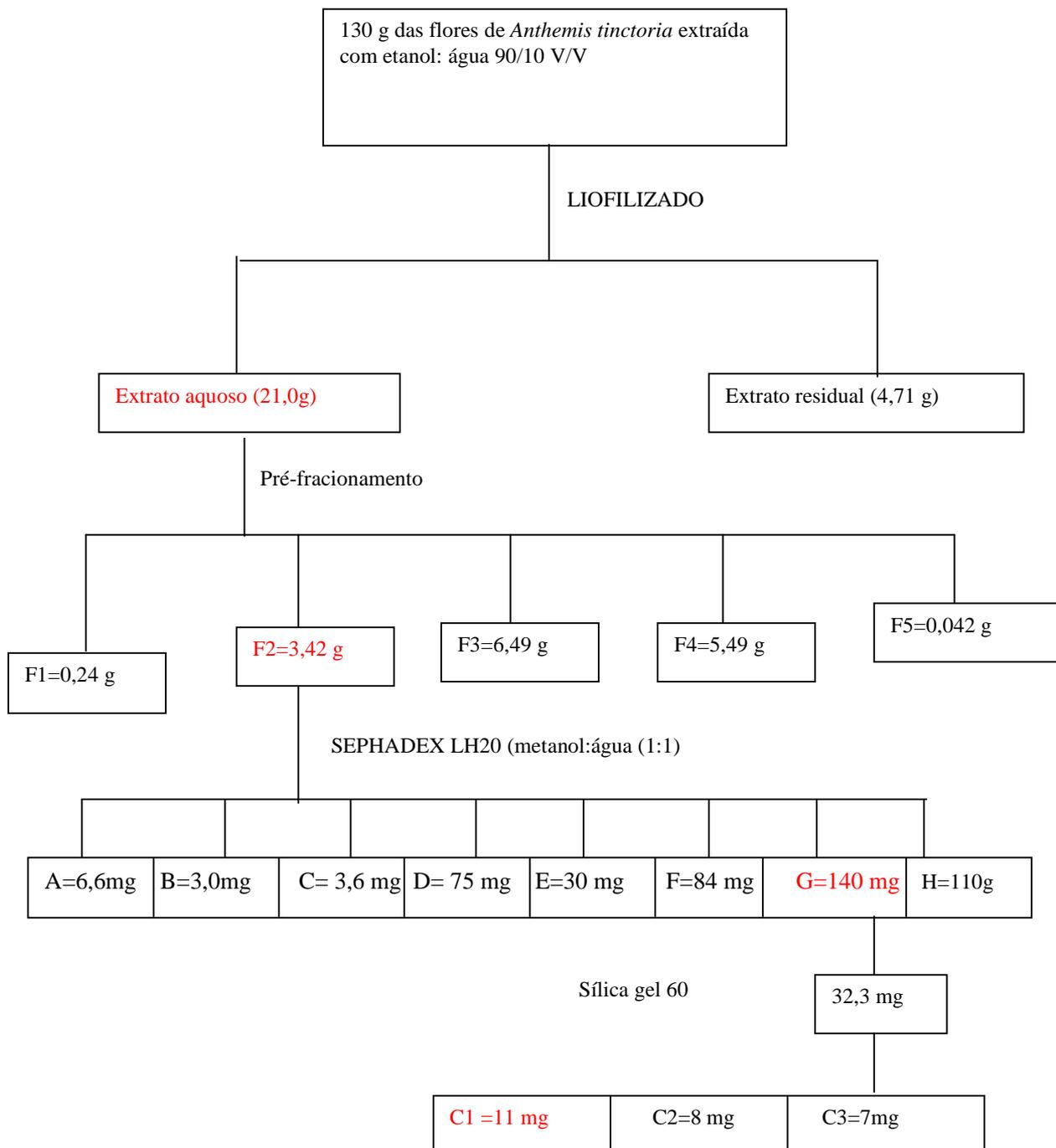
This study was supported through grants from DECIT/SCTIE/MS and MCT by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), and Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; NAGAFUGI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUIAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican Plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, root of *Aristolochia taliscana*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, V.25, nº 9, p. 1188-1191, **2002**.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 74, p. 113-123, **2001**.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA Jr.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 95, p. 367-373, **2000**.
- BARUAH, R. N.; BOHLMANN, F.; HING, R. M. **Planta Medica**. Vol. 6, p. 551, 1985. **Collect. Czech. Chem. Commun.** Vol.29, p. 30, **1964**.
- BARUAH, R. N.; BOHLMANN, F.; HING, R. M. **Planta Medica**. Vol. 51, p. 531, **1985**.
- BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas no Brasil. Viçosa, UFV, **Imprensa . Universitária**. Viçosa, Minas Gerais. V. 03, p.230-272, **1986**.
- BENESOVA, V.; HEROUT, V.; SORM, F. **Collect. Czech. Chem. Commun.** V.29, p. 3096, **1964**.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M. **Tetrahedron Letters**. p. 2417, **1969**.
- BRAGA, V. M.; URBINA, A. J.; SOUZA, W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.24, 72-78, **2004**.
- BRAGANÇA, L. <sup>a</sup> R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: Universidade Federal Fluminense. P. 300, **1996**.
- BRITO, A. R. M. S. and BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39 p. 53-67, **1993**.
- BULATOVIĆ, V. Comparative examination of chemical constituents of species *Anthemis carpatica* and *Anthemis montana*. PhD thesis, **Faculty of Chemistry, University of Belgrade**, 57-66, **1998**.

