



Universidade Estadual De Maringá
Centro De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas



LUIS HENRIQUE DALBELLO YAMASHITA

**Avaliação do Efeito do Óleo Essencial de *Piper marginatum* e Seu
Possível Mecanismo de Ação Sobre *Trypanosoma cruzi***

Maringá
2022



Universidade Estadual De Maringá
Centro De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas



LUIS HENRIQUE DALBELLO YAMASHITA

**Avaliação do Efeito do Óleo Essencial de *Piper marginatum* e
Seu Possível Mecanismo de Ação Sobre *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Danielle Lazarin Bidoia

Coorientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Y19a

Yamashita, Luis Henrique Dalbello

Avaliação do efeito do óleo essencial de *Piper marginatum* e seu possível mecanismo de ação Sobre *Trypanosoma cruzi* / Luis Henrique Dalbello Yamashita. -- Maringá, PR, 2022.

62 f.color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Lazarin-Bidóia.

Coorientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Doença de chagas. 2. Atividade tripanocida. 3. Morte celular. 4. Apoptose. 5. *Piper* sp.. I. Lazarin-Bidóia, Danielle, orient. II. Nakamura, Celso Vataru, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 616.96

LUIS HENRIQUE DALBELLO YAMASHITA

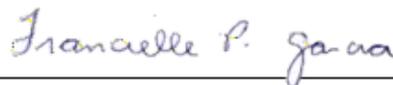
Avaliação do Efeito do Óleo Essencial de *Piper marginatum* e Seu Possível Mecanismo de Ação Sobre *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 04/julho/2022.



Prof.^a Dr.^a Danielle Lazarin Bidoia
Universidade Estadual de Maringá



Prof.^a Dr.^a Francielle Pelegrin Garcia
Universidade Estadual de Maringá



Prof.^a Dr. Hélio Voltato
UNESPAR

BIOGRAFIA

Luis Henrique Dalbello Yamashita, nascido em Maringá-PR em 01/12/1998, é filho de José Luis Yamashita e Salete Maria Dalbello Yamashita. Concluiu ensino fundamental (2012) e médio (2015) no Colégio de Aplicação Pedagógica na Universidade Estadual de Maringá. Graduou-se em Ciências Biológicas com habilitação em Licenciatura e Bacharelado na Universidade Estadual de Maringá em 2020. Neste mesmo ano, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) na Universidade Estadual de Maringá. Atualmente, como membro do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (LITFaC – Bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá, desenvolve pesquisas que visam avaliar a atividade de compostos naturais e/ou sintéticos frente aos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais José Luis e Salete, incipientes na minha jornada, por terem me encaminhado da melhor forma que encontraram a opulência. A minha irmã, Maria Luisa, por todo apoio, carinho e paciência.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Danielle Lazarin Bidóia e coorientador, Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, não só pela paciência, tempo dedicado e ensinamentos passados, mas também por terem me aceito como aluno de mestrado frente a azáfama que nos perpassava.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por me permitir completar este passo da minha carreira.

Aos meus amigos, Marina Terao, Bianca Manin, Guilherme Catellani, Aline Cristina e muitos outros que a biologia me trouxe, e, que até hoje, apesar dos caminhos diferentes, ainda assim estão sempre presentes de forma paciente a me ouvir e abrandar o peso do dia a dia.

Aos meus amigos do Wakadaiko, que outorgam, através dos taikos, a liberdade de expressão e sentimental, permitindo a construção de responsabilidade e apoio.

Aos meus companheiros do LITFaC, em especial Rodolfo Balbinot, Rayanne Regina Beltrame e Amanda Bakoshi pela paciência e desempenho excelso em me acompanhar e ensinar.

E a CAPES, CNPq pelo aporte financeiro.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um resumo geral, em português e inglês, e um artigo científico contemplando os principais resultados obtidos durante o mestrado. O artigo descreve a atividade tripanocida de compostos provenientes do espécimen *Piper marginatum*, bem como seus mecanismos de ação sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O artigo científico será submetido na revista *PLOS Neglected Tropical Diseases* do grupo editorial *Public Library of Science* (Qualis CBI – A1).

RESUMO GERAL

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 8 milhões de infectados no mundo. Sua principal forma de transmissão se dá pela via oral e transfusão sanguínea, contribuindo para um potencial antropológico de distribuição. Ao infectar um hospedeiro, a enfermidade passa por uma fase aguda e uma crônica que causa danos fisiológicos e estruturais ao coração, fígado, entre outros. Hodiernamente, o tratamento é composto pelo benzonidazol e nifurtimox, fármacos de baixa eficácia e alta toxicidade. Desta maneira, a busca por novas substâncias inspiradas na medicina popular se tornou uma alternativa promissora, onde os organismos do gênero *Piper* se destacam pela diversidade de metabólitos secundários e uso comum na medicina tradicional. A caracterização fitoquímica do óleo essencial (PO) e extrato etanólico (PX) de *P. marginatum* levaram ao isolado 3',4' - (metilenodioxi)propiofenona (MP), que após avaliação mostraram potencial atividade antileishmania. Portanto, baseando-se no uso tradicional de plantas do gênero *Piper* e os resultados promissores de *P. marginatum*, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade antiparasitária do óleo essencial de *P. marginatum* sobre *T. cruzi*, assim como, determinar os possíveis mecanismos de ação que levam a morte celular do parasito. PO apresentou forte atividade seletiva contra todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. A análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou torção da membrana plasmática, diminuição e arredondamento do corpo celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático e encurtamento do flagelo. Concomitantemente, os mecanismos bioquímicos confirmaram despolarização da membrana mitocondrial, formação de espécies oxidantes, acúmulo de corpos lipídicos, além de alterações na integridade da membrana plasmática do parasito. Em conjunto estes fatores levaram ao epílogo parasitário, provavelmente, por mecanismos de apoptose tardia. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, justifica-se a continuidade desta pesquisa para refino e possível desenvolvimento destas substâncias à cerca do tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; atividade tripanocida, morte celular, apoptose, *Piper* sp.

ABSTRACT

The Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about 8 million people worldwide. Its main form of transmission is through the oral route and blood transfusion, contributing to a potential anthropological distribution. By infecting a host, the disease goes through an acute and then chronic phase that presents physiological and structural damage to the heart, liver, and others. Today, the treatment is composed of benznidazole and nifurtimox, drugs of low efficacy and high toxicity. Thus, the search for new new substances inspired by popular medicine has become a promising alternative, where organisms of the genus *Piper* stand out for the diversity of secondary metabolites and common use in traditional medicine. The phytochemical characterization of the essential oil (PO) and ethanolic extract (PX) of *P. marginatum* led to the isolate 3',4'-(methylenedioxy)propiophenone (MP), which after evaluation showed potential antileishmanial activity. Therefore, based on the traditional use of plants of the genus *Piper* and the promising results of *P. marginatum*, the objectives of this work were to evaluate the antiparasitic activity of the essential oil of *P. marginatum* on *T. cruzi*, as well as to determine the possible mechanisms of action that lead to the cell death of the parasite. PO showed selective activity against all evolutionary forms of *T. cruzi*. The scanning electron microscopy analysis showed the twisting of the plasma membrane, decrease and rounding of the cell body, extravasation of the cytoplasmic content and shortening of the flagellum. Accordingly, biochemical mechanisms confirmed depolarization of the mitochondrial membrane, formation of oxidant species, accumulation of lipid bodies, and changes in parasite plasma membrane integrity. Together, these factors led to parasite epilogue, probably by mechanisms of late apoptosis. Therefore, based on the results obtained, the continuity of this research is justified to refine and possibly develop these substances for the treatment of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, trypanocidal activity, cell death, apoptosis, *Piper* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia óptica da avaliação da atividade antiparasitária de PO sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi* tratadas por 96 h. (A) Controle negativo; (B) PO (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$); e 2 \times PO (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Barra de escala: 10 μm 30

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi*. (A, B) Epimastigotas não tratadas; (C, D) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h; (E-I) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h; (J-O) Epimastigotas tratadas com 2 \times CI_{50} de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h. Seta branca indica extravasamento de conteúdo citoplasmático. Cabeça de seta branca indica dano à membrana plasmática. Barras de escala: 5 μm (A-E, G, J), 2 μm (I, K, M, N) e 1 μm (F, H, L, O)..... 31

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de tripomastigotas de *T. cruzi*. (A, B) Tripomastigotas não tratadas; (C, D) Tripomastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h; (E-I) Tripomastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h; (J-O) Tripomastigotas tratadas com 2 \times CI_{50} de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h. Seta branca indica extravasamento de conteúdo citoplasmático. Cabeça de seta branca dano à membrana plasmática. Barras de escala: 4 μm (A-C, J, M, N), 2 μm (D, E, G, I, K) e 1 μm (F, H, L, O)..... 32

Figura 4. Determinação da integridade de membrana plasmática de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com IP (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h. (A) Gráfico de pontos: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com digitonina (40 μM); (c) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com 2 \times CI_{50} de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$ 34

Figura 5. Determinação do grau de lipoperoxidação de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com DPPPP (50 μM) pós-tratamento por 2 h com H_2O_2 (1 mM) e 24 h com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 2 \times CI_{50} de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). *** $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$ 35

Figura 6. Determinação da exposição de fosfatidilserina em formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Anexina V-FITC e IP (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h. (A) Gráfico de pontos: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com ActD (20 μM); (c) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas

tratadas com CI_{50} PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. $^{**}p < 0,005$ e $^{*}p < 0,0001$ 37

Figura 7. Avaliação do tamanho celular de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas por 24 h. (A) Histograma: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com ActD ($20 \mu\text{M}$); (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. $^{*}p < 0,0001$ 39

Figura 8. Determinação do ciclo celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h com Taxol ($10 \mu\text{M}$), BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (A) Histograma representativo dos tratamentos. (B) Gráfico de barras representando média \pm desvio padrão da porcentagem de células em cada subpopulação, calculadas pelo modelo de Dean-Jett-Fox (FlowJo). $^{***}p < 0,05$, $^{**}p < 0,005$ e $^{*}p < 0,0001$ 40

Figura 9. Determinação do acúmulo de corpos lipídicos de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com vermelho do Nilo ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Microscopia de fluorescência: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. $^{***}p < 0,05$ e $^{*}p < 0,0001$ 41

Figura 10. Determinação da formação de vacúolos autofágicos de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com MDC ($0,05 \text{ mM}$), pós-tratamento por 24 h com PBS, BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). $^{**}p < 0,005$ e $^{*}p < 0,0001$ em relação a seus respectivos controles negativos. α representa $p < 0,05$ nos respectivos tratamentos que apresentaram diferença significativa entre a adição ou não de wortimanina ($1 \mu\text{M}$). 42

Figura 11. Determinação da formação de vacúolos ácidos de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com laranja de acridina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Histogramas: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. $^{**}p < 0,005$ e $^{*}p < 0,0001$ 44

Figura 12. Determinação dos níveis de óxido nítrico de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com DAF-FM DA (1 μM), pós-tratamento por 24 h. (A) Microscopia de fluorescência: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. $**p<0,005$ e $*p<0,0001$ 45

Figura 13. Determinação do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Rh123 (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Histograma: histograma preenchido representa epimastigotas não tratadas em comparação com (a) Epimastigotas tratadas com CCCP (100 μM); (b) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (c) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h. $*p<0,0001$ 47

Figura 14. Determinação dos níveis de ATP de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com kit CellTiter-GLO, pós-tratamento por 24 h com KCN (200 μM), BZ (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h. $***p<0,05$ e $**p<0,005$ 48

Figura 15. Determinação dos níveis de ERO de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com H_2DCFDA (10 μM), pós-tratamento por 24 h. (A) Histogramas: histograma preenchido representa epimastigotas não tratadas em comparação com (a) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (b) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (c) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. $**p<0,005$ e $*p<0,0001$ 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade antiparasitária de PO, PX e MP sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> e células LLC-MK2.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ActD	actinomicina D
AFI	aumento final da imagem
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BOD	<i>biochemical oxygen demand</i>
BZN	benznidazol
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CC ₅₀	concentração citotóxica para 50% das células
CE ₅₀	concentração efetiva contra 50% dos parasitos
CI ₅₀	concentração inibitória de 50% dos parasitos
CO ₂	dióxido de carbono
DAF-FM	diacetato de diaminofluoresceína
DCF	diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPP	difenil-1-pirenilfosfina
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EUA	Estados Unidos da América
h	horas
H ₂ DCFDA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IP	iodeto de propídio
IS	índice de seletividade
KCN	cianeto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
K ₄ [Fe (CN) ₆]	ferrocianeto de potássio
LIT	<i>liver infusion triptose</i>
M	molar
MDC	monodansilcadaverina

MEV	microscopia eletrônica de varredura
mM	milimolar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MP	3',4'-(metilenodioxi)propiofenona
MTT	brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanômetro
NO ₃ ⁻	peroxinitrito
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OsO ₄	tetróxido de ósmio
PBS	tampão salina fosfato
pH	potencial de hidrogênio
PO	óleo essencial de <i>Piper marginatum</i>
PX	extrato bruto de <i>P. marginatum</i>
RE	retículo endoplasmático
Rh123	rodamina 123
SFB	soro fetal bovino
U.A.	unidades arbitrárias
XTT	hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)carbonil]-2H- tetrazólio)
ΔΨ _m	potencial de membrana mitocondrial
μg	micrograma
μm	micrômetro
μM	micromolar
λ _{em}	comprimento de onda de emissão
λ _{ex}	comprimento de onda de excitação
•OH	radical hidroxila
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1. Reagentes.....	21
2.2. Parasitos.....	21
2.3. Células LLC-MK2	21
2.4. Material botânico	22
2.5. Obtenção do óleo essencial e extrato etanólico	22
2.6. Ensaio antiproliferativo sobre formas epimastigotas.....	22
2.7. Ensaio antiproliferativo sobre formas amastigotas.....	22
2.8. Ensaio de viabilidade celular de formas tripomastigotas	23
2.9. Ensaio de citotoxicidade sobre células LLC-MK2.....	23
2.10. Atividade hemolítica.....	24
2.11. Avaliação das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura .	24
2.12. Condições de tratamento para avaliação dos parâmetros bioquímicos	24
2.13. Determinação da integridade da membrana plasmática	25
2.14. Determinação do grau de lipoperoxidação	25
2.15. Determinação da exposição de fosfatidilserina	25
2.16. Determinação do tamanho celular	26
2.17. Determinação do ciclo celular	26
2.18. Determinação da formação de corpos lipídicos.....	26
2.19. Determinação da formação de vacúolos autofágicos	27
2.20. Determinação da formação de vacúolos ácidos.....	27
2.21. Determinação dos níveis de óxido nítrico	27
2.22. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	28
2.23. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais.....	28
2.24. Determinação dos níveis de ATP intracelular	28
2.25. Análises estatísticas	29
3. RESULTADOS	29
3.1. Avaliação da atividade dos compostos provenientes de <i>P. marginatum</i> sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> , células LLC-MK2 e hemácias	29
3.2. Alterações morfológicas	30

3.3. Determinação da integridade da membrana plasmática	33
3.4. Determinação do grau de lipoperoxidação	35
3.5. Determinação da exposição de fosfatidilserina	36
3.6. Determinação do tamanho celular	38
3.7. Determinação do ciclo celular	40
3.8. Determinação da formação de corpos lipídicos.....	40
3.9. Determinação da formação de vacúolos autofágicos	42
3.10. Determinação da formação de vacúolos ácidos.....	43
3.11. Determinação dos níveis de óxido nítrico	45
3.12. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	46
3.13. Determinação dos níveis de ATP	48
3.14. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais	49
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada. Inicialmente endêmica das Américas do Sul e Central, se propagou através dos processos de globalização e causa mais de 10 mil novos casos anuais tendo atualmente cerca de 8 milhões de infectados (LIDANI et al., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

T. cruzi faz parte da classe Kinetoplastea, grupo caracterizado pela presença de uma única mitocôndria que se ramifica pelo corpo celular do protozoário e contém em seu interior o cinetoplasto, organela onde se encontra material genético organizado em maxicírculos e minicírculos (DE SOUZA, 2009). O parasito possui em seu ciclo de vida, três formas evolutivas principais: 1. Tripomastigotas, infectantes, caracterizadas pela vida livre e flagelo externo, são denominadas metacíclicas quando presentes nas excretas do vetor, e, quando no sangue de vertebrados, sanguíneas; 2. Epimastigotas, formas com flagelo externo, alta mobilidade e multiplicativas no inseto vetor; e 3. Amastigotas que se multiplicam dentro das células do hospedeiro vertebrado (ELIAS et al., 2007).