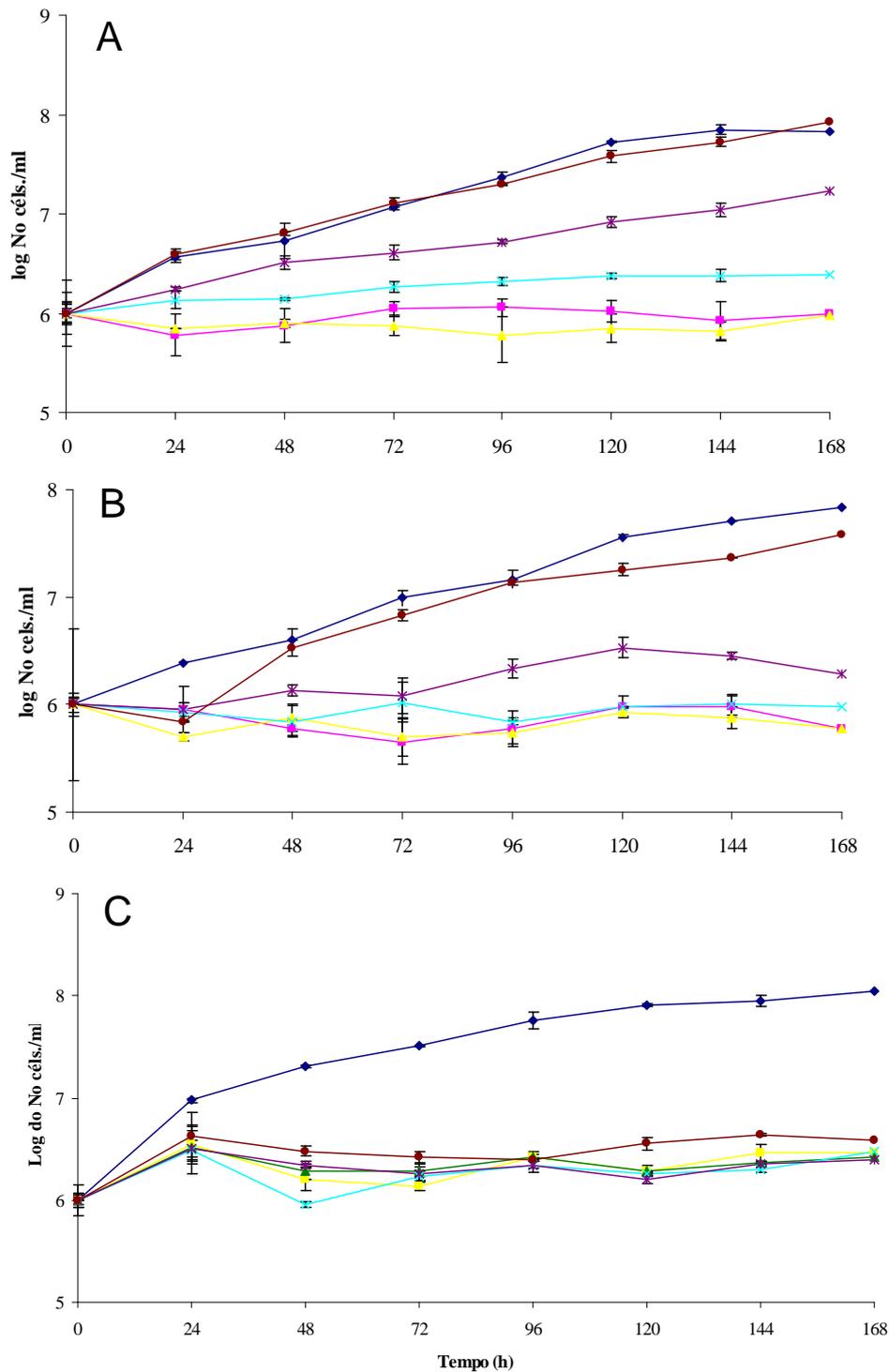
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutical agents). **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, 48:179-189, **2000**.
- CAMARGO, E. C. Growth differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. V.6, p. 93-100, **1964**.
- CHRISTENSEN, L. Acetylenes d related compounds in Anthemidae. **Phytochemistry**, v. 31, 7-49, 1992.
- CROFT, L. SIMON; BARRET, P. MICHAEL; URBINA A. JULIO. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**. Vol. 21 n° 11 novembro **2005**.
- De SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharmaceutical Design**, V.8, 269-285, **2002**.
- De SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review Cytology**, V. 86, p. 197-283, **1984**.
- De SOUZA, W. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. **Micron**, v. 26, 405-430, **1995**.
- DENNY, P. W.; FIELD, M. C.; SMITH, D. F. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregat into pipid rafs in Kinetoplastid. **FEBS Letters** V. 491, p. 148-153, **2001**.
- DUARTE, T. C. M.; FIGUEIRA, M. G.; SARTORATTO, A.; REHDER, G. L. V.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 97, p. 305-311, **2005**.
- EDZARD, E. Harmless herbs? A review of the recent literature. **American Journal Medicine**, V. 104, p. 170-178, **1998**.
- FARNSWORTH, N. R. and MORRIS, R. W. Higher plants – the sleeping gian of drug development. **American Journal of pharmaceutical Education**, 148, 46-52, **1976**.
- GRACE, M. H. Chemical composition and Biological Activity of the Volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea discoridis*. **Phytoterapy Research**. V. 16, p. 183-185, **2002**.
- HOLLA, M.; SVAJDLENKA, S.; ZIBRUNOVA, B.; TEKEL, J.; HAVRANEK, E. Composition of the oil from the flowertheds of *Anthemis tinctoria* L. cultivated in Slovak Republic. **Journal of Essential Oil ReEsearch**. V. 12, p. 714-716, **2000**.
- LIST, P. M.; HÖRHAMMER, L. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. **Springer Verlag Heidelberg III**. p.113, **1972**.

- LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnelli* (Miq) C. DC. Var. *Pallescens* (C. DC.) Yunk against *Trypanosoma cruzi*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **2006**.
- MacRae, I. J.; OBADO, O. S.; TURNOCK, C. D.; ROPER, R. J.; KIERANS, M.; KELLY, M. J.; FERGUSON, J. A. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 14, 26-136, **2006**.
- MANN, C.; STABA, E. Spices and Medical Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, v. I. **Food Products Press**, USA, p. 235-280. **1986**.
- MAŠTEROVÁ, I.; GRANČAI, D.; GRANČAIOVÁ, Z.; POUR, M.; UBIK, K. A new flavonoid: tinctosid from *Anthemis tinctoria* L. **Short communications. Pharmazie**. V. 60, p. 956-957, **2005**.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, **2000**.
- PRISTA, L. N.; CORREIA, A. <sup>a</sup>; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v. I, 1220 p.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. V. 39, p. 603-613, **2001**.
- ROCHA, M. G.; BRANDÃO, A. B.; MORTARA, A. R.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; CARVALHO, M.U. T. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Journal of Structural Biology**, 154, 89-99, **2006**.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. cap. 15, p. 291-320.
- SAROGLOU, V.; DORIZAS, N.; KYPRIOTAKIS, Z.; SKALTSA, H. Analysis of essential oil composition of eight *Anthemis species* from Greece. **Journal of Chromatography A**. V. 1104, p. 313-322, **2006**.
- SOSA, E. S. et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the determinate phase of Chagas disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 59, 526-529. **1998**.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**. V. 8, p. 287-295, **2002**.
- VAJS, V.; BULATOVIC, V. ; FODULOVIC-SAVIKIN, K.; MENTOVIC, N.; MACURA, S.; JURANIC, N.; MILOSAVLJEVIC, S. Highly oxygenated guaianolides from *Anthemis cretica* subsp. *Cretica*. **Phytochemistry**. V.50, p. 287-291, **1999**.
- VAVERKOVA, S.; HABAN, M.; EERNA, K. Qualitative properties of *Anthemis tinctoria* and *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*) under different environmental conditions. Ecophysiology of plant production processes in stress conditions. **Abstracts of the fourth International Conference**, Račkova dolina, Slovakia. V. 2, no. 1-2, **2001**.
- VIEIRA, M.; DUTRA, J. M. F.; CARVALHO, T. M. U.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SOUTO PADRÓN, T.; SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochemistry Cell Biology**, V. 118, p. 491-499, **2002**.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, p. 151-162, **1994**.
- WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerik. V. 78, p. 193-200, **2001**.
- WILLIAMS, C. A.; GREENHAM, J. The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the anthemidae. **Biochemistry System Ecology**, V. 29, 929-945, **2001**.
- World Health Organization **WHO**. p. 134, **1993**.

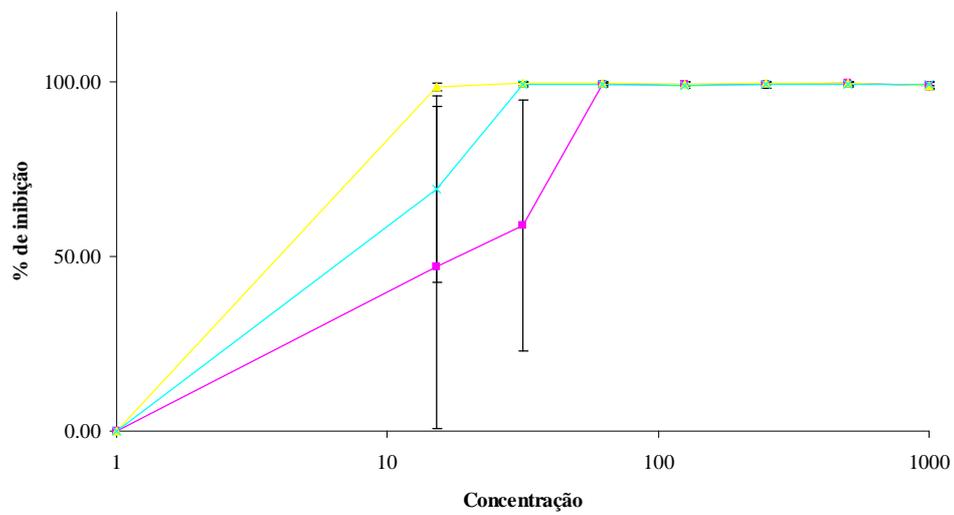


**Esquema 1:** fluxograma de separação das frações, subfrações e composto a partir do extrato bruto hidroalcolólico das flores da planta *Anthemis tinctoria*.

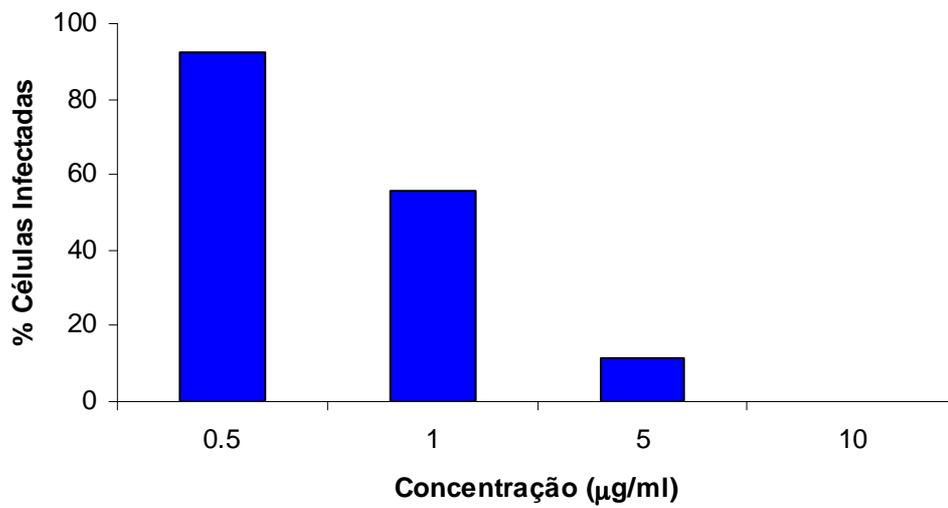




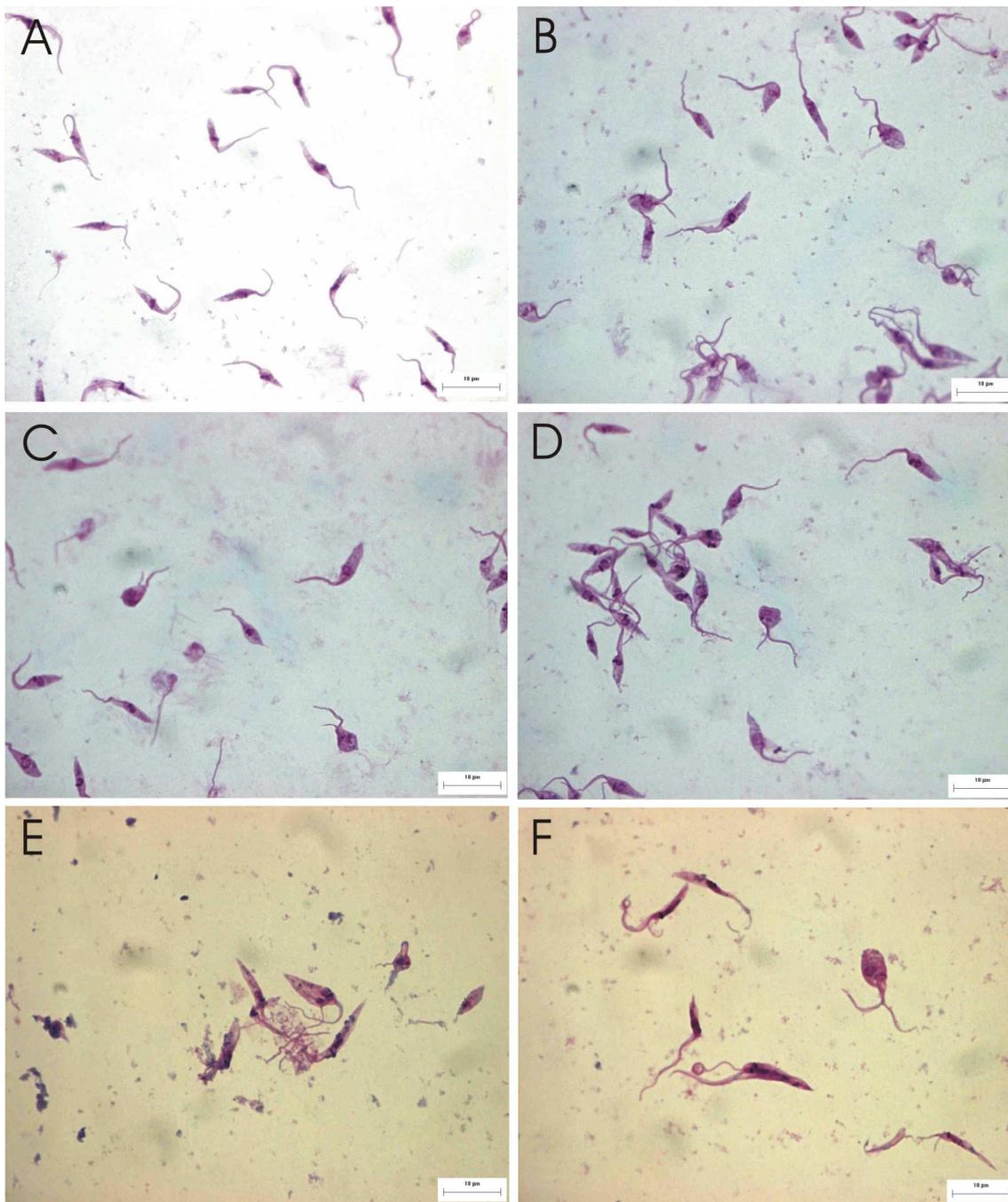
**Figura 02-** Porcentagem de inibição de crescimento de formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **(A)** Extrato aquoso; **(B)** fração diclorometano; **(C)** subfração obtidas das flores de *Anthemis tinctoria*. ■ Controle; ■ 1 µg/ml; ■ 10 µg/ml; ■ 5 µg/ml; ■ 50 µg/ml; ■ 100 µg/ml. ■ 1000 mg/ml



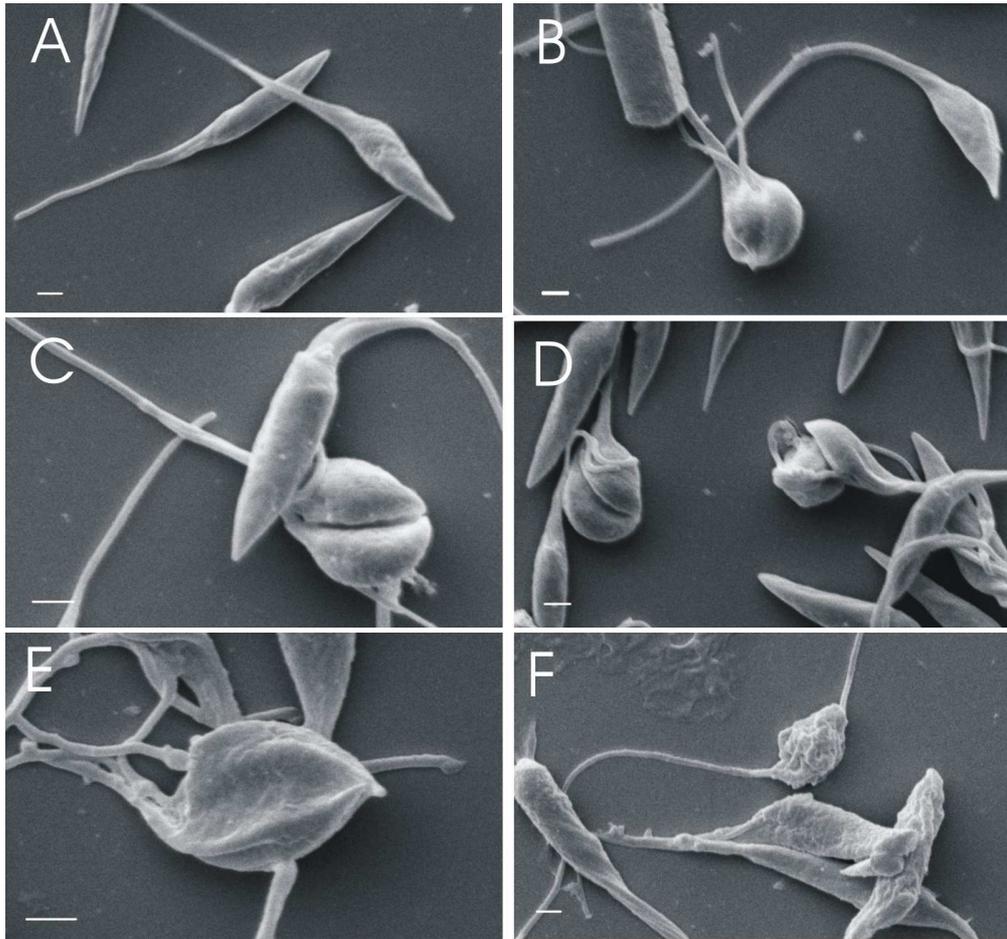
**Figura 03-** Citotoxicidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y em ■ extrato aquoso; ■ fração diclorometano; ■ subfração obtida das flores de *Anthemis tinctoria*.