Preliminarmente a principal via de transmissão da doença de Chagas era vetorial, e seus vetores, os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) possuem hábitos noturnos e só são capazes de se desenvolver e procriar realizando a hematofagia. Existem descritas cerca de 151 espécies de triatomíneos agrupadas em 18 gêneros, dentre eles os de maior importância epidemiológica são: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Eratyrus* e *Panstrongylus* (DOCAMPO; MORENO, 2017; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). Entretanto, com os programas de conscientização e controle da propagação acerca dos vetores, atualmente a principal forma de transmissão da doença de Chagas se dá pela via oral e transfusão sanguínea (MANGANO et al., 2021; BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015; ASSAL; PASSOS et al., 2012; CORBI, 2011).

Ao infectar um hospedeiro humano, a enfermidade passa uma fase inicial aguda, caracterizada por parasitemia aparente, onde os sintomas (febre prolongada, dor de cabeça, fraqueza intensa, inchaço no rosto e pernas), se houverem, aparecem em um período de cerca de três meses, variando de acordo com o processo de infecção. Esta fase pode ser caracterizada pelo aparecimento do chagoma de inoculação (somente pela infecção vetorial) e sinal de Romanã. Em seguida o quadro febril e a parasitemia tendem a diminuir, definindo a transição para a fase crônica, que geralmente começa com um longo período de latência clínica chamado de forma indeterminada. Pós forma indeterminada, muitos pacientes infectados apresentam

danos fisiológicos e estruturais no coração, fígado, cólon, baço, pulmões, entre outros (PRATA, 2001).

Hodiernamente, o tratamento é composto pelos medicamentos benznidazol e nifurtimox, fármacos de resposta insatisfatória devido à baixa eficácia durante a fase crônica da doença e alta toxicidade, que levam à interrupção do tratamento (MORILLO et al., 2015, 2017; VALLEJO et al., 2016; RUMI et al., 2013; VIOTTI et al., 2006). Da mesma maneira, ainda não foi encontrado alvo adequado para o desenvolvimento de vacinas eficientes, impedindo a continuidade do desenvolvimento de condutas para prevenção da doença de Chagas, além das já existentes que se alicerçam somente no controle populacional do inseto vetor (FERRAGUT; ACEVEDO; GÓMEZ, 2021; RAWAL et al., 2021). Portanto, baseando-se no que foi descrito acima, se faz necessária a busca por novos compostos que visam melhorar a qualidade de vida dos atuais enfermos, além de tornar seguro e eficaz o tratamento de novos infectados.

Diante da limitada eficácia terapêutica e elevada toxicidade dos fármacos disponíveis, somadas a rica biodiversidade botânica local, a busca de novas substâncias inspiradas na medicina popular tornou-se uma alternativa promissora, ampliando a busca para eficácia no tratamento da doença de Chagas (FERREIRA; DE MORAES; ANDRICOPULO, 2022; GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

Dentre as espécies de interesse presentes na flora brasileira, as representantes do gênero *Piper* se destacam. Pertencentes à Família Piperaceae, este gênero, compreende cerca de 2000 espécies de ervas e arbustos distribuídos por florestas tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas Central e do Sul, Caribe, África, Ásia e Ilhas do Pacífico (MACÊDO; CASTRO; SILVA, 2021; MGBEAHURUIKE et al., 2017). Estes vegetais, comumente utilizados na medicina tradicional e diversos na composição química de metabólitos secundários, guarnecem de uma importante fonte de agentes terapêuticos que apresentam atividades antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória (VÁSQUEZ-OCMÍN et al., 2021; GAMBOA et al., 2018; D'ANGELO et al., 1997).

Macêdo e colaboradores (2020), caracterizaram fitoquimicamente o óleo essencial de *P. marginatum*, o extrato etanólico e frações obtidas a partir das folhas secas, assim como avaliaram sua possível atividade antileishmania. Foram identificados principalmente compostos fenólicos e terpenoides, tendo como composto majoritário a 3',4'-(metilenodioxo)propiofenona (22,90%).

Portanto, baseando-se no uso tradicional de plantas do gênero *Piper* e os resultados promissores de *P. marginatum* frente a *Leishmania amazonensis*, um tripanossomatídeo assim

como *T. cruzi*, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade tripanocida dos compostos provenientes de *P. marginatum* sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* assim como, determinar os possíveis mecanismos de ação do óleo essencial que levam a morte celular do parasito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Ácido fólico, carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP), cianeto de potássio (KCN), 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA), 3',4' - (metilenodioxo)propiofenona (MP), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), hemina, miltefosina, monodansilcadaverina (MDC), rodamina 123 (Rh123), wortmanina e 9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona (vermelho do Nilo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anexina V-FITC, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA), hidróxido de (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H tetrazolio (XTT), iodeto de propídio (IP) e RNase A foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (NY, EUA). Acetato de uranila, cacodilato de sódio, citrato de chumbo, ferrocianeto de potássio, glutaraldeído, resina Polybed[®] 812 e tetróxido de ósmio foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (EMS - Hatfield, EUA). Kit de viabilidade celular luminescente CellTiter-GLO foi obtido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Parasitos

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se a cepa Y de *T. cruzi*.

Formas epimastigotas com passagens de 96 h foram mantidas em meio LIT (pH 7,4) suplementado com 10% de SFB (inativado a 56 °C) e 5000 U mL⁻¹ de penicilina e 5 mg mL⁻¹ de estreptomicina e as culturas mantidas em estufa BOD a 28 °C.

Formas tripomastigotas e amastigotas foram isoladas a partir de monocamadas confluentes de células LLC-MK2 infectadas.

2.3. Células LLC-MK2

Células da linhagem LLC-MK2 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 5000 U mL⁻¹ de penicilina e 5 mg mL⁻¹ de estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e as passagens realizadas com a formação da monocamada confluyente.

2.4. Material botânico

Folhas de *P. marginatum* foram coletadas na área de floresta natural da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Unidade Tapajós, município de Santarém, Estado do Pará (coordenadas 02°25'04,7" S e 054°44'27,8" O). O material vegetal foi identificado pela Dr^a. Thaís Elias Almeida e a exsicata depositada no Herbário UFOPA sobre registro HSTM – n° 00370.

2.5. Obtenção do óleo essencial e extrato etanólico

O óleo essencial (PO) e extrato etanólico (PX) foram obtidos como descrito por (MACÊDO et al., 2020). Já o isolado 3',4'-(metilenodioxi)propiofenona (MP) foi obtido comercialmente. Seguidamente foi confeccionada uma solução estoque asséptica diluindo-se em DMSO e armazenada a -6 °C. A partir da solução estoque foram obtidas as concentrações de interesse diluindo-se o composto em meio de cultura, de maneira que a concentração final de DMSO não excedeu 1%.

2.6. Ensaio antiproliferativo sobre formas epimastigotas

1×10^6 epimastigotas mL^{-1} suplementadas com 10% de SFB foram adicionadas em placa estéril de 96 poços, em seguida o tratamento (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PO; 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PX; 17,82, 8,91, 1,78, 0,89 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MP) ou meio LIT foram incorporados e, prontamente a placa incubada em estufa BOD a 28 °C.

Pós 96 h o ensaio foi avaliado pelo método colorimétrico adicionando-se XTT (0,5 mg mL^{-1}). O XTT é reduzido pela enzima desidrogenase presente nas mitocôndrias viáveis, dando origem ao composto solúvel em água, formazan. Após incubação por 4 h na ausência de luz a 28 °C, as placas foram lidas na absorbância de 450 nm em espectrômetro de luz (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) e o CI_{50} , determinado através da análise de regressão não linear dos dados.

2.7. Ensaio antiproliferativo sobre formas amastigotas

Para visualizar o efeito antiproliferativo de PO sobre formas amastigotas intracelulares, em placa de 24 poços, foi posicionada uma lamínula circular lavada e estéril em cada poço. Prontamente foi adicionado células LLC-MK2 ($2,5 \times 10^5$ células mL^{-1}) suplementadas com 10% de SFB, e incubado por 24 h em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C. Pós incubação,

1×10^7 tripomastigotas mL^{-1} (isoladas como descrito no t3pico 2.8) foram adicionadas e ap3s 24 h os po3os foram lavados com PBS e ent3o adicionado o tratamento (120, 60, 30, 15 e 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PO) ou DMEM e incubado por 96 h.

Finalizado o tratamento, as lam3nulas foram fixadas com metanol puro, coradas com giemsa/3gua destilada (1:20) e coladas sobre l3minas de vidro com Permout[®]. P3s secagem, 100 c3lulas (saud3veis ou infectadas) e amastigotas foram quantificados em microsc3pio 3ptico (AFI: 1000 vezes) e calculou-se o 3ndice de sobreviv3ncia multiplicando-se o percentual de c3lulas LLC-MK2 infectadas pelo n3mero m3dio de parasitos e c3lulas totais. O valor de CI_{50} foi determinado atrav3s da an3lise de regress3o n3o linear dos dados.

2.8. Ensaio de viabilidade celular de formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas foram isoladas da seguinte maneira: primeiramente o meio recolhido de culturas de c3lulas LLC-MK2 infectadas foi centrifugado a 1000 rpm por 1 min, em seguida o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 3000 rpm por 8 min e incubado por 30 min em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$, p3s incub3o o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3000 rpm por 8 min e o pellet ressuscendido em DMEM. Em seguida, 1×10^7 tripomastigotas mL^{-1} suplementadas com 10% de SFB foram adicionadas em placa de 96 po3os juntamente com o tratamento (3, 1,5, 0,75, 0,375 e 0,1875 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PO; 17,82, 8,91, 1,78, 0,89 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MP) ou DMEM. Prontamente a placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$ por 24 h.

Ao final do tratamento, os parasitos foram contados em 50 campos de l3mina e lam3nula, sob microsc3pio 3ptico (AFI: 400 vezes) e o EC_{50} calculado por an3lise de regress3o n3o linear dos dados.

2.9. Ensaio de citotoxicidade sobre c3lulas LLC-MK2

C3lulas LLC-MK2 ($2,5 \times 10^5$ c3lulas mL^{-1}) suplementadas 10% de SFB foram adicionadas em placa de 96 po3os e incubadas por 24 h em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$. P3s incub3o, o meio foi removido e adicionado o tratamento (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PO ou PX; 178,20, 89,10, 17,80, 8,90 e 1,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MP) ou DMEM e incubado.

Ap3s 96 h foi realizada a leitura do ensaio de citotoxicidade pelo m3todo colorim3trico, adicionando-se MTT (2 mg mL^{-1}). O MTT 3 reduzido pela enzima desidrogenase presente nas mitoc3ndrias vi3veis, dando origem a cristais p3rpuras de formazan. Incubado por 4 h na

ausência de luz a 37 °C, o meio contendo MTT foi removido e adicionado DMSO com intuito de romper as células e solubilizar os cristais de formazan. O ensaio foi lido na absorvância de 570 nm em espectrômetro de luz (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA) e o CC₅₀ determinado através da análise de regressão não linear dos dados.

2.10. Atividade hemolítica

O potencial hemolítico do PO foi avaliado através da suspensão de 4% de sangue carneiro (obtido comercialmente) fresco, desfibrinado em solução de glicose 5% estéril e dispensado em placa de 24 poços sob as seguintes concentrações de PO (800, 400, 200, 100, 50 ou 25 µg mL⁻¹) ou solução de glicose 5%. Em seguida, a placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e após 3 h as amostras foram centrifugadas (1000 rpm/10 min) e a absorvância determinada a 540 nm. Triton X-100 foi utilizado como controle positivo e uma suspensão de hemácias como controle negativo. O resultado foi determinado como porcentagem de hemólise:

$$(\%) = 100 - \left[\frac{Ap - As}{(Ap - Ac) \times 100} \right],$$

onde: Ap – absorvância do controle positivo; As – absorvância da amostra teste; e Ac – absorvância do controle negativo (VALDEZ et al., 2009; VEIGA-SANTOS et al., 2010).

2.11. Avaliação das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura

Formas epimastigotas (1×10⁶ epimastigotas mL⁻¹) e tripomastigotas (1×10⁷ tripomastigotas mL⁻¹) foram tratadas por 96 h e 24 h, respectivamente, com BZN (epimastigotas: 1,67 µg mL⁻¹ ou tripomastigotas: 1,93 µg mL⁻¹), CI₅₀ ou 2×CI₅₀ de PO. Após, os parasitos foram recolhidos por centrifugação (3000 rpm/5 min) e ressuspendidos em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, as células foram aderidas a poli-L-lisina, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%–100%), submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico duplo feixe FEI Scios (FEI, EUA) (DE PAULA et al., 2020).

2.12. Condições de tratamento para avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para os seguintes ensaios, formas epimastigotas foram tratadas com BZN (1,67 µg mL⁻¹), CI₅₀ ou 2×CI₅₀ de PO e o respectivo controle positivo de cada ensaio bioquímico por 24 h, com

exceção dos ensaios com H_2O_2 (1 mM), em que o tratamento foi de 2 h. Posteriormente, as células foram lavadas por centrifugação (3000 rpm/5 min), marcadas e ressuspensas para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

2.13. Determinação da integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana foi determinada utilizando o marcador IP, que atravessa com facilidade membranas plasmáticas danificadas, ligando-se à ácidos nucleicos e emitindo alta fluorescência. Os parasitos foram incubados no escuro com IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 5 min em temperatura ambiente. Digitonina ($40 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo. A aquisição de dados e análise foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida como parasito (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.14. Determinação do grau de lipoperoxidação

Pós lavagem, os parasitos foram incubados no escuro com DPPP por 15 min, molécula não fluorescente que quando oxidada por hidroperóxidos a óxido de fosfina (DPPP-O) se torna fluorescente (OKIMOTO et al., 2000). Como controle positivo foi utilizado H_2O_2 (1 mM). A fluorescência foi medida sob o $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ em espectrofluorímetro (Victor X3; Perkin Elmer, EUA).

2.15. Determinação da exposição de fosfatidilserina

Pós lavagem, as células foram ressuspensas com tampão de ligação (140 mM de NaCl, 5 mM de CaCl_2 e 10 mM de HEPES-Na, pH 7,4) e incubadas no escuro a temperatura ambiente com Anexina V-FITC por 15 min. Em seguida foi adicionado IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os dados obtidos em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Como controle positivo foi utilizada ActD ($20 \mu\text{M}$) (STEFANELLO et al., 2014; ZWAAL; COMFURIUS; BEVERS, 2005).