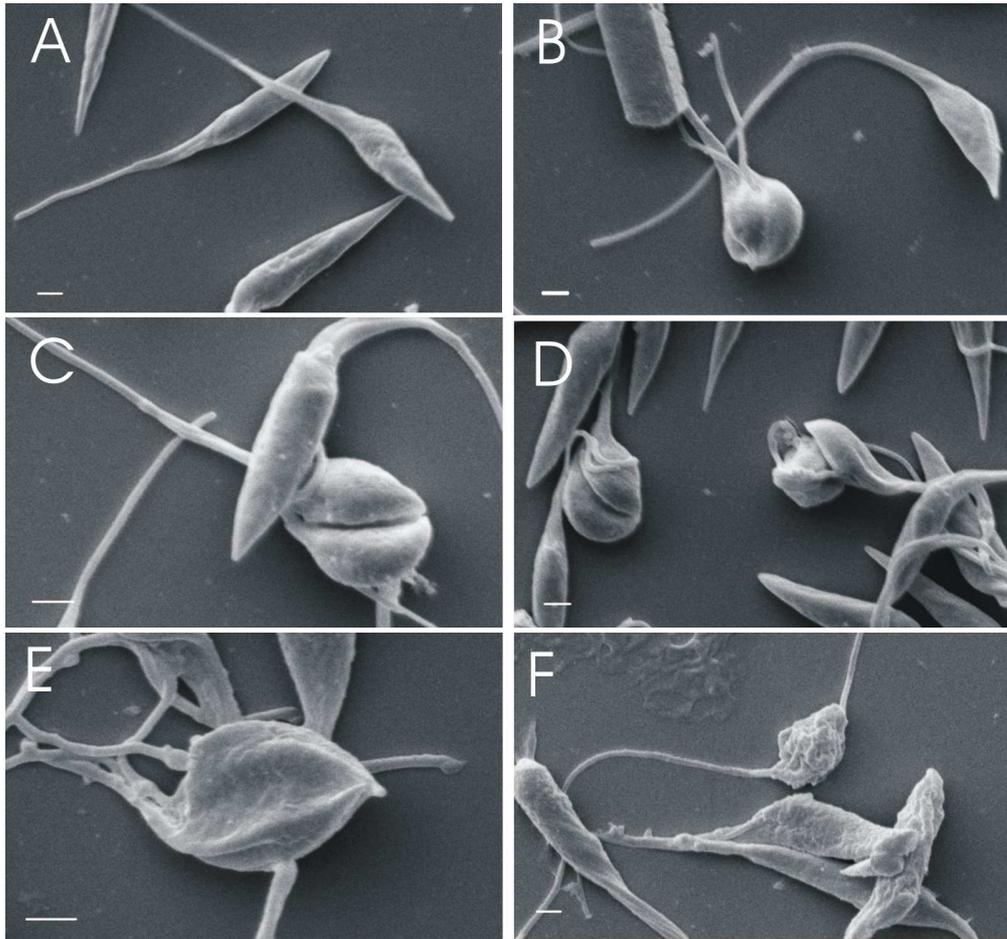
**Figura 4-** Interação de *Trypanosoma cruzi*, forma tripomastigota, tratado com as concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 mg/ml da subfração obtida de *Anthemis tinctoris* com células LLCMK2.



**Figura 5-** Microscopia óptica comum de formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi* cultivada a 28°C por 96 h na ausência (A), e presença da subfração obtida na concentração de IC<sub>50</sub> (B, C e D) e IC<sub>90</sub> (E e F). Ampliação = 100x.



**Figura 6-** Morfologia Ultraestrutural de *Trypanosoma cruzi* forma epimastigota cultivado à 28°C por 96 h na ausência (A) e presença da subfração obtida na concentração de IC<sub>50</sub> (B,C e D) e IC<sub>90</sub> (E e F). Barra = 1  $\mu$ m



**Figura 6-** Morfologia Ultraestrutural de *Trypanosoma cruzi* forma epimastigota cultivado à 28°C por 96 h na ausência (A) e presença da subfração obtida na concentração de IC<sub>50</sub> (B,C e D) e IC<sub>90</sub> (E e F). Barra = 1  $\mu$ m

**Antitrypanosomal activity of a semi-purified subfraction rich in  
labdane sesquiterpenes, obtained from flowers of *Anthemis  
tinctoria*, against *Trypanosoma cruzi***

Nilza de Lucas Rodrigues **BITTENCOURT**<sup>1</sup>; Tânia **UEDA-NAKAMURA**<sup>1,2</sup>; Benedito Prado **DIAS**

**FILHO**<sup>1,2</sup>; Diógenes Aparício Garcia **CORTEZ**<sup>1</sup>; Celso Vataru **NAKAMURA**<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

\* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Fax: +55 44 3261-4860; E-mail: [cvnakamura@uem.br](mailto:cvnakamura@uem.br)

**Summary:**

In Brazil and several other Latin American countries, Chagas' disease still constitutes a serious medical and social problem, and there is a need to develop new, more-potent drugs with fewer side effects to effectively treat this disease. We investigated the antitrypanosomal effect of a crude extract, fractions, and a semi-purified subfraction rich in a mixture of isomeric labdane sesquiterpenes, obtained from flowers of *Anthemis tinctoria*, against *Trypanosoma cruzi*. In epimastigote forms, the aqueous crude extract, dichloromethane fraction, and semi-purified subfraction showed a dose-dependent inhibitory activity, with  $IC_{50}$  of 2.3  $\mu\text{g/ml}$ , 1.8  $\mu\text{g/ml}$ , and 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. In the interaction index, the semi-purified subfraction showed a reduction in both the percentage of infected LLCMK<sub>2</sub> cells and the mean number of trypomastigotes per infected cell. The cytotoxicity evaluation demonstrated that the cytotoxic concentrations of the semi-purified subfraction were higher for LLCMK<sub>2</sub> cells than for the protozoans, with a selectivity index of 35.0. Epimastigote forms treated with the semi-purified subfraction showed ultrastructural and morphological alterations such as rounding of the cells and bleb formation in the flagellum and cytoplasmic membrane. These results show that the flowers from *A. tinctoria* may be a source of new drugs with antiprotozoal activity. However, additional *in vitro* and *in vivo* studies are needed to validate the use of *A. tinctoria* in the treatment of Chagas' disease.

**Keywords:** antiprotozoan activity, medicinal plants, *Trypanosoma cruzi*, ultrastructure alterations.

## Introduction

About 65-80% of the population in developing countries essentially depends on plants for primary health care. Some 25% of all modern medicines are derived directly or indirectly from plants (Farnsworth and Morris 1976). Many plants from Brazilian ecosystems such as the savanna, and the Atlantic and Amazon forests are used in traditional medicine (Alves *et al.* 2000). Also, many exotic plants that were introduced into Brazil and incorporated into traditional medicine display curative properties (Duarte *et al.* 2005). Various studies have demonstrated a strong correlation between popular use and experimentally demonstrated pharmacological activity. Many plant extracts and essential oils have been shown to exert *in vitro* and *in vivo* activity, which justifies research on plants used in traditional medicine (Martinez *et al.* 1996). Plants produce a variety of compounds with antimicrobial properties, which have led to the development of new drugs for treatment of infectious diseases (Ahmad and Beg 2001).

The family Compositae is one of the most species-rich among the flowering plants. *Anthemis* L. is the second-largest genus in this family with approximately 25,000 species, widely distributed in subtropical and temperate areas. Species of *Anthemis* are widely used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. *Anthemis tinctoria* L. is a perennial herb cultivated in Mediterranean countries, and several secondary metabolites have been identified in this species, such as volatile oils, triterpenes, polyacetylenes, and flavonoids (Masterová *et al.* 2005). In traditional medicine, this plant is used to treat liver problems and jaundice (Liszt *et al.* 1972). Its flowers have well-known antiseptic and medicinal properties, derived from flavonoids as well as essential oils (Vaverkova *et al.* 2001). In Europe, extracts, dyes, teas, and ointments are used as anti-inflammatory, antibacterial, antispasmodic, and sedative agents (Mann and Staba 1986). The antimicrobial activity of essential oils and extracts from different species of *Anthemis* has been studied previously (Holla *et al.* 2000; Grace 2002).

*Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, which in Brazil and several other Latin American countries constitutes, a serious social and medical problem (WHO 2008). Transmission to vertebrates occurs through feces of hemipteran insects contaminated with metacyclic trypomastigotes, the infective stage of the parasite (de Souza 1984). The acute phase of Chagas' disease is frequently asymptomatic, and the chronic phase usually develops 10 to 20 years after the infection, affecting about 10 to 30% of infected individuals (Viotti *et al.* 1994).

In spite of the impressive progress in the understanding of the biology of *T. cruzi*, the drugs available (nifurtimox and benznidazole) are active on the acute stage of Chagas' disease, with about 80% effectiveness; but have limited utility against the established chronic disease (Sosa 1998). The side effects of both compounds can be quite severe (Croft *et al.* 2005). Therefore, trypanocidal drugs with less-serious side effects are necessary. In this context, plants are a reservoir of chemical and biological diversity that has led to the development of hundreds of pharmaceutical drugs (Calixto 2000). The objective of the present study was to investigate the activity of the extracts, fractions, and a sesquiterpene-rich semi-purified subfraction, obtained from flowers of *A. tinctoria*, against *T. cruzi*.

## Materials and Methods

### *General experimental procedures*

The NMR spectra were obtained in VARIAN GEMINI 300 (7.05T) spectrometers, using deuterated solvent, TMS as the internal standard and a constant temperature of 298 K. Sephadex LH-20; Silica gel 60 (70-230 and 230-400 mesh); TLC: silica gel plates F<sub>254</sub> (0.25 mm thickness).

### *Collections of the plant*

Flowers of *Anthemis tinctoria* were collected in November 2004 at the “Profa. Irenice Silva” Garden of Medicinal Plants of the State University of Maringá. The plant was identified through authentic comparison by Dr. Cirino Correia Júnior, and a voucher specimen (No. HUM 1133) is deposited at the Herbarium of the State University of Maringá, Paraná, Brazil.

### *Separation of the components*

Dried flowers of *A. tinctoria* (130 g) were extracted with ethanol:water (9:1 v/v) by maceration for 8 days at room temperature. The solvent was removed in a rotating evaporator, to give an aqueous extract and a dark-green residue. The aqueous extract was lyophilised (21.0 g) and the water-insoluble residue was diluted with ethyl-acetate, yielding the ethyl-acetate extract (4.71 g). The aqueous and ethyl-acetate extracts were assayed against the epimastigote form of *T. cruzi*. The aqueous extract (13 g) was submitted to vacuum-column chromatography (32 g silica gel) and eluted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and methanol/water (9:1 v/v). Each fraction (hexane, F1; dichloromethane, F2; ethyl acetate, F3; methanol, F4; and methanol/water 9:1, F5) was assayed for antitrypanosomal activity. The dichloromethane fraction (500 mg), which showed the highest inhibitory activity, was chromatographed by column chromatography in Sephadex-LH-20 and eluted with chloroform/methanol (1:1 v/v). This

process yielded 8 subfractions, denominated F2a, F2b, F2c, F2d, F2e, F2f, F2g, and F2h. Subfraction F2g (140 mg) was chromatographed in Sephadex phase with movable phase, chloroform/methanol (1:1 v/v), yielding the subfraction (11 mg). The subfraction was identified as a mixture of isomeric labdane sesquiterpenes by analyses of spectral data of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  (Chart 1).

### ***Parasites***

Epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain were cultured in LIT (Liver Infusion Triptone broth) (Camargo 1964) with 10% fetal bovine serum (SFB) (Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) at 28 °C for 96 h. Amastigote and trypomastigote forms were grown in monolayers of LLCMK<sub>2</sub> cells in DMEM medium (Gibco Invitrogen) with 10% SFB in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### ***Antiproliferative activity against epimastigote forms***

The aqueous and ethyl-acetate crude extracts, fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and methanol/water ) and the semi-purified subfraction were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) at a final concentration not exceeding 1% (Yong *et al.* 2000) and assayed against the epimastigote form of *T. cruzi*. The experiments were performed on 24-well polystyrene plates containing 1 ml of diluted compound at different concentrations (from 1.0 to 1,000 µg/ml). The starting inoculum consisted of 10<sup>6</sup> parasites in logarithmic growth phase per well. The cells were incubated at 28 °C and the growth was determined by counting the parasites with a Neubauer hemocytometer (Improved Double Neubauer Ruling) every 24 h over a 7-day period. Benznidazole (N-benzyl-2-nitro-1-imidazolacetamide, Roche Pharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil) was used as a reference drug. The assays were performed in duplicate on separate occasions.

### ***Growth inhibition assay of mammalian-stage amastigote form of T. cruzi***

LLCMK<sub>2</sub> cells (kidney cells from Mulatto monkey) were plated on glass coverslips (diameter 13 mm) into 24-multiwell tissue culture plates and maintained in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. The cells were infected with trypomastigote forms at a parasite/cell ratio of 10:1. After 24 h, non-adhered parasites were washed out, and fresh DMEM medium, and the semi-purified subfraction containing sesquiterpene in various concentrations, was added. The cells were incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C for 96 h. The coverslips were washed 3 times with PBS, fixed with methanol and stained with Giemsa. Next, the coverslips were mounted on glass slides using Entellan (Merck), and the percentage of LLCMK<sub>2</sub> cells with internalised parasites (1) and the number of internalised parasites per LLCMK<sub>2</sub> cell (2) were determined by counting at least 200 cells per sample under a microscope (Olympus CX 31). The product of 1 and 2 determined the survival index.

### ***Cytotoxicity activity***

LLCMK<sub>2</sub> cells were seeded onto 24-well microtitre plates at a concentration of 2.0 x 10<sup>5</sup> cells/ml and allowed to proliferate for 48 h in DMEM containing 5% FBS at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> to form a cell monolayer. Different concentrations of the semi-purified subfraction containing sesquiterpene were applied to the monolayer and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. Next, the cells were treated with 10% trichloroacetic acid at 4 °C for one hour, gently washed in tap water, and allowed to dry at room temperature. A solution of 0.4% sulforhodamine B (in 1% acetic acid) was added to each well, and the plate was kept protected from light for 30 min at 4 °C. The wells were washed four times with 1% acetic acid, and 150 µl of 10 mM Tris-base was added and homogenised for 15 min. The absorbance was read at 530 nm in a microplate spectrophotometer (Bio Tek-Power Wave XS). The CC<sub>50</sub> (concentration that lysed 50% of cells) of the subfraction was calculated.