2.16. Determinação do tamanho celular

A aquisição de dados e análise do volume celular de formas epimastigotas isoladas foi feita em do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. Como controle positivo foi utilizada a ActD (20 μM) (VOLPATO et al., 2018).

2.17. Determinação do ciclo celular

Parasitas lavados foram fixados em metanol 70% a 4 °C e homogeneizados periodicamente, após 24 h foram lavados com PBS e incubados no escuro por 45 min a 37 °C com IP (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e RNase A (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Como controle positivo foi utilizado Taxol (10 μM). A aquisição de dados foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. A análise de dados foi realizada com software FlowJo 10.6.1 (Becton-Dicison, R utherford, NJ, EUA), sendo a porcentagem de células em cada estágio do ciclo celular determinadas por meio do modelo Dean-Jett-Fox (FERREIRA et al., 2011).

2.18. Determinação da formação de corpos lipídicos

Pós lavagem, formas epimastigotas foram incubadas no escuro por 30 min a 28 °C com o marcador lipofílico vermelho do Nilo (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Vermelho do Nilo é uma molécula que atravessa com facilidade membranas células e se acumula em ambientes apolares e hidrofóbicos. A estrutura molecular do marcador é dividida em dois grupos funcionais principais, um grupo dietilamino doador de elétrons e um sistema aromático neutro. Ao ser excitado, através de um processo de transferência de carga intramolecular, a molécula fluoresce, permitindo a visualização de gotículas lipídicas (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985; SARKAR et al., 1994). Foi utilizado como controle positivo H_2O_2 (1 mM). A aquisição de dados e análise foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito.

Complementarmente, a fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e as imagens capturadas por câmera UC30 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.19. Determinação da formação de vacúolos autofágicos

Para avaliar a presença de vacúolos autofágicos, formas epimastigotas foram incubadas no escuro com o marcador MDC (0,05 mM) por 1 h a 37 °C. O MDC é um marcador fluorescente que se acumula em vacúolos autofágicos por aprisionamento de íons e interação com lipídios da membrana vacuolar. Também foi feita uma replicada de cada tratamento onde adicionou-se wortimanina (1 μ M), inibidor da fosfatidilinositol 3–cinase (PI3-K), família de enzimas reguladoras da autofagia (MENNA-BARRETO, 2019; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016). Como controle positivo foram utilizadas epimastigotas com passagens de 120 h tratadas com PBS para induzir o estresse nutricional. A fluorescência foi quantificada sob o $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 525$ nm em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA).

2.20. Determinação da formação de vacúolos ácidos

Epimastigotas lavadas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min com o marcador laranja de acridina (1 μ g mL⁻¹). Laranja de acridina é um marcador permeável a membrana de vacúolos e apresenta fluorescência verde, mas quando acumulado em ambientes de baixo pH, as moléculas são protonadas e a carga elétrica dificulta a saída do marcador para o citoplasma, formando dímeros que emitem fluorescência vermelha (PIERZYŃSKA-MACH; JANOWSKI; DOBRUCKI, 2014). Como controle positivo foi utilizado H₂O₂ (1 mM). A aquisição de dados e análise do das formas epimastigotas foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito.

2.21. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Lavadas, epimastigotas foram incubadas no escuro por 30 min a 37 °C com o marcador DAF-FM DA (1 μ M), seguidamente os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS, e, incubados por mais 15 min. DAF-FM DA é permeável a membrana plasmática, dentro da célula é hidrolisado à DAF-FM por esterases e o produto reage com NO, formando um composto triazol que emite fluorescência (KOJIMA et al., 1999). Como controle positivo foi utilizado H₂O₂ (1 μ M). A aquisição de dados e análise foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

Em adição, a fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e as imagens capturadas com câmera UC30 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.22. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, os parasitos foram incubados no escuro por 15 min a 37 °C com Rh123 (5 µg mL⁻¹), marcador específico dependente do $\Delta\Psi_m$ que se acumula no interior de mitocôndrias saudáveis. Em seguida, os parasitos foram lavados e ressuspendidos em salina 0,9% e incubados por mais 30 min. O desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial CCCP (100 µM) foi utilizado como controle positivo. Logo após, foi feita a aquisição de dados e análise em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito (DE PAULA et al., 2020).

2.23. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

Epimastigotas foram incubadas no escuro com H₂DCFDA (10 µM) por 45 min, um marcador que é clivado por esterases e oxidados por EROs dando origem ao produto fluorescente DCF. Para controle do experimento foi utilizado H₂O₂ (1 mM). A aquisição de dados e análise foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito. (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012).

2.24. Determinação dos níveis de ATP intracelular

Os níveis de ATP foram determinados seguindo o protocolo do kit CellTiter-GLO[®] que se baseia na conversão de luciferina em oxiluciferina pela luciferase, permitindo a quantificação da luminescência (NOWAK; KAMMERER; KÜPPER, 2018). Como controle positivo foi utilizado KCN (200 µM). A luminescência foi quantificada sob 590 nm em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer, EUA) (GARCIA et al., 2017)

2.25. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram analisados por meio da análise de variância one-way ou two-way (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da atividade dos compostos provenientes de *P. marginatum* sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, células LLC-MK2 e hemácias

Dentre os compostos obtidos a partir de *P. marginatum*, o óleo essencial foi o que exibiu melhor atividade frente as formas evolutivas de *T. cruzi*, em especial contra tripomastigotas, tendo um EC_{50} de $0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação as células LLC-MK2, o óleo essencial teve CC_{50} de $228,26 \mu\text{g mL}^{-1}$, constatando um índice de seletividade (CC_{50}/EC_{50}) de 335,68. As demais substâncias tiveram baixa atividade antiproliferativa e/ou alta toxicidade, sendo subtraídos das seguintes análises apresentadas neste trabalho (Tabela 1).

O potencial hemolítico do óleo essencial também foi avaliado, demonstrando baixa toxicidade em eritrócitos, induzindo 31,8% de hemólise na maior concentração testada, $800 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 1. Avaliação da atividade antiparasitária de PO, PX e MP sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e células LLC-MK2.

	Epimastigota		Tripomastigota		Amastigota		LLC-MK2
	$CI_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	IS	$CE_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	IS	$CI_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	IS	$CC_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$
PO	$36,83 \pm 3,67$	6,20	$0,68 \pm 0,31$	335,68	$40,98 \pm 0,16$	5,57	$228,26 \pm 21,49$
PX	$460,27 \pm 21,91$	0,21	ND	ND	ND	ND	$95,73 \pm 8,93$
MP	$>17,82$	ND	$>17,82$	ND	ND	ND	$155,22 \pm 14,06$

IS: Índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50} ou CC_{50}/EC_{50}). ND: não determinado.

Na Figura 1, observa-se imagens obtidas por microscopia óptica mostrando a ação do óleo essencial sobre formas amastigotas intracelulares em ensaio de interação *T. cruzi*/LLC-MK2. No controle vê-se alta concentração de formas amastigotas intracelulares e extracelulares. Além disso, percebe-se menor quantidade de células saudáveis e maior espaçamento entre células (Figura 1A). Por comparação com o controle, partindo para a concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o número de amastigotas diminui e aparecem mais células de aparência íntegra (Figura 1B). Igualmente, a concentração de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diminuiu o número de amastigotas, conseqüentemente aumentando o número de células saudáveis que mantiveram sua forma e proximidade (Figura 1C).

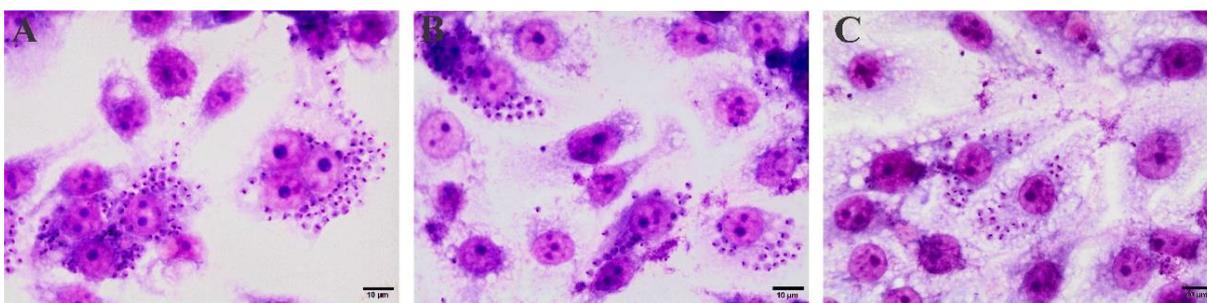


Figura 1. Microscopia óptica da avaliação da atividade antiparasitária de PO sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi* tratadas por 96 h. (A) Controle negativo; (B) PO (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$); e 2×PO (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Barra de escala: 10 μm .

3.2. Alterações morfológicas

Após determinação das concentrações inibitórias do óleo essencial frente a *T. cruzi*, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas e tripomastigotas com a finalidade de determinar as alterações morfológicas causadas pelos tratamentos.

Epimastigotas não tratadas exibiram um corpo alongado típico com um flagelo proeminente e superfície celular lisa e intacta (Figura 2A-B). Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não apresentaram claras alterações morfológicas (Figura 2C-D). Epimastigotas tratadas com PO (Figura 2E-I) e 2×PO (Figura 2J-O) exibiram danos a membrana plasmática do parasito, que levou a diminuição, torção e arredondamento do corpo celular, em suma ocasionando o extravasamento do conteúdo citoplasmático. Além disso, é possível observar o encurtamento flagelar de epimastigotas tratadas com PO e 2×PO, quando comparadas ao controle.

Tripomastigotas não tratadas exibiram morfologia do corpo celular normal, superfície celular intacta e lisa com um flagelo proeminente (Figura 3A-B). Para tripomastigotas tratadas com BZN (1,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não houve alterações morfológicas claras (Figura 3C-D). Já para as

tratadas com PO (Figura 3E-I) e 2×PO (Figura 3J-O) é possível observar danos a membrana plasmática, torção, arredondamento e consequente diminuição do corpo celular, em suma acarretando o extravasamento do conteúdo citoplasmático, quando comparadas ao controle.

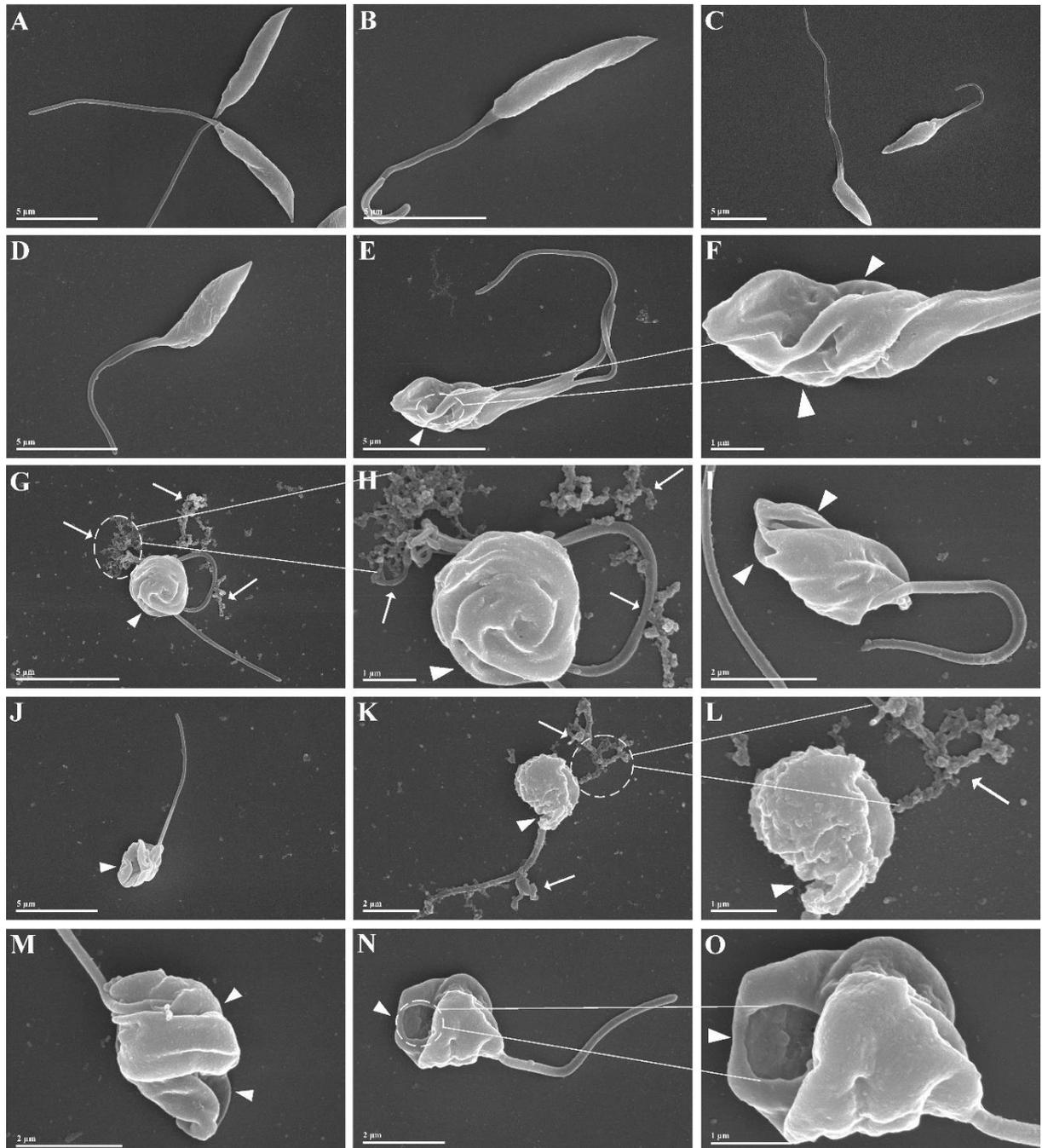


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi*. (A, B) Epimastigotas não tratadas; (C, D) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h; (E-I) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h; (J-O) Epimastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 96 h. Seta branca indica extravasamento de conteúdo citoplasmático. Cabeça de seta branca indica dano à membrana plasmática. Barras de escala: 5 μm (A-E, G, J), 2 μm (I, K, M, N) e 1 μm (F, H, L, O).