### ***Evaluation of morphological alterations by Scanning electron microscopy***

Epimastigote forms treated with IC<sub>50</sub> (0.2 µg/ml) or IC<sub>90</sub> (1.0 µg/ml) of the semi-purified sesquiterpene subfraction for 96 h were collected by centrifugation, washed in PBS

and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, containing 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> at 4 °C. After fixation, small drops of the sample were placed on a specimen support with poly-L-lysine. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical-point dried in CO<sub>2</sub>, sputter-coated with gold and observed in a SHIMADZU SS-550 Scanning electron microscope.

### ***Evaluation of the ultrastructural alterations in T. cruzi by Transmission electron microscopy***

After treatment with IC<sub>50</sub> or IC<sub>90</sub> of the semi-purified sesquiterpene subfraction for 96 h, epimastigote forms were washed in 0.01 M phosphate-buffered saline and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The cells were postfixed in a solution containing 1% OsO<sub>4</sub> and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in acetone, and embedded in Epon. Thin sections were collected on a copper grid (300 mesh), stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a Zeiss 900 transmission electron microscope.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed with the program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). One-Way Anova was applied, and a p-value less than 0.05 was regarded as significant.

## Results and Discussion

In the attempt to develop new drugs for treatment of infectious diseases, studies are carried out with compounds of both natural and synthetic origin. Many studies have demonstrated that crude extracts, fractions, and compounds isolated from medicinal plants exhibit antiprotozoal activity (Weninger *et al.* 2001; Abe *et al.* 2002; Luize *et al.* 2005; Lavaggi *et al.* 2007; Santoro *et al.* 2007; Izumi *et al.* 2008; Sala *et al.* 2008). In this study, we evaluated the antitrypanosomal activity of the crude extract, fractions, and a subfraction rich in a mixture of isomeric labdane sesquiterpenes, obtained from flowers of *A. tinctoria*, against epimastigote, amastigote, and trypomastigote forms of *T. cruzi*.

The analyses of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the semi-purified subfraction showed a signal of a mixture of isomers of cross-conjugated terpenoid ketones derived from labdane sesquiterpenes that are frequently found in the family Asteraceae (Kalsi *et al.* 1978). Three types of classes of secondary metabolites have been detected in *Anthemis*: polyacetylenes (Christensen 1992), flavonoids (Williams and Greenham 2001), and sesquiterpene lactones (Bulatovic 1998). Previous chemical studies of species of *Anthemis* have shown the presence of sesquiterpene lactones (Baruah *et al.* 1985; Bruno *et al.* 1998; Vajs *et al.* 2000; Konstantinopoulou *et al.* 2003; Saroglou 2006; Staneva *et al.* 2008; Todorova *et al.* 2008). The three major types of sesquiterpene lactones are germacrolides, eudesmanolides, and guaianolides (Vajs *et al.* 1999). Recently it was demonstrated that anthecularin, a sesquiterpene lactone isolated from *Anthemis auriculata*, shows antimalarial activity, and also antitrypanosomal activity against *Trypanosoma brucei* (Karioti *et al.* 2007).

The hydroalcoholic crude extracts, fractions, and semi-purified subfraction obtained from *A. tinctoria* flowers were used in order to investigate the antiprotozoal activity of this plant against *T. cruzi*. A progressive increase in the antitrypanosomal effect was observed in the course of the purification process. Figure 1A shows the percentage of growth inhibition of the epimastigote form treated with the aqueous phase of the crude extract for 96 h of incubation at 28 °C. This extract showed a dose-dependent inhibitory activity of 77.4 and 91.9% at 5 and 10 µg/ml, respectively. In the same concentrations, the ethyl-acetate extract showed an inhibitory activity of 31.7 and 76.8%. The 50% inhibitory

concentration ( $IC_{50}$ ) of the crude extract aqueous phase was 2.3  $\mu\text{g/ml}$ . On the basis of this finding, the crude aqueous extract was fractionated on silica gel into five fractions: hexane (F1), dichloromethane (F2), ethyl-acetate (F3), methanol (F4), and methanol:water (F5). The F2 fraction showed an  $IC_{50}$  of 1.8  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 1B), and the F3 fraction an  $IC_{50}$  of 5.0  $\mu\text{g/ml}$  (data not shown). The other fractions (F1, F4, and F5) showed lower inhibitory activity, with  $IC_{50}$  of 26.8, 23.6, and 145  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Subsequently, the F2 fraction was submitted to the Sephadex column, yielding 8 subfractions: F2a, F2b, F2c, F2d, F2e, F2f, F2g, and F2h. Figure 1C illustrates the inhibitory activity of the F2g subfraction, with a percentage of inhibition of growth of the epimastigote form above 90% for all concentrations used (1 - 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). The F2g subfraction, which was rich in a mixture of isomeric labdane sesquiterpenes, showed an  $IC_{50}$  at 0.2  $\mu\text{g/ml}$ . In comparison, Luize *et al.* (2006) investigated the *in vitro* antiproliferative effect of eupomatenoid-5, a sesquiterpene isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallecens*, a plant of the same family (Compositae) as *A. tinctoria*, against *T. cruzi*. Our results obtained with a mixture of sesquiterpenes also showed that this mixture was more active than Benzonidazole.

The effect of the semi-purified subfraction obtained from flowers of *A. tinctoria* on the interaction of *T. cruzi* with LLCMK<sub>2</sub> cells was evaluated. The treatment of LLCMK<sub>2</sub> cells infected with the amastigote form showed that the semi-purified subfraction had a dose-dependent antitrypanosomal activity (Figure 2), leading to considerable reduction in both the percentage of infected cells and the mean number of parasites per infected cell. After 96 h of incubation, the percentage of LLCMK<sub>2</sub> cells with internalised parasites was higher for the control than for cells treated with the semi-purified subfraction. At that time, the control showed a mean of 34.1 amastigotes per cell, with 40.6% of cells infected. Cells treated with 1.0  $\mu\text{g/ml}$  showed a mean of 18.1 internalised amastigotes per cell, with 22.7% of cells infected. Treatment of the cells with 5.0  $\mu\text{g/ml}$  resulted in only 4.7% infected cells and 4.2 parasites per cell.

Important criteria for the investigation of compounds with activity against *T. cruzi* are both their therapeutic potential, and the lack of a cytotoxic effect on mammalian cells. We evaluated the cytotoxicity in LLCMK<sub>2</sub> cells treated with the crude extract aqueous phase, dichloromethane fraction, and the semi-purified subfraction (Figure 3). The 50% cytotoxicity concentration ( $CC_{50}$ ) in LLCMK<sub>2</sub> cells treated with the crude extract aqueous

phase, dichloromethane fraction, and semi-purified subfraction were 17.3 µg/ml, 4.0 µg/ml, and 7.0 µg/ml, respectively. The best selectivity index (SI) ratio ( $CC_{50}$  for LLCMK<sub>2</sub> cells/ $IC_{50}$  for protozoans) was obtained by the semi-purified subfraction, with SI of 35.0. The dichloromethane fraction and crude extract showed SI of 2.2 and 7.5, respectively (Table 1).