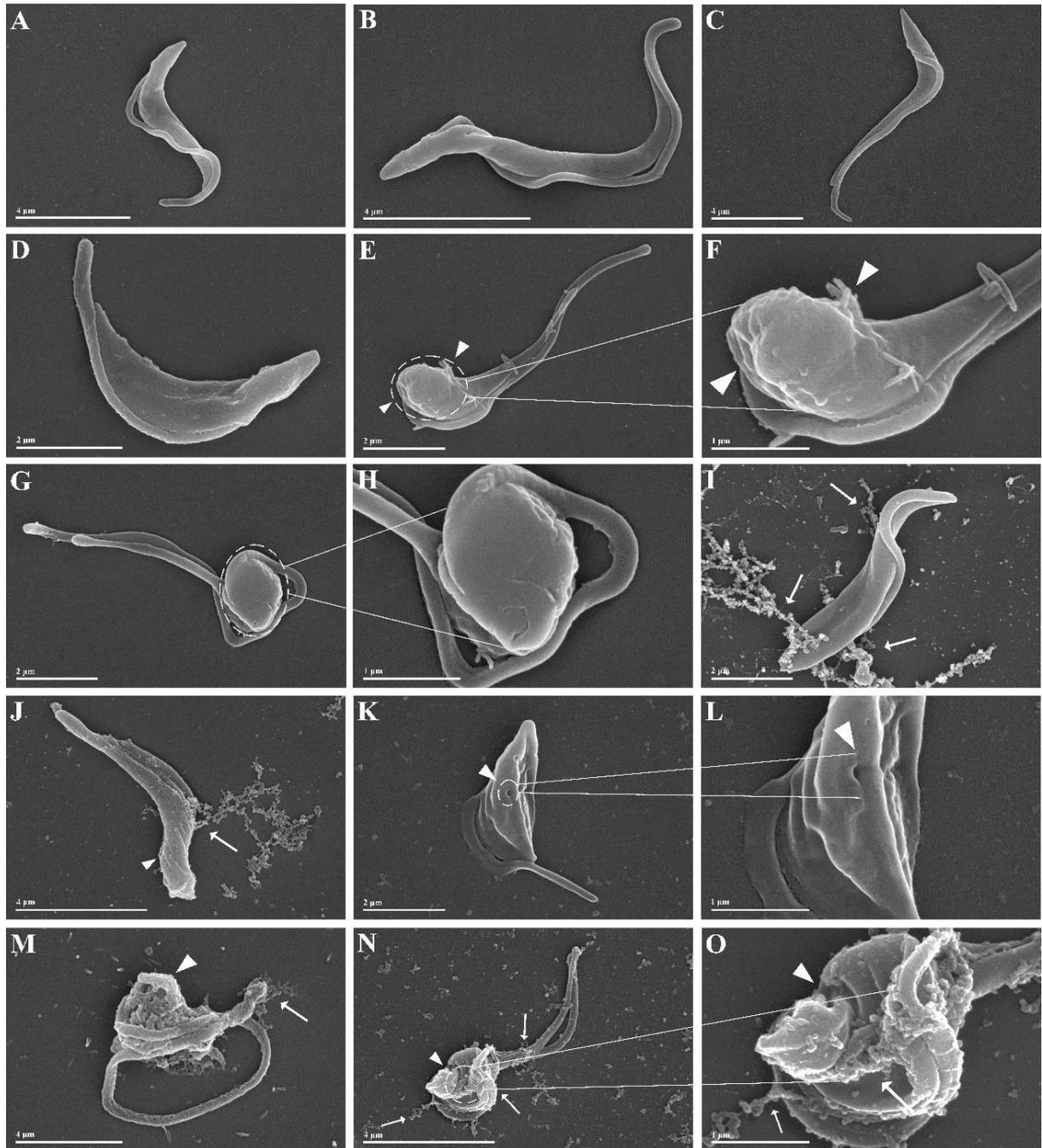


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de tripomastigotas de *T. cruzi*. (A, B) Tripomastigotas não tratadas; (C, D) Tripomastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h; (E-I) Tripomastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h; (J-O) Tripomastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h. Seta branca indica extravasamento de conteúdo citoplasmático. Cabeça de seta branca dano à membrana plasmática. Barras de escala: $4 \mu\text{m}$ (A-C, J, M, N), $2 \mu\text{m}$ (D, E, G, I, K) e $1 \mu\text{m}$ (F, H, L, O).

3.3. Determinação da integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana das células foi avaliada utilizando marcação com IP. Os gráficos de pontos mostram um aumento na porcentagem de células IP-positivas (representada pelos quadrantes superior esquerdo e direito) quando tratadas com CI_{50} de PO e $2 \times CI_{50}$ de PO em comparação com o grupo controle, indicando ruptura da membrana celular. A intensidade de fluorescência de IP em epimastigotas aumentou em 367% e 350% após 24 h de tratamento com PO (Figura 4Ad, B) e $2 \times PO$ (Figura 4Ae, B), respectivamente. O tratamento com digitonina (Figura 4Ab, B) desencadeou aumento de 3.058% em células positivas para IP. Já o BZN (Figura 4Ac, B) não demonstrou aumento significativo.

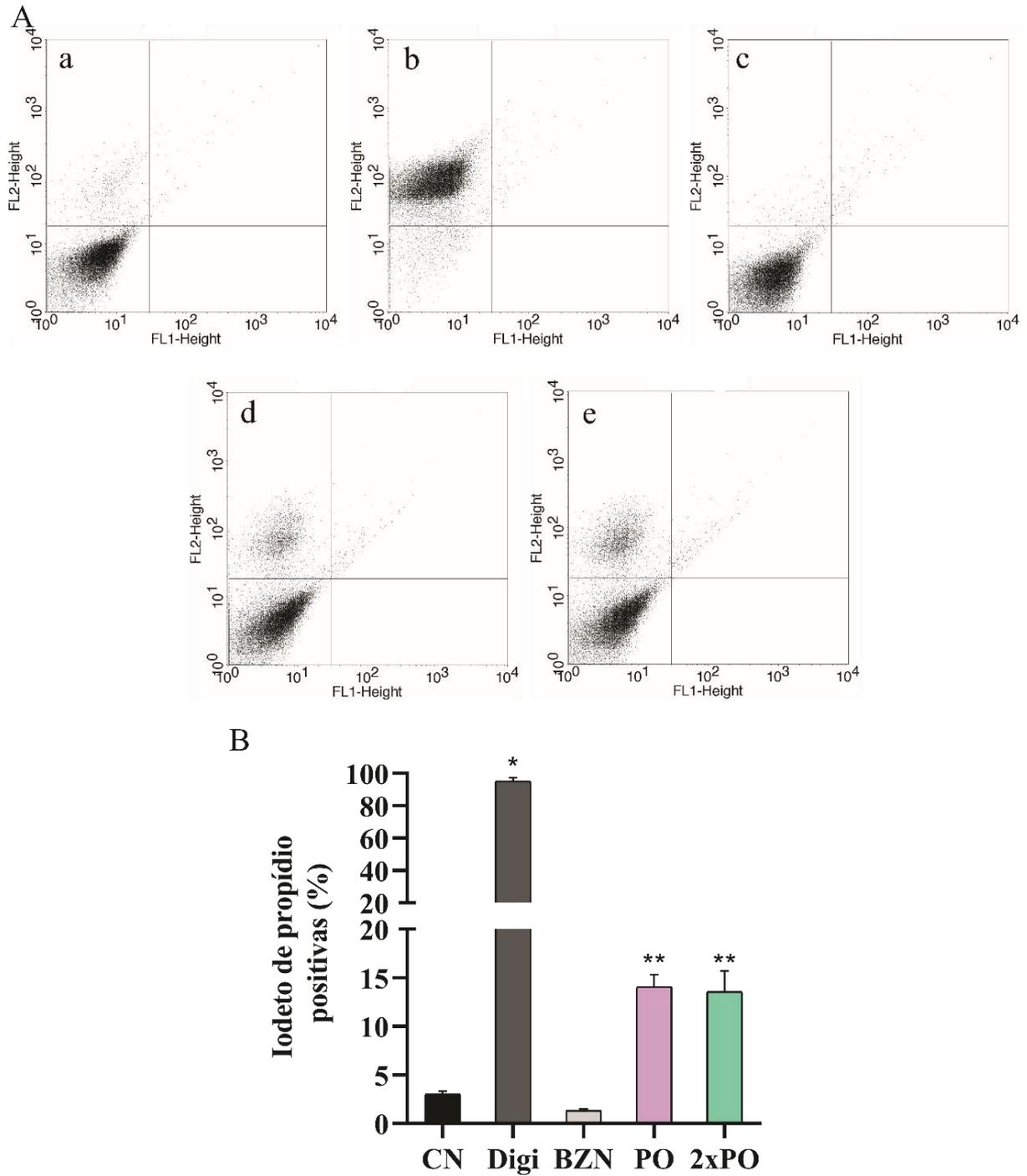


Figura 4. Determinação da integridade de membrana plasmática de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h. (A) Gráfico de pontos: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com digonina ($40 \mu\text{M}$); (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times \text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$.

3.4. Determinação do grau de lipoperoxidação

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por espectrofluorimetria, através do marcador não fluorescente DPPP. Foi possível observar que epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO e $2 \times CI_{50}$ de PO por 24 h exibiram um aumento significativo da peroxidação lipídica de 36% e 147%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (Figura 5). O tratamento com BZN aumentou significativamente em 45% a peroxidação lipídica em epimastigotas.

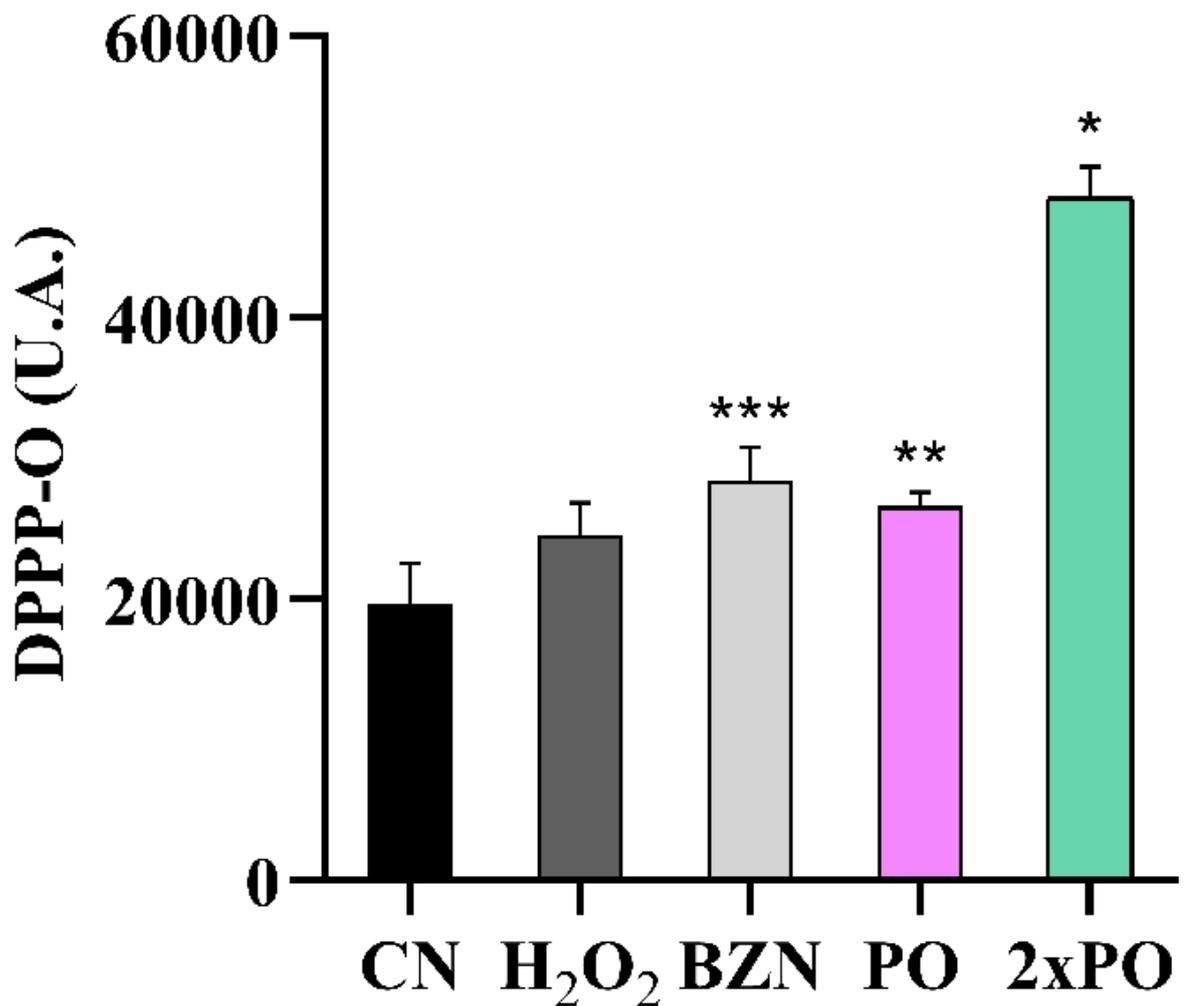


Figura 5. Determinação do grau de lipoperoxidação de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com DPPP (50 μ M) pós-tratamento por 2 h com H₂O₂ (1 mM) e 24 h com BZN (1,67 μ g mL⁻¹), CI_{50} de PO (36,8 μ g mL⁻¹) e $2 \times CI_{50}$ de PO (73,6 μ g mL⁻¹). *** $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$.

3.5. Determinação da exposição de fosfatidilserina

Anexina V-FITC foi utilizada para avaliar a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido que se expõe na superfície das células em processo de apoptose (BOUCHIER-HAYES et al., 2008). Pelo gráfico de pontos, é possível verificar que epimastigotas apresentaram um aumento na porcentagem de células Anexina-V/IP positivas (representadas no quadrante superior direito) de 253% e 442% com o tratamento com CI_{50} de PO (Figura 6Ad, B) e $2 \times CI_{50}$ de PO (Figura 6Ae, B), respectivamente, em relação ao controle não tratado, indicando apoptose tardia. O tratamento com ActD levou a um aumento de 70% de células anexina-V/IP positivas em relação ao controle não tratado (Figura 6Ab, B).

Os parasitos também apresentaram marcação positiva para IP (representadas no quadrante superior esquerdo), tendo um aumento significativo de 88% e 169% para CI_{50} de PO (Figura 6Ad, B) e $2 \times CI_{50}$ de PO (Figura 6Ae, B), quando comparados com o controle negativo.