Morphological alterations in epimastigote forms treated with the semi-purified subfraction were observed by scanning electron microscopy. Epimastigote forms in the presence of the semi-purified subfraction at  $IC_{50}$  (0.2 µg/ml) showed distortions of the parasite cell body, and the cell shape was severely affected. Increase of the cell volume and rounding of the cell body were observed (Figure 4B, C, and D). At  $IC_{90}$  (1.0 µg/ml), alterations were more evident (Figure 4 E and F). Figure 4A shows the characteristic elongated shape of an untreated protozoan, or treated only with 1% DMSO (control), with a terminal flagellum that emerges from the flagellar pocket and remains tightly attached to the cell body along its length, typical of the epimastigote form.

Ultrastructural alterations of the epimastigote form treated with the semi-purified subfraction were observed by transmission electron microscopy. Untreated *T. cruzi* or epimastigotes treated with 1% DMSO showed the typical ultrastructure (Figure 5A). Epimastigotes treated with the semi-purified sesquiterpene-rich subfraction at concentrations of  $IC_{50}$  (Figure 5B, C, and D) and  $IC_{90}$  (Figure 5E and F) showed ultrastructural alterations. One important change took place in the membrane lining the cell body and flagellum, with portions of the membrane detached from the cell body, forming blebs, and in some cases whole sections of the plasma membrane separated from the cell body (Figure 5B and D). The formation of blebs was also observed in *T. cruzi* treated with compounds ER27856 and BPQ-OH (3-biphenyl-4yl)-3-hydroxyquinuclidine BPQ-OH (Braga *et al.* 2004). These compounds are inhibitors of squalene synthase, the enzyme involved in the biosynthesis of ergosterol. The change in the chemical composition of the membrane alters the ratio of phospholipids and sterols, affecting the stability of the membranes, and especially the integrity of the cell body (Denny *et al.* 2001). This may explain the morphological changes observed in epimastigotes treated with the sesquiterpene-rich subfraction of the flower of *A. tinctoria*. Pedroso *et al.* (2006) also

showed the presence of blebs in cell and flagellar-pocket membranes in *Crithidia deanei* treated with essential oil from *Cymbopogons citratus*.

In conclusion, this study showed that extracts, fractions, and a semi-purified subfraction containing sesquiterpene obtained from flowers of *A. tinctoria* have potential antiproliferative activity *in vitro* against *T. cruzi*. Therefore, natural products may be a source of new drugs with antiprotozoal activity that could be used to treat parasitic infectious diseases such as Chagas' disease.

**Acknowledgements:**

This study was supported through grants from DECIT/SCTIE/MS and MCT by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), and Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

## Reference

- Abe F., Nagafugi S., Yamauchi T., Okabe H., Maki J., Higo H., Akahane H., Aguiar A., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R. (2002) Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican Plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, root of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1188-1191
- Ahmad I., Beg A. Z. (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 113-123
- Alves T. M. A., Silva A. F., Brandão M., Grandi T. S. M., Smânia E. F., Smânia., Zani C. L. (2000) Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**: 367-373
- Baruah RN, Bohlmann F, King RM. (1985) Novel Sesquiterpene Lactones from *Anthemis cotula*. *Planta Med.* **51**: 531-532
- Braga M. V., Urbina J. A., De Souza W. (2004) Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**: 72–78
- Bruno M, Maggio A, Arnold NA, Díaz JG, Herz W. (1998) Sesquiterpene lactones from *Anthemis plutonia*. *Phytochemistry* **49**: 1739-1740
- Bulatovic V. (1998) Comparative examination of chemical constituents of species *Anthemis carpatica* and *Anthemis montana*. *PhD thesis, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.* 57-66
- Calixto J. B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **48**: 179-189
- Camargo E. C. (1964) Growth differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **06**: 93-100
- Christensen L. (1992) Acetylenes and related compounds in *Anthemidae*. *Phytochemistry* **31**: 7-49
- Croft L. S., Barret P. M., Urbina A. J. (2005) Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitol.* **21**: 508-512

- De Souza W. (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Inter. Rev. Cytol.* **86**: 197-283
- Denny P. W., Field M. C., Smith D. F. (2001) GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastid. *FEBS Letters* **491**: 148-153
- Duarte T. C. M., Figueira M. G., Sartoratto A., Rehder G. L. V., Delarmelina C. (2005) Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 305-311
- Farnsworth N. R., Morris R. W. (1976) Higher plants – the sleeping giant of drug development. *Am. J. Pharm. Educ.* **148**: 46-52
- Grace M. H. (2002) Chemical composition and Biological Activity of the Volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea discoridis*. *Phytoterapy Res.* **16**: 183-185
- Holla M., Svajdlenka S., Zibrunova B., Tekel J., Havranek E. (2000) Composition of the oil from the flowerheads of *Anthemis tinctoria* L. cultivated in Slovak Republic. *J. Essential Oil Res.* **12**: 714-716
- Izumi E., Morello L. G., Ueda-Nakamura T., Yamada-Ogatta S. F., Dias Filho B. P., Cortez D. A. G., Ferreira I. C. P., Morgado-Díaz A. M., Nakamura C. V. (2008) *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.* **118**: 324-330
- Kalsi P. S., Singh O. S., Chhabra B. R. (1978) Cross conjugated terpenoid ketones: a new group of plant growth regulators. *Phytochemistry* **17**: 576-577
- Karioti A, Skaltsa H, Linden A, Perozzo R, Brun R, Tasdemir D (2007) Anthecularin: a novel sesquiterpene lactone from *Anthemis auriculata* with antiprotozoal activity. *J. Org. Chem.* **72**: 8103-8106
- Konstantinopoulou M, Karioti A, Skaltsas S, Skaltsa H. (2003) Sesquiterpene lactones from *Anthemis altissima* and their anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Nat Prod.* **66**: 699-702
- Lavaggi M .L., Aguirre G., Boiani L., Orelli L., García B., Cerecetto H., González M. (2007) Pyrimido[1,2-a]quinoxaline 6-oxide and phenazine 5,10-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.* **43**:1737-1741
- Liszt P. M., Hörhammer L. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. (1972) Springer Verlag Heidelberg III. 113

- Luize P. S., Tiunan T. S., Morello L. G., Maza P. K., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Cortez D. A. G., Mello J. C. P., Nakamura C. V. (2005) Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharmaceut. Sci.* **41**: 85-94
- Luize P. S., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Cortez D. A. G., Nakamura C. V. (2006) Activity of neolignans isolated from *Piper regnelli* (Miq) C. DC. Var. *Pallescens* (C. DC.) Yunk against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 2126-2130
- Mann C., Staba E. (1986) Spices and Medical Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, v. I. *Food Products Press, USA*. p.235-280
- Martinez M. J., Betancourt J., Alonso-González N., Jauregui A. (1996) Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **52**: 171-174
- Masterová I.; Grancai D.; Grancoivá Z.; Pour M.; Ubik K. (2005) A new flavonoid: tinctosid from *Anthemis tinctoria* L. *Short communications Pharmazie* **60**: 956-957
- Pedroso R. B., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B. P., Cortez D. A. G., Cortez L. E. R., Morgado-Díaz J. A., Nakamura C. V. (2006) Biological Activities of Essential Oil Obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. *Acta Protozool.*, **45**: 231-240
- Salas C., Tapia R. A., Ciudad K., Armstrong V., Orellana M., Kemmerling U., Ferreira J., Maya J. D., Morello A. (2008) *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* **15;16**: 668-674
- Santoro G. F., Cardoso M. G., Guimarães L. G. L., Mendonça L. Z., Soares M. J. (2007) *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol.* **116**: 283-290
- Saroglou V., Dorizas N., Kypriotakis Z., Skaltsa H. (2006) Analysis of essential oil composition of eight *Anthemis species* from Greece. *J. Chromatogr.* **1104**: 313-322
- Sosa E. S. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the determinate phase of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 526-529
- Staneva J, Todorova M, Evstatieva L. (2002) Sesquiterpene lactones from *Anthemis carpatica* Willd. *Z Naturforsch* **57**: 769-772

- Staneva JD, Todorova MN, Evstatieva LN. (2008) Sesquiterpene lactones as chemotaxonomic markers in genus *Anthemis*. *Phytochemistry* **69**: 607-618
- Todorova M, Staneva J, Denkova P, Evstatieva L. (2008) Irregular linear sesquiterpene dilactones from *Anthemis auriculata* Boiss *Nat. Prod. Res.* **22**: 907-914
- Vajs V, Todorović N, Bulatović VB, Menković N, Macura S, Juranić N, Milosavljević S. (2000) Further sesquiterpene lactones from *Anthemis carpatica*. *Phytochemistry* **54**: 625-633
- Vajs V., Bulatovic V., Fodulovic-Savikin K., Mentovic N., Macura S., Juranic N., Milosavijevic S. (1999) Highly oxygenated guaianolides from *Anthemis cretica* subsp. *Cretica*. *Phytochemistry* **50**: 287-291
- Vaverkova S., Haban M., Eerna K. (2001) Qualitative properties of *Anthemis tinctoria* and *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*) under different environmental conditions. Ecophysiology of plant production processes in stress conditions. Abstracts of the fourth International Conference, Račkova dolina, Slovakia. **02**: no. 1-2
- Viotti R., Vigliano C., Armenti H., Segura E. (1994) Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long term follow-up. *Am. Heart J.* **127**: 151-162
- Weninger B., Robledo S., Arango G. J., Deharo E., Aragón R., Muñoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001) Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.* **78**: 193-200
- WHO – World Health Organization. Chagas disease. <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>>. Acesso em 18/03/2008
- Williams C. A., Greenham J. (2001) The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the anthemidae. *Biochem. System. Ecol.* **29**: 929-945
- Yong V., Schmitz, V., Vannier-Santos, M. A. (2000) Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**: 47-59

## Figure Legends

Chart 1. Fractionation scheme of sesquiterpene from aqueous extract of flowers of *Anthemis tinctoria*

Figure 1. Effects of crude extract aqueous phase (A), dichloromethane fraction (B) and semi-purified subfraction (C) obtained from flowers of *Anthemis tinctoria*, on the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigote form. ♦ Control; ■ 1000 µg/ml; ▲ 100 µg/ml; ○ 50 µg/ml; □ 10 µg/ml; ◇ 5 µg/ml; ● 1 µg/ml

Figure 2. Growth inhibition assay of mammalian-stage amastigote form of *Trypanosoma cruzi* treated with a semi-purified subfraction obtained from *Anthemis tinctoria*

Figure 3. Cytotoxicity activity on LLCMK<sub>2</sub> cells. (○) aqueous extract, (▲) dichloromethane fraction; (□) semi-purified subfraction obtained from flowers of *Anthemis tinctoria*

Figure 4. Morphological alterations of *Trypanosoma cruzi* epimastigote form cultured at 28 °C for 96 h, observed by scanning electron microscopy, in the absence (A) and presence of the semi-purified subfraction at concentrations of IC<sub>50</sub> (B, C, and D) and IC<sub>90</sub> (E and F). Bar = 1 µm

Figure 5. Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms cultured at 28 °C for 96 h, observed by transmission electron microscopy, in the absence (A) and presence of semi-purified subfraction at concentrations of IC<sub>50</sub> (B,C and D) and IC<sub>90</sub> (E and F). er-endoplasmic reticulum; f-flagellum; g-glycosome; m-mitochondrion; n-nucleus; v-vacuole. Bar = 1 µm

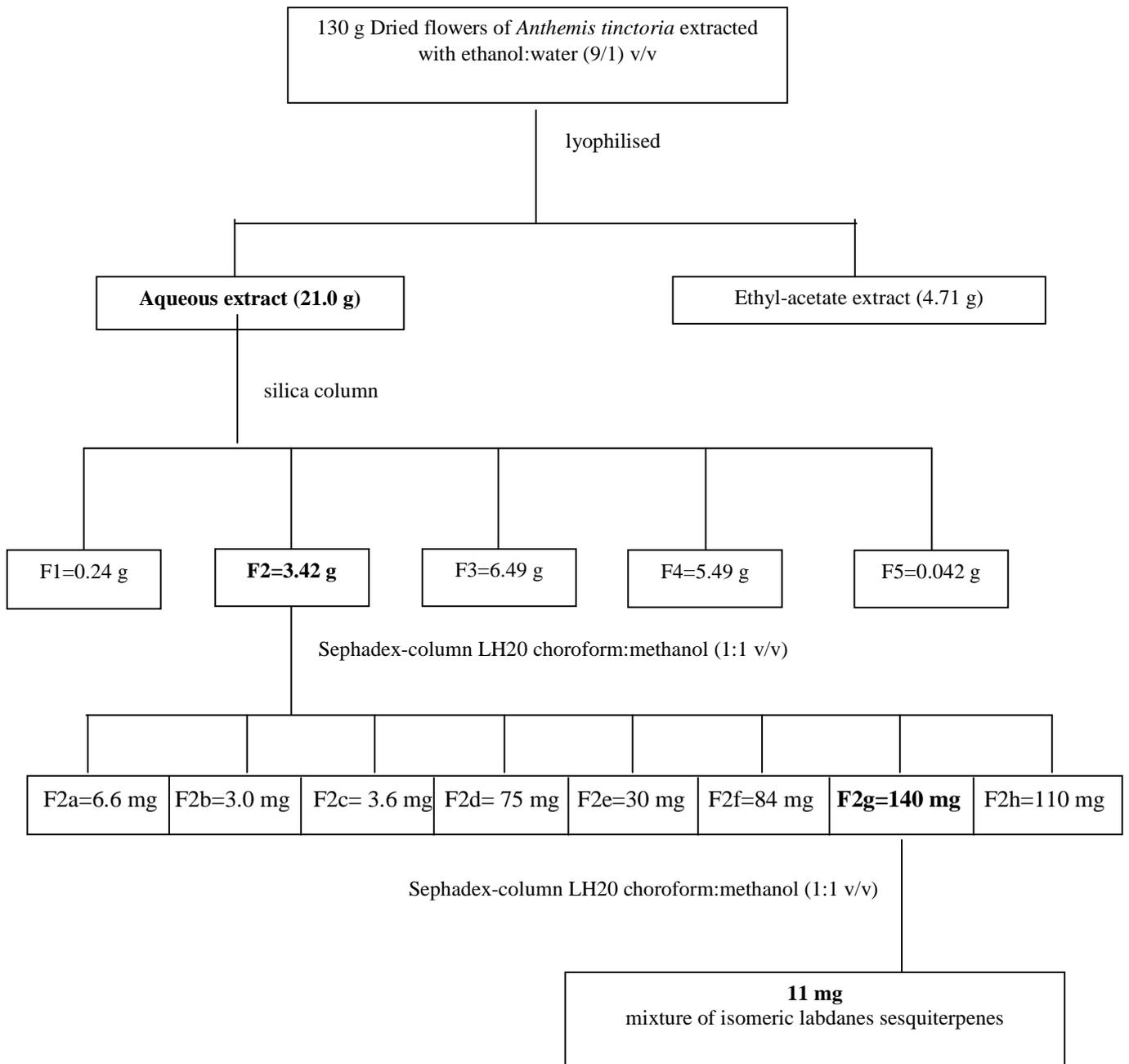


Chart 1. Fractionation scheme of sesquiterpene from aqueous extract of flowers of *Anthemis tinctoria*

**Table 1.** Citotoxicity, growth inhibition and selectivity index of the crude extract aqueous phase, dichlorometane fraction, and semi-purified subfraction obtained of *Anthemis tinctoria*

Drugs	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
Crude extract aqueous phase	17.3	2.3	7.5
Dichlorometane fraction	4.0	1.8	2.2
Semi-purified subfraction	7.0	0.2	35.0

$$IS = CC_{50}/IC_{50}$$

Figure  
subfra  
epima  
μg/ml  
Figure