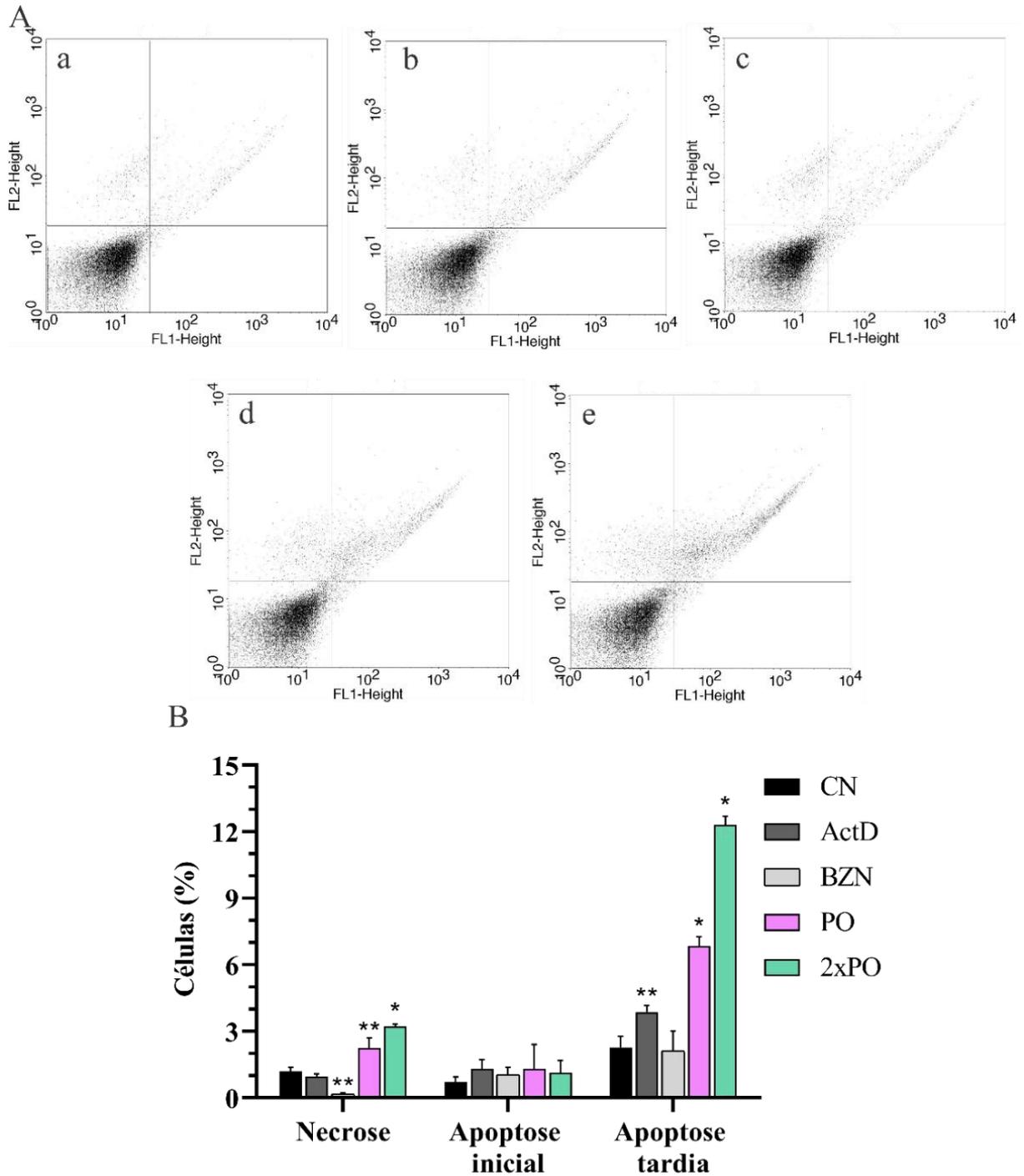
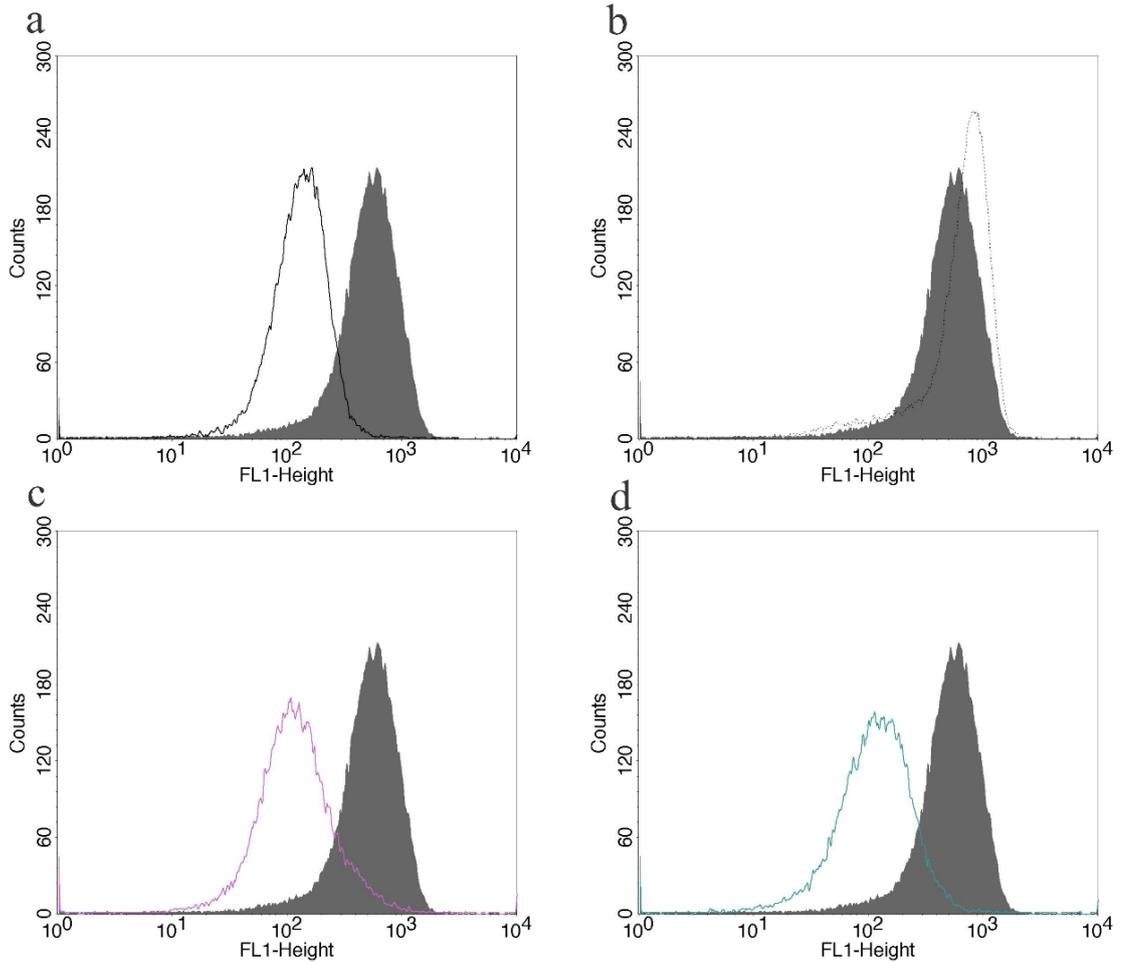


Figura 6. Determinação da exposição de fosfatidilserina em formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Anexina V-FITC e IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h. (A) Gráfico de pontos: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com ActD ($20 \mu\text{M}$); (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times \text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$.

3.6. Determinação do tamanho celular

A análise do tamanho celular, por citometria de fluxo, demonstrou uma diminuição significativa no tamanho celular dos parasitos tratados, quando comparados com o grupo controle. Tal decréscimo no tamanho foi de 20% para ActD, 17% para o BZN, 22% vezes para CI_{50} de PO e 38% para $2 \times CI_{50}$ de PO (Figura 7).

A



B

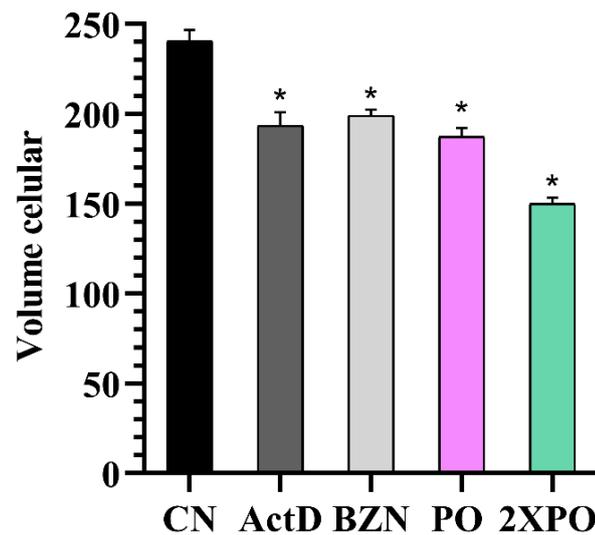


Figura 7. Avaliação do tamanho celular de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas por 24 h. (A) Histograma: histograma preenchido representa epimastigotas não tratadas em comparação com (a) Epimastigotas tratadas com ActD (20 μ M); (b) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 μ g mL⁻¹); (c) Epimastigotas tratadas com CI₅₀ de PO (36,8 μ g mL⁻¹); (d) Epimastigotas tratadas com 2 \times CI₅₀ de PO (73,6 μ g mL⁻¹). (B) Intensidade de fluorescência. *p<0,0001.

3.7. Determinação do ciclo celular

A figura 8 mostra a análise do ciclo celular, por citometria de fluxo, indicando que o tratamento com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO induziu aumento significativo no número de células estacionadas nas fases sub G_0/G_1 e G_0/G_1 e diminuição significativa nas fases S e G_2/M . Já o tratamento com BZN resultou em aumento significativo no número de parasitos em fases sub G_0/G_1 , G_0/G_1 e G_2/M , enquanto na fase S houve quase ou nenhuma expressão quando comparada com o controle. O controle positivo, Taxol causou diminuição do número de células na fase G_0/G_1 e S, e aumento de células nas fases G_2/M e células aneuploides ($>G_2$).

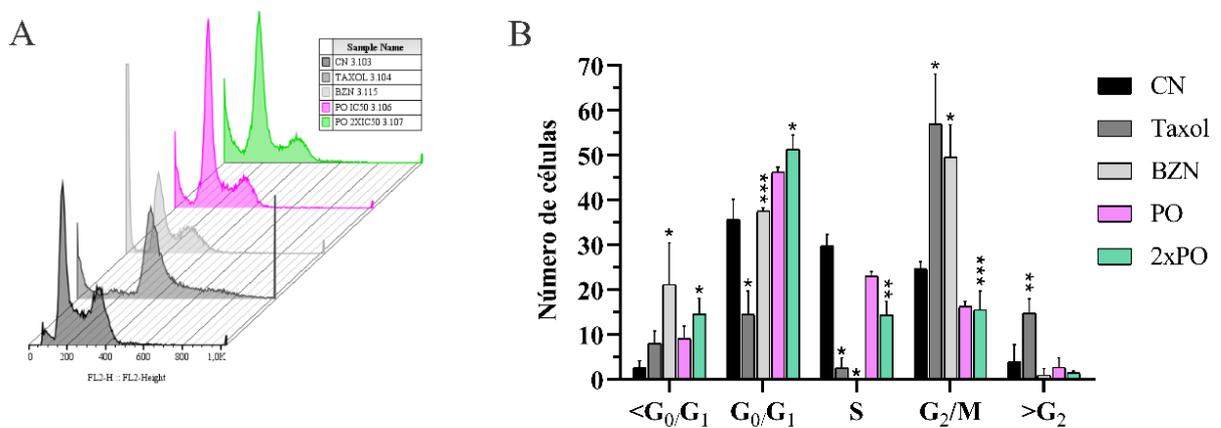


Figura 8. Determinação do ciclo celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24h com Taxol ($10 \mu\text{M}$), BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $2\times \text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (A) Histograma representativo dos tratamentos. (B) Gráfico de barras representando média \pm desvio padrão da porcentagem de células em cada subpopulação, calculadas pelo modelo de Dean-Jett-Fox (FlowJo). *** $p<0,05$, ** $p<0,005$ e * $p<0,0001$.

3.8. Determinação da formação de corpos lipídicos

O corante fluorescente vermelho do Nilo foi usado para detectar a formação e acúmulo de corpos lipídicos, por citometria de fluxo. Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO (Figura 9Ad, B) e $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (Figura 9Ae, B) exibiram um aumento na fluorescência de 4.348% e 4.973%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, H_2O_2 (Figura 9Ab, B) promoveu acúmulo de corpos lipídicos nos parasitos, exibindo aumento da fluorescência de 1.306%.

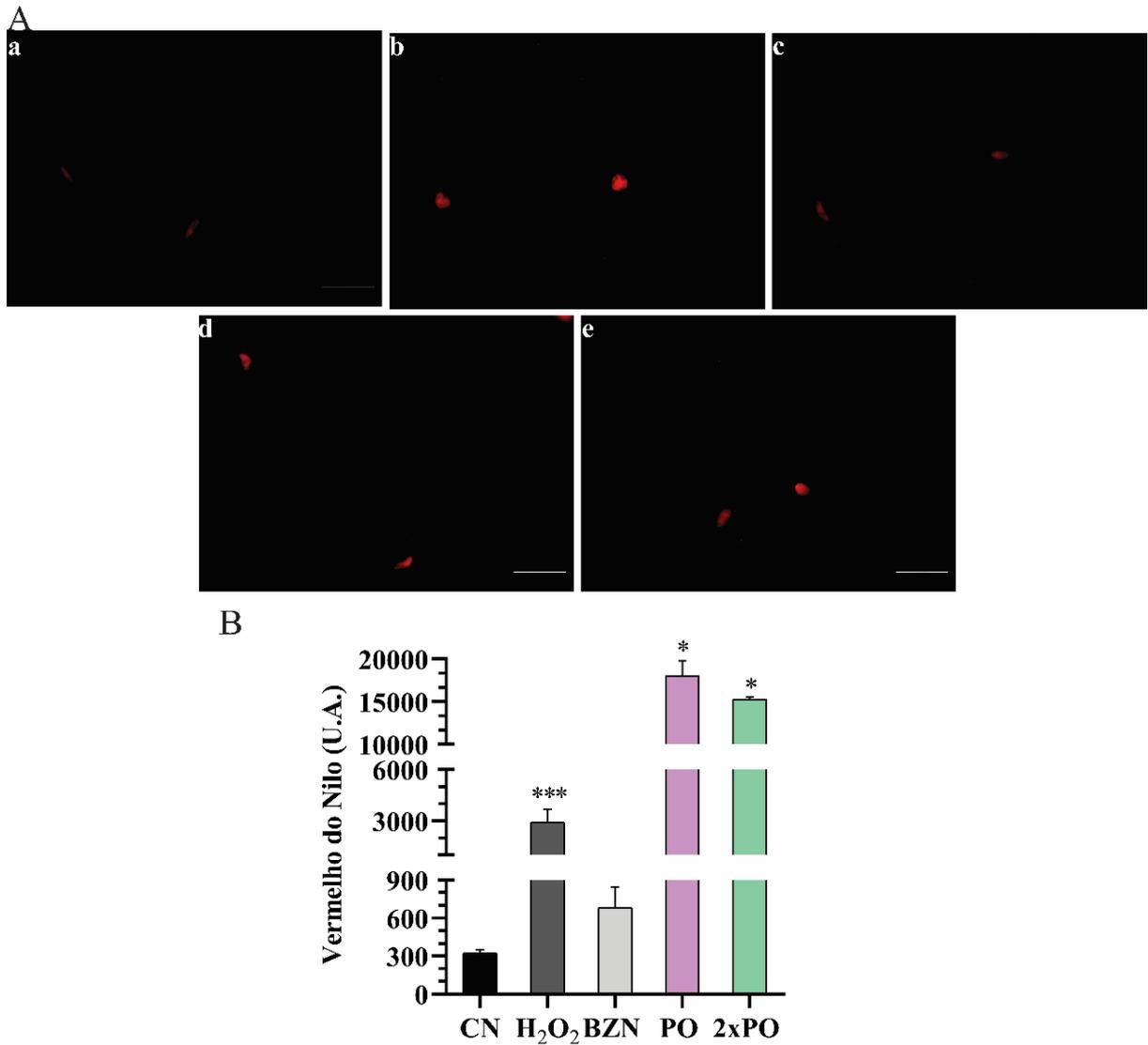


Figura 9. Determinação da formação de corpos lipídicos em epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com vermelho do Nilo ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Microscopia de fluorescência: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. *** $p < 0,05$ e * $p < 0,0001$.

3.9. Determinação da formação de vacúolos autofágicos

A avaliação da formação de vacúolos autofágicos foi realizada por espectrofluorimetria, utilizando o marcador fluorescente MDC. Como ilustrado na Figura 10, podemos observar que com exceção do tratamento com 2×PO, não houve aumento significativo nos tratados sem wortimanina, quando comparados ao controle. Já em relação aos que foram adicionados wortimanina, a diferença foi significativa. Entretanto, comparando-se os tratamentos sem e com wortimanina, não há diferença significativa, indicando que não houve formação de vacúolos autofágicos.

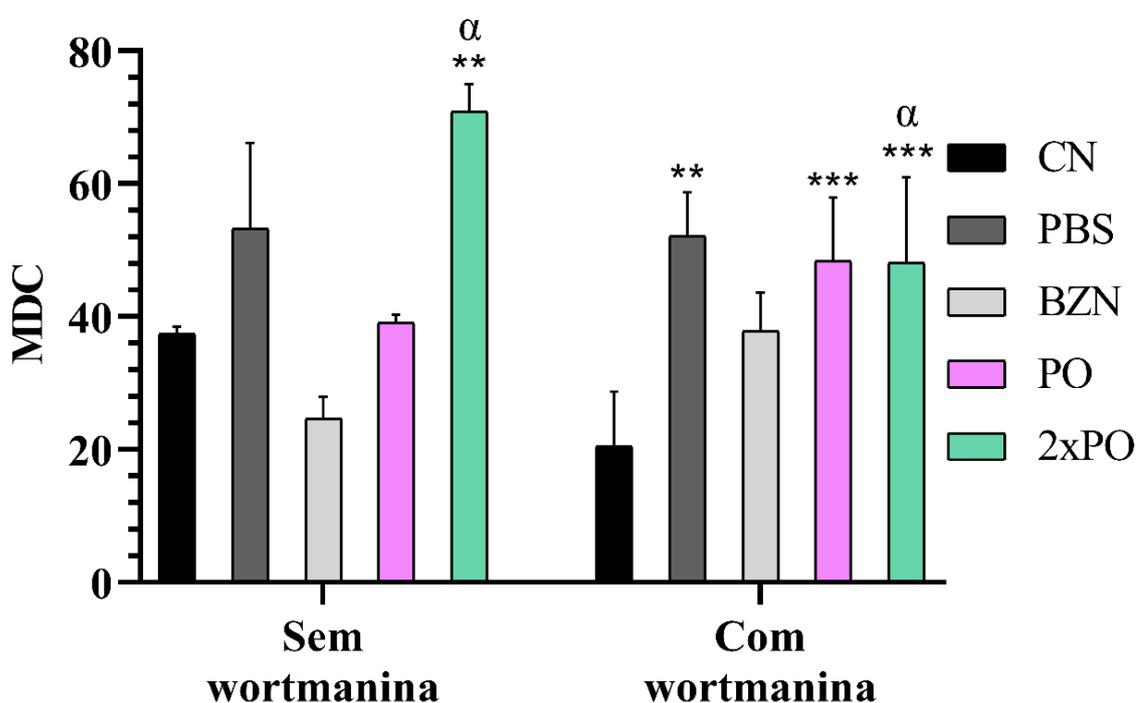
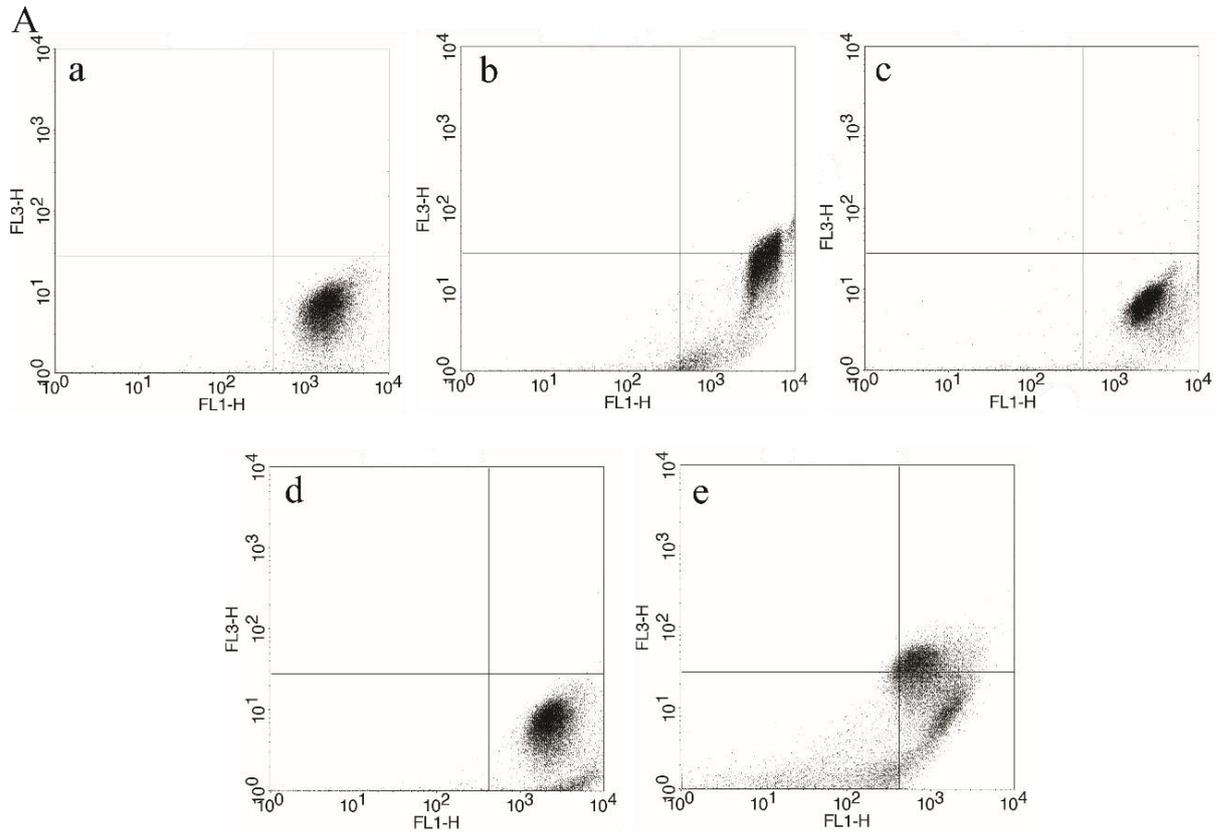


Figura 10. Determinação da formação de vacúolos autofágicos de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com MDC (0,05 mM), pós-tratamento por 24 h com PBS, BZN (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). *** $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ em relação a seus respectivos controles negativos. α representa $p < 0,05$ nos respectivos tratamentos que apresentaram diferença significativa entre a adição ou não de wortimanina (1 μM).

3.10. Determinação da formação de vacúolos ácidos

A avaliação da presença de vacúolos ácidos foi realizada por citometria de fluxo, através da fluorescência do marcador laranja de acridina. A partir dos gráficos de pontos, podemos observar a população de células não tratadas concentradas no quadrante inferior direito, as quais apresentam fluorescência na faixa do verde devido ao pH neutro intracelular (Fig. 11Aa). Após os tratamentos com $2\times CI_{50}$ de PO (Fig. 11Ae) e H_2O_2 (Fig. 11Ab), observou-se um deslocamento de células para o quadrante inferior esquerdo, indicando a diminuição da fluorescência verde, adicionado ao deslocamento para o quadrante superior direito, indicando aumento da fluorescência vermelha devido ao acréscimo de compartimentos ácidos nas células. Adicionalmente, o gráfico de barras mostra a razão entre a fluorescência vermelha e verde, permitindo visualizar aumento significativo na quantidade de vacúolos ácidos de 12.468% e 30.928% em epimastigotas tratadas com $2\times CI_{50}$ de PO e H_2O_2 , respectivamente, quando comparados com o controle (Figura 11B).



B

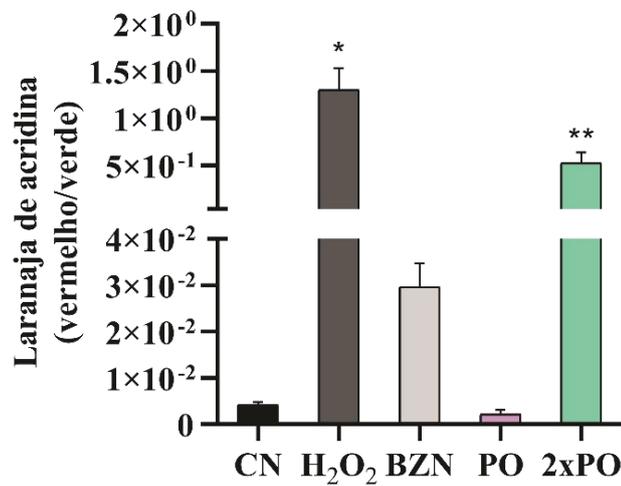


Figura 11. Determinação da formação de vacúolos ácidos de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com laranja de acridina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Gráfico de pontos: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2 \times \text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$.

3.11. Determinação dos níveis de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada, por citometria de fluxo, utilizando-se o marcador não fluorescente DAF-FM DA. O tratamento com CI_{50} de PO (Figura 12Ad, B) e $2\times CI_{50}$ de PO (Figura 12Ae, B) induziram aumento significativo nos níveis de óxido nítrico em epimastigotas de 626% e 1.530%, respectivamente, comparados ao grupo controle. H_2O_2 (Figura 12Ab, B) desencadeou aumento dos níveis de NO em epimastigotas de 712%.

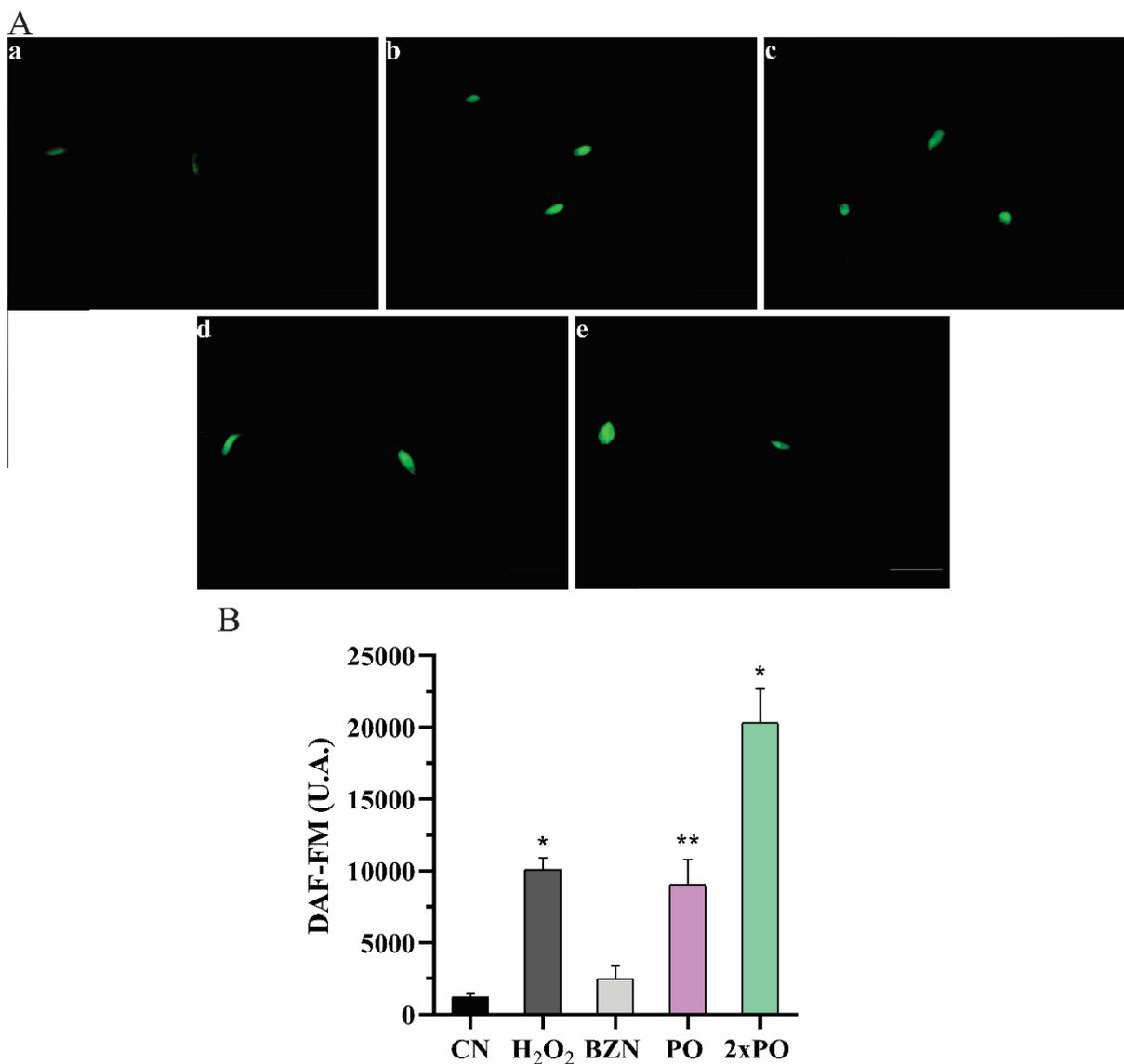


Figura 12. Determinação dos níveis de óxido nítrico de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com DAF-FM DA ($1 \mu M$), pós-tratamento por 24 h. (A) Microscopia de fluorescência: (a) Epimastigotas não tratadas; (b) Epimastigotas tratadas com H_2O_2 (1 mM) por 2 h; (c) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu g mL^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu g mL^{-1}$); (e) Epimastigotas tratadas com $2\times CI_{50}$ de PO ($73,6 \mu g mL^{-1}$). (B) Intensidade de fluorescência. Barra de escala: $10 \mu m$. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,0001$.

3.12. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O $\Delta\Psi_m$ foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o marcador Rh123. A Figura 13 mostra que epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO e $2\times CI_{50}$ de PO exibiram diminuição na intensidade de fluorescência total de Rh123 em 82% e 87%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle. Essas reduções no $\Delta\Psi_m$ indicam despolarização mitocondrial. O desacoplador mitocondrial CCCP também causou despolarização mitocondrial, induzindo diminuição do $\Delta\Psi_m$ em 83%.

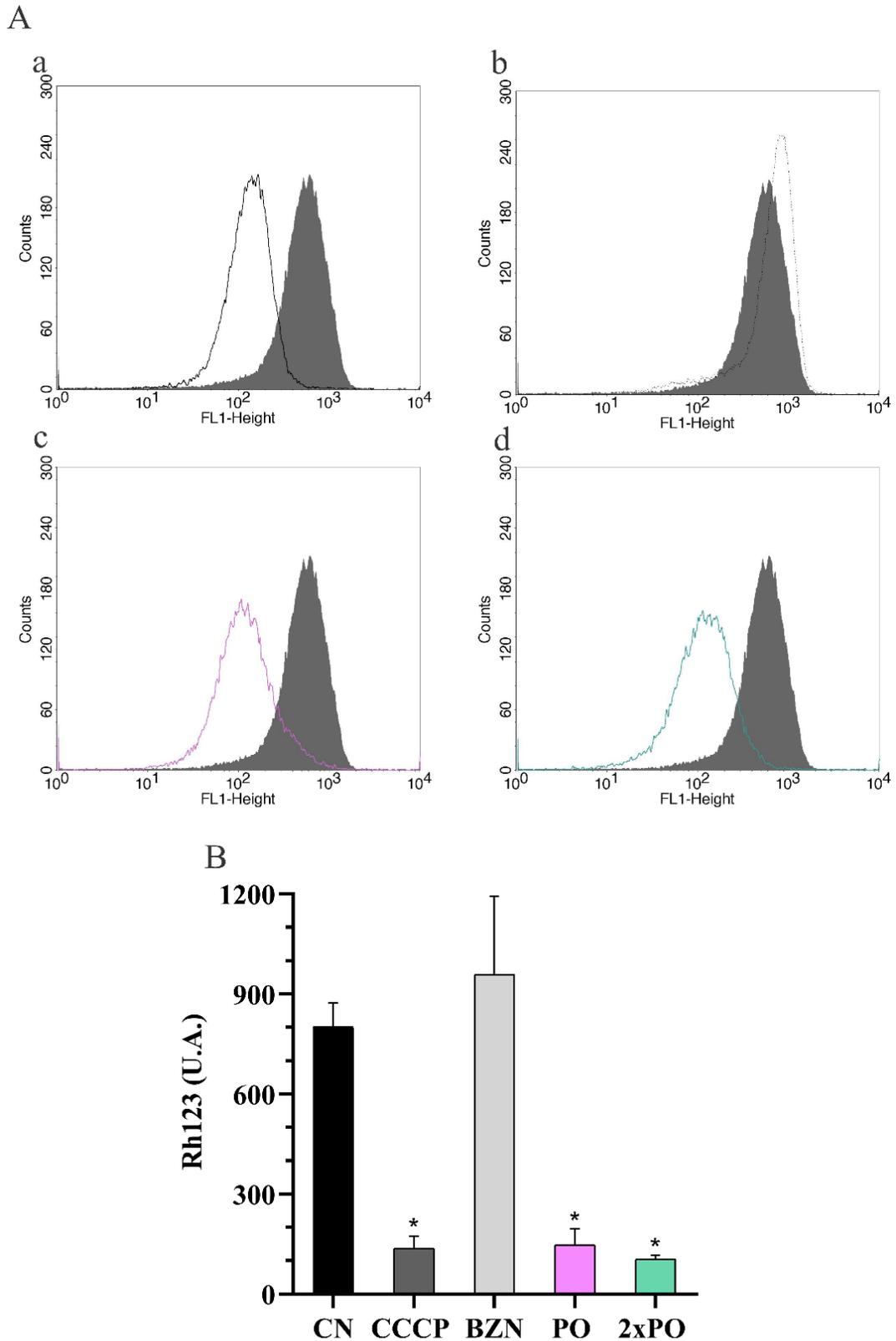


Figura 13. Determinação do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Rh123 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), pós-tratamento por 24 h. (A) Histograma: histograma preenchido representa epimastigotas não tratadas em comparação com (a) Epimastigotas tratadas com CCCP ($100 \mu\text{M}$); (b) Epimastigotas tratadas com BZN ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$); (c) Epimastigotas tratadas com CI_{50} de PO ($36,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (d) Epimastigotas tratadas com $2 \times \text{CI}_{50}$ de PO ($73,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). * $p < 0,0001$.

3.13. Determinação dos níveis de ATP

O kit CellTiter-Glo foi utilizado para quantificar os níveis ATP intracelular. Epimastigotas tratadas com $2\times\text{CI}_{50}$ de PO apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de ATP intracelular de 74% em relação ao controle negativo (Figura 14). BZN e KCN (inibidor do complexo citocromo-oxidase da cadeia respiratória de elétrons), levaram à diminuição de 39% e 33%, respectivamente nos níveis de ATP em epimastigotas.

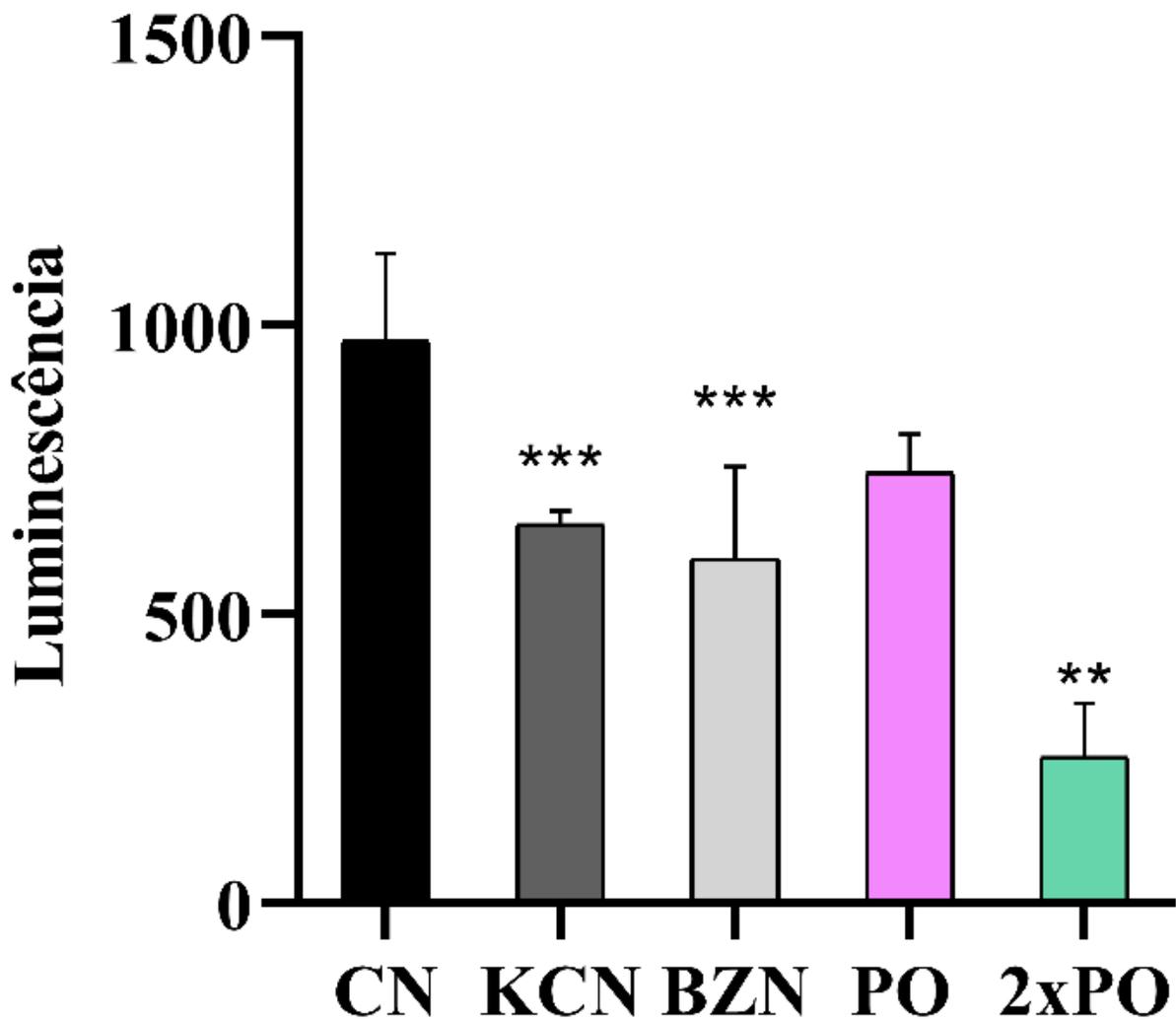


Figura 14. Determinação dos níveis de ATP de formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com kit CellTiter-GLO, pós-tratamento por 24 h com KCN (200 μM), BZ (1,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$), CI_{50} de PO (36,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e $2\times\text{CI}_{50}$ de PO (73,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h. *** $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.

3.14. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

Os níveis de ERO foram avaliados por citometria de fluxo, utilizando o marcador não fluorescente H₂DCFDA. O tratamento com CI₅₀ de PO (Figura 15Ad, B) e 2×CI₅₀ de PO (Figura 15Ae, B) levou a um aumento significativo de ERO totais em epimastigotas de 803% e 974%, respectivamente, quando comparados com o controle. H₂O₂ (Figura 15Ab, B) também causou aumento de ERO totais nas células de 2.951%.

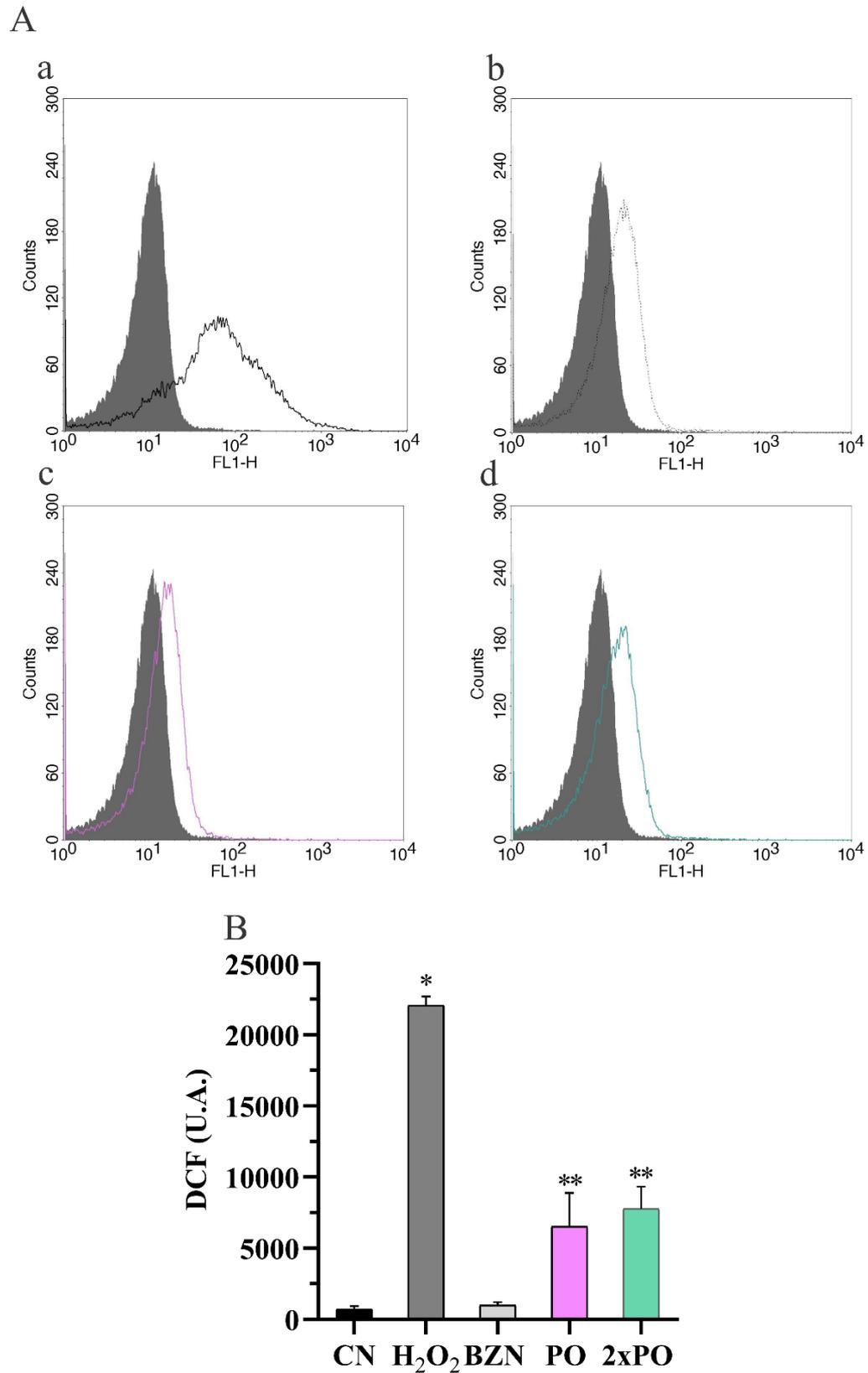


Figura 15. Determinação dos níveis de ERO de epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com H₂DCFDA (10 μ M), pós-tratamento por 24 h. (A) Histogramas: histograma preenchido representa epimastigotas não tratadas em comparação com (a) Epimastigotas tratadas com H₂O₂ (1 mM) por 2 h; (b) Epimastigotas tratadas com BZN (1,67 μ g mL⁻¹); (c) Epimastigotas tratadas com CI₅₀ de PO (36,8 μ g mL⁻¹); (d) Epimastigotas tratadas com 2 \times CI₅₀ de PO (73,6 μ g mL⁻¹). (B) Intensidade de fluorescência. **p<0,005 e *p<0,0001.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a atividade tripanocida de compostos orgânicos ou sintéticos provenientes de *P. marginatum*. O extrato apresentou CI_{50} sobre formas epimastigotas de $460,27 \pm 21,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ e alta toxicidade sobre células LLC-MK2 (CC_{50} de $95,73 \pm 8,93 \mu\text{g mL}^{-1}$), resultando num índice de seletividade baixo. Já o isolado, apesar de não exibir alta toxicidade (CC_{50} de $155,22 \pm 14,06 \mu\text{g mL}^{-1}$), também não mostrou efeito sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* na maior concentração testadas (CI_{50} maior que $17,82 \mu\text{g mL}^{-1}$). Desta maneira, estes dois compostos foram descartados do desenvolvimento deste trabalho, que teve continuidade somente com o óleo essencial. PO foi o composto que apresentou melhor atividade sobre todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, e, portanto, foi a substância utilizada para análise dos ensaios bioquímicos e alterações morfológicas no parasito (Tabela 1).

Averiguou-se através da obtenção e análise estatística da fluorescência ou luminescência de marcadores moleculares o dano causado pela composição do óleo sobre a célula parasitária. Dentre os danos observados, inclui-se a diminuição do potencial de membrana mitocondrial que acarretou o desbalanço na produção de ATP. Vê-se na Figura 14 que o tratamento com 2xPO levou a redução na concentração de ATP produzido, fato que pode ser explicado pela perda do $\Delta\Psi_m$ em consequência dos demais danos que aceleram a morte celular, impedindo o funcionamento regular das organelas que sustentam o equilíbrio bioquímico do parasito, em especial, a mitocôndria (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; ROY et al., 2008).

Somado ao descrito acima, *T. cruzi* possui, em todas as suas formas evolutivas, baixa produção de componentes responsáveis pela eliminação de espécies oxidativas, dentre eles, estão o ascorbato, a glutatona e a triparedoxina, todas completamente e diretamente dependentes da tripanotiona ($T(S)_2$), um dímero de glutatonas ligadas covalentemente a uma espermina. Em um ciclo complexo para manutenção do equilíbrio redox, a ($T(S)_2$) é responsável pela redução dos componentes oxidados por ERO, dando origem a dihidrotripanotiona $T(SH)_2$, em seguida, com a oxidação de um NADPH, a enzima tripanotiona redutase converte novamente a $T(SH)_2$ a $T(S)_2$ (BATTISTA et al., 2020; DOCAMPO; MORENO, 2017; KOCH et al., 2013; KRIEGER et al., 2002). Como foi possível observar, o óleo essencial, em ambos os tratamentos (CI_{50} e $2xCI_{50}$), levou ao aumento nos níveis de ERO, que consequentemente causaram danos capazes de indução a apoptose (Figura 15). Portanto, pode-se inferir que o desarranjo no equilíbrio estrutural da mitocôndria evidenciado pelo marcador Rh123 (Figura

13) foi capaz de levar a liberação de metabólitos secundários provenientes da respiração celular, em sua maioria, ERO, que causam danos celulares muitas vezes irreparáveis, especialmente para *T. cruzi* que não possui um sistema refinado para eliminação de ERO (BOMBAÇA et al., 2019; MACEDO et al., 2021; SALOMÃO et al., 2013).

A sonda DAF-FM permitiu-nos observar o aumento significativo da concentração de óxido nítrico (Figura 12). O óxido nítrico pode ter efeito direto sobre o DNA, causando desaminação e consequente perda funcional de qualquer base nitrogenada que contenha um grupo amino em sua composição. As bases modificadas, por sua vez, não são reconhecidas pelas enzimas do metabolismo gênico, muitas vezes levando a mutações *indel* durante o andamento dos processos de transcrição e duplicação do material genético. Em suma, o óxido nítrico reage com ânions superóxido numa velocidade aproximadamente 3,5 vezes maior do que a atividade da superóxido dismutase, dando origem ao peroxinitrito (NO_3^-), muito mais reativo que o óxido nítrico e com capacidade de desaminação e oxidação dos açúcares presentes nas bases nitrogenadas, levando a quebra de cadeia e consequente desmanche da fita-dupla (BURNEY et al., 1999; INOUE; KAWANISHI, 1995; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

De forma dissemelhante, o óxido nítrico tem potencial de redução da peroxidação de lipídios, uma vez que a formação de NO_3^- , molécula extremamente reativa, promove a peroxidação de lipídeos de cadeia poliinsaturada e lipoproteínas presentes na membrana plasmática (Figura 5). Espécies reativas, incluindo-se NO_3^- , dão início ao processo de peroxidação ao doar um elétron a cadeia lipídica, dando origem ao radical alquila (L^\bullet) que reage com oxigênio molecular e seu produto se engendra numa série de reações que dão origem a espécies de ácidos graxo nitrificados (HOGG; KALYANARAMAN, 1999; O'DONNELL; FREEMAN, 2001; RADI, 2018; RUBBO et al., 1994; VIOLI et al., 1999). Portanto, é possível afirmar que o aumento na lipoperoxidação está causando danos severos a membrana plasmática do protozoário (Figura 4), informação também validada através da observação de formas epimastigotas e tripomastigotas por microscopia eletrônica de varredura que permite a visualização da formação de poros, necrose e desconfiguração da estrutura íntegra da membrana plasmática (Figuras 2 e 3).

Deste modo, sendo a membrana plasmática uma estrutura que circunda e sustenta a forma celular, além de coordenar a interação do citoplasma com o meio extracelular, as evidências presentes nas Figuras 2, 3 e 4, juntamente com as análises por citometria de fluxo corroboram que o tratamento com CI_{50} de PO e $2 \times \text{CI}_{50}$ de PO causaram danos o suficiente no

interior celular, tendo efeito, talvez indireto, sobre o tamanho celular das formas epimastigotas (Figura 7) (DE AZEREDO et al., 2017; VOLPATO et al., 2015).

Além dos lipídios de membrana, os organismos armazenam em seu citoplasma, em forma de gotículas ou reservossomas, lipídios que podem ser mobilizados para uso como fonte de energia, reparo da membrana plasmática e/ou agentes antioxidantes (PEREIRA et al., 2011, 2015, 2018; TAVARES et al., 2021). Em vista disso, baseando-se no aumento de espécies reativas e variação nos níveis de ATP, já discutidos acima, podemos inferir que o aumento no acúmulo de corpos lipídicos evidenciados pelo marcador vermelho do Nilo pode ser uma resposta da célula parasitária ao estresse inicial causado pelas substâncias testadas na mitocôndria (Figura 9) (SOARES et al., 1989).

Com a despolarização da membrana mitocondrial a cadeia fosforilativa, via principal da produção de ATP, fica disfuncional, perturbando a principal fonte de energia da célula que sustenta os mecanismos que mantêm a homeostase citoplasmática. Na busca por um desvio, as células parasitárias extraviam a produção de ATP para vacúolos especializados denominados acidocalcissomos, organelas de caráter ácido que armazenam prótons e cálcio, além de terem função regulatória na homeostase do pH e no potencial osmótico (BENCHIMOL et al., 1998; DOCAMPO et al., 2011; RAMAKRISHNAN; ASADY; DOCAMPO, 2018). Podemos visualizar a partir do marcador laranja de acridina que o tratamento com 2×PO acarretou o aumento da concentração de vacúolos ácidos, possivelmente explicado pela alta despolarização da membrana mitocondrial, que impediu a produção regular de ATP (Figura 11).

Dentro do corpo celular também existem outros tipos de vacúolos que desempenham papéis diferentes na regulação da homeostase citoplasmática. Uma das classes principais são os vacúolos autofágicos que desempenham papel na digestão de organelas desgastadas ou danificadas para reaproveitamento dos nutrientes gastos na sua produção, entretanto podemos visualizar na Figura 10, que não houve diferença significativa entre as replicatas tratadas com wortimanina e sem wortimanina (ALVAREZ et al., 2008; SALASSA; ROMANO, 2019).

Após tratamento com PO foram observadas alterações significativas no ciclo celular. Dentre as mais importantes, 2×CI₅₀ de PO acarretou aumento no número de células nas fases sub G₀/G₁ e G₀/G₁ e diminuição para as fases S e G₂/M, sinais de estacionamento do ciclo celular, provavelmente causado por fragmentação do DNA que impede o início da replicação (fase S), divisão das cromátides irmãs (mitose) e citocinese, evidências compatíveis com indução de morte celular programada (CHUANG et al., 2007; CUEVAS-HERNÁNDEZ et al., 2021; MARINHO et al., 2011; MEIRA et al., 2017; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2020;

ZUMA et al., 2014). Já BZN mostrou atividade estacionária sobre todas as outras fases do ciclo, com exceção da fase S, no qual o fármaco inibiu completamente. Tal efeito pode ser explicado pela formação de compostos nítricos, secundários a sua degradação pós passagem pelo metabolismo do protozoário (Figura 8) (RAJÃO et al., 2014).

Por último, corroborando com todas as evidências mostradas acima, a marcação com a sonda Anexina V-FITC demonstrou externalização da fosfatidilserina pós-tratamento com PO e 2×PO, indicando apoptose tardia. Em um contexto saudável, as enzimas flipases dependentes de ATP mantêm as moléculas de fosfatidilserina na porção interior da membrana plasmática. Após danos irreparáveis na mitocôndria e indução da peroxidação de lipídeos que acarretou danos necróticos sobre a membrana plasmática, as flipases perderam sua função pela perda do abastecimento de ATP e integridade da membrana plasmática, permitindo a externalização da fosfatidilserina, indicando morte celular por apoptose tardia, já que os danos causados não levaram a morte imediata da célula parasitária (Figura 6) (JIMENEZ et al., 2008; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2015; MORENO et al., 2018; NAGATA et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

Posto isto, foi possível concluir que o óleo essencial de *P. marginatum* possui forte atividade seletiva frente as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar diretamente que o tratamento por 24h com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de PO causou danos estruturais a membrana plasmática e ao flagelo das formas epimastigotas e tripomastigotas. Concomitantemente, análises bioquímicas do mecanismo de ação de PO nas formas epimastigotas permitiu-nos determinar que a morte celular possivelmente é causada pelo desbalanço do $\Delta\Psi_m$, que acarretou a liberação de ERO que ao interagirem com óxido nítrico levaram ao aumento da lipoperoxidação e conseqüente desconfiguração da membrana plasmática. Em conjunto estes fatores levaram ao epílogo parasitário, provavelmente, por mecanismos de apoptose tardia. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, justifica-se a continuidade desta pesquisa para refino e possível desenvolvimento destas substâncias à cerca do tratamento da doença de Chagas.

6. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V. E. et al. Autophagy Is Involved in Nutritional Stress Response and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3454–3464, fev. 2008.
- ASSAL, A.; CORBI, C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, n. 2, p. 286–291, abr. 2011.
- BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–21, 2015.
- BATTISTA, T. et al. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1924, 21 abr. 2020.
- BENCHIMOL, M. et al. Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 332, n. 3, p. 695–702, 1998.
- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 408–418, jan. 2019.
- BOUCHIER-HAYES, L. et al. Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 222–228, mar. 2008.
- BURNEY, S. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1–2, p. 37–49, mar. 1999.
- CHUANG, J.-Y. et al. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 21, n. 6, p. 1003–9, 2007.
- CUEVAS-HERNÁNDEZ, R. I. et al. An aromatic imidazoline derived from chloroquinoline triggers cell cycle arrest and inhibits with high selectivity the *Trypanosoma cruzi* mammalian host-cells infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, p. e0009994, 29 nov. 2021.
- D'ANGELO, L. C. A. et al. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. **Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 33–40, mar. 1997.
- DE AZEREDO, C. M. O. et al. Biological activity of the azlactone derivative EPA-35 against *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, n. January, p. fnx020, 26 jan. 2017.

- DE PAULA, J. C. et al. Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 211, n. August, p. 105653, nov. 2020.
- DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 89–100, 2009.
- DOCAMPO, R. et al. The Role of Acidocalcisomes in the Stress Response of *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 307–324, 2011.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Biochemistry of *Trypanosoma cruzi*. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Eds.). **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 7p. 371–400.
- ELIAS, M. et al. Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. **Protist**, v. 158, n. 2, p. 147–157, 18 abr. 2007.
- FERRAGUT, F.; ACEVEDO, G. R.; GÓMEZ, K. A. T Cell Specificity: A Great Challenge in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. June, p. 1–15, 2021.
- FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 17, p. 2155–2164, dez. 2011.
- FERREIRA, L. L. G.; DE MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, v. xxx, n. xx, p. 1–10, abr. 2022.
- GAMBOA, F. et al. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 1–9, 25 set. 2018.
- GARCIA, F. P. et al. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, n. 1, p. 57–71, 19 jan. 2017.
- GARCÍA-HUERTAS, P.; CARDONA-CASTRO, N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112020, out. 2021.
- GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile Red" A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. **Journal of Cell Biology**, v. 100, p. 965–973, 1985.
- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 378–384, maio 1999.
- INOUE, S.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. **FEBS Letters**, v. 371, n. 1, p. 86–88, 28 ago. 1995.

- JIMENEZ, V. et al. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 688–698, 15 out. 2008.
- JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2010.
- KOCH, O. et al. Molecular Dynamics Reveal Binding Mode of Glutathionylspermidine by Trypanothione Synthetase. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- KOJIMA, H. et al. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 21, p. 3209–3212, 2 nov. 1999.
- KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 542–552, 5 abr. 2002.
- LAZARIN-BIDÓIA, D. et al. Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 890–903, fev. 2016.
- LIDANI, K. C. F. et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography**, v. 49, n. 6, p. 1–13, 2019.
- MACÊDO, C. G. et al. Leishmanicidal activity of *Piper marginatum* Jacq. from Santarém-PA against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 210, n. February 2019, p. 107847, 2020.
- MACÊDO, C. G.; CASTRO, K. C. F.; SILVA, E. O. DA. Antileishmanial Activity of the Genus *Piper*: A Systematic Review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 32, n. 5, p. 21–44, 20 jul. 2021.
- MACEDO, C. M. et al. The Potent Trypanocidal Effect of LQB303, a Novel Redox-Active Phenyl-Tert-Butyl-Nitrone Derivate That Causes Mitochondrial Collapse in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, 15 abr. 2021.
- MANGANO, V. D. et al. Screening of at-risk blood donors for Chagas disease in non-endemic countries: Lessons from a 2-year experience in Tuscany, Italy. **Transfusion Medicine**, v. 31, n. 1, p. 63–68, 8 fev. 2021.
- MARINHO, F. D. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507–509, jun. 2011.
- MEIRA, C. S. et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-κB/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, n. August, p. 156–165, nov. 2017.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 2, p. 93, fev. 2019.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. In: **Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis**. [s.l.] InTech, 2015.

MGBEAHURUIKE, E. E. et al. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54–69, set. 2017.

MORENO, É. M. et al. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 225, 27 dez. 2018.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, out. 2015.

MORILLO, C. A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, fev. 2017.

NAGATA, S. et al. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 952–961, 19 jun. 2016.

NOWAK, E.; KAMMERER, S.; KÜPPER, J.-H. ATP-based cell viability assay is superior to trypan blue exclusion and XTT assay in measuring cytotoxicity of anticancer drugs Taxol and Imatinib, and proteasome inhibitor MG-132 on human hepatoma cell line HepG2. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 69, n. 1–2, p. 327–336, 4 maio 2018.

O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Interactions Between Nitric Oxide and Lipid Oxidation Pathways. **Circulation Research**, v. 88, n. 1, p. 12–21, 19 jan. 2001.

OKIMOTO, Y. et al. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. **FEBS Letters**, v. 474, n. 2–3, p. 137–140, 2 jun. 2000.

PASSOS, L. A. C. et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 223–232, 2012.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22359, 27 jul. 2011.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128949, 11 jun. 2015.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes store cholesteryl esters in lipid droplets after cholesterol endocytosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 224, n. March, p. 6–16, set. 2018.

- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.
- PIERZYŃSKA-MACH, A.; JANOWSKI, P. A.; DOBRUCKI, J. W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 8, p. 729–737, ago. 2014.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, set. 2001.
- RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **PNAS**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018.
- RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, maio 2014.
- RAMAKRISHNAN, S.; ASADY, B.; DOCAMPO, R. Acidocalcisome-mitochondrion membrane contact sites in *Trypanosoma brucei*. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2018.
- RAWAL, K. et al. Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2021.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, K. D. et al. Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, n. May, p. 103894, jul. 2020.
- ROY, A. et al. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F₀F₁-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Molecular Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 1292–1307, 2008.
- RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26066–26075, out. 1994.
- RUMI, M. M. M. et al. Benznidazole treatment in chronic children infected with *Trypanosoma cruzi*: Serological and molecular follow-up of patients and identification of Discrete Typing Units. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 130–136, out. 2013.
- SALASSA, B. N.; ROMANO, P. S. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 460–469, 2019.
- SALOMÃO, K. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 196, 3 dez. 2013.
- SARKAR, N. et al. **Twisted Charge Transfer Process of Nile Red in Homogeneous Solution and in Faujasite Zeolite** Langmuir. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 49–58, ago. 2012.

SOARES, M. J. et al. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 75, n. 7, p. 522–527, jul. 1989.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898–1902, 18 dez. 1992.

STEFANELLO, T. F. et al. N -Butyl-[1-(4-Methoxy)Phenyl-9 H - β -Carboline]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112–7120, dez. 2014.

TAVARES, V. D. S. et al. Lipid droplets of protozoan parasites: survival and pathogenicity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 6, 2021.

VALDEZ, R. H. et al. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 110, n. 1, p. 7–14, 2009.

VALLEJO, A. et al. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 164, p. 117–124, dez. 2016.

VÁSQUEZ-OCMÍN, P. G. et al. Metabolomic approach of the antiprotozoal activity of medicinal *Piper* species used in Peruvian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113262, jan. 2021.

VEIGA-SANTOS, P. et al. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v. 137, n. 11, p. 1661–1670, 2010.

VIOLI, F. et al. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 15, n. 4, p. 283–288, jul. 1999.

VIOTTI, R. et al. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724, 16 maio 2006.

VOLPATO, H. et al. Mitochondrial Dysfunction Induced by N-Butyl-1-(4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carboline-3-Carboxamide Is Required for Cell Death of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130652, 18 jun. 2015.

VOLPATO, H. et al. In vitro anti-*Leishmania* activity of T6 synthetic compound encapsulated in yeast-derived β -(1,3)-d-glucan particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1264–1275, nov. 2018.

ZUMA, A. A. et al. How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 2, p. 93–100, fev. 2014.

ZWAAL, R. F. A.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 9, p. 971–988, maio 2005.