



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**Atividade antiepimastigota, citotóxica e fungicida de plantas  
medicinais da Região do Cariri**

KARLA KATIÚCIA ALVES DOS SANTOS

CRATO – CE

2011

**Atividade antiepipimastigota, citotóxica e fungicida de plantas  
medicinais da Região do Cariri**

Dissertação apresentada ao programa de Pós –  
Graduação em Bioprospecção Molecular da  
Universidade Regional do Cariri como  
requisito para Defesa (Linha de pesquisa:  
Bioprospecção de Produtos Naturais e  
Microbiologia).

Orientanda:

Karla Katiúcia Alves dos Santos

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

KARLA KATIÚCIA ALVES DOS SANTOS

**Atividade anti-epimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais  
da Região do Cariri**

PROJETO DEFENDIDO EM: 09/09/2011

RESULTADO: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA:**

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** (Orientador)

Departamento de Química Biológica – URCA

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes** (Membro)

Departamento de Química Biológica – URCA

---

**Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva** (Membro Externo)

Departamento de Ciências Biológicas – UFOP

---

**Prof. Dr. Iri Sandro Pampolha Lima**

Departamento de Farmácia – FMJ

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Kerntopf** (Suplente)

Departamento de Enfermagem – URCA

“Se vi mais longe foi por estar de pé  
sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, “Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo. Vosso bordão e vosso báculo são o meu amparo.” (Salmo 22, 04)

A Beto e Nailza, por todos os dias vividos com amor, carinho, compreensão, dignidade e muitos ensinamentos; aos meus exemplos de vida, dedico todas as minhas vitórias.

A Karine, Katiane e Kelvin, por crescerem junto comigo, compartilhando histórias, brincadeiras, alguns machucados e cicatrizes, sorrisos e lágrimas; por todos os bons e maus momentos.

A Lethícia, por ser simplesmente o amor da vida da titia!

A Miguel, por seu amor, amizade, companheirismo, ombro amigo, incentivo de todas as horas, paciência ilimitada e por todos os bons momentos.

A Paulo, por motivar os meus primeiros passos na biologia, me inserir no ambiente de pesquisa e, acima de tudo, ser um grande amigo (os ouriços que o digam), cunhado e padrinho.

A João Tiago, por sua amizade, pelos bons momentos, e principalmente por sua valiosa ajuda nos estudos para o processo de seleção do mestrado.

Aos amigos, por serem os melhores amigos que alguém poderia ter; por todas as teorias malucas, diversão, apoio e ajuda, com vocês minhas pequenas conquistas assumem proporções gigantescas (vamos comemorar até esquecer quem nós somos!).

A Henrique Douglas Melo Coutinho, pela orientação, por reconhecer o que você tem de melhor e pior e trabalhar em cima de seus defeitos; por ser um amigo que te impulsiona pra frente e, principalmente, por todo aprendizado transmitido durante este trabalho.

A todos os amigos do LMBM, por compartilharem conhecimentos, bons momentos, ócio criativo e o plano secreto de dominar o mundo; meu caminho foi mais calmo, leve e divertido por ter vocês ao meu lado.

Ao prof. Dr. José Galberto Martins da Costa e ao LPPN, pelo apoio e disponibilidade dos primeiros recursos.

Ao prof. Dr. Irwin Rosé Alencar Menezes e o LFQM, pela motivação, amizade e os bons papos nos momentos de descanso.

A prof. Dra. Maria Celeste Vega Gomez, por sua grande contribuição e parceria na realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, por todos os seus ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Aos colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação, pela amizade, disponibilidade e todo enriquecimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

A coordenação do Curso de Pós-Graduação e as secretárias, pelos serviços prestados, responsabilidade e amizade.

A FUNCAP pelo incentivo financeiro.

A URCA por ceder o espaço para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>  | <b>I</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | <b>II</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>  | <b>III</b> |
| <b>RESUMO</b>  | <b>IV</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>V</b>   |
| <br>   |            |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>02</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>07</b>  |
| 2.1. Geral   | 08         |
| 2.2. Específicos   | 08         |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>09</b>  |
| 3.1. Biodiversidade e Bioprospecção de Produtos Naturais   | 10         |
| 3.2. Doença de Chagas e Terapêutica Atual  | 11         |
| 3.3. Candidíase e Terapêutica Atual  | 14         |
| 3.4. Famílias, Gêneros e Espécies Botânicas Estudadas  | 17         |
| 3.4.1. Famílias Myrtaceae  | 17         |
| 3.4.1.1. Gênero <i>Eugenia</i>   | 17         |
| 3.4.2. Família Lamiaceae   | 19         |
| 3.4.2.1. Gênero <i>Hyptis</i>  | 19         |
| 3.4.2.2 Gênero <i>Mentha</i>   | 21         |
| 3.4.3. Família Cucurbitaceae Juss  | 22         |
| 3.4.3.1. Gênero <i>Momordica</i>   | 22         |
| 3.4.4. Família Turneraceae   | 24         |
| 3.4.4.1. Gênero <i>Turnera</i>   | 24         |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>26</b>  |
| 4.1. Seleção e coleta do material botânico   | 27         |
| 4.2. Obtenção dos extratos alcoólicos  | 28         |
| 4.3. Preparação dos extratos etanólicos de <i>Eugenia jambolana</i> (EEEJ), <i>Eugenia uniflora</i> (EEEU), <i>Hyptis martiusii</i> (EEHM), <i>Mentha arvensis</i> (EEMA), <i>Momordica charantia</i> (EEMC) e <i>Turnera ulmifolia</i> (EETU) | 28         |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4. Preparo das soluções a partir do extrato_____   | 29         |
| 4.4.1. Preparo da solução inicial e das soluções de teste_____   | 29         |
| 4.5. Linhagens celulares utilizadas_____   | 29         |
| 4.6. Reagentes e drogas_____   | 30         |
| 4.7. Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> _____  | 31         |
| 4.8. Ensaio de citotoxicidade_____   | 31         |
| 4.8. Atividade antifúngica e modulação_____  | 32         |
| 4.9. Análises estatísticas_____  | 32         |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO_____</b>  | <b>34</b>  |
| 5.1. Capítulo - Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of <i>Momordica charantia</i> _____  | 40         |
| 5.2. Capítulo - Cytotoxic, tripanocide and antifungal activities of <i>Eugenia jambolana</i> L._____   | 55         |
| 5.3. Capítulo - Anti- <i>Candida</i> activity of <i>Mentha arvensis</i> and <i>Turnera ulmifolia</i> _____   | 69         |
| 5.4. Capítulo - Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> and cytotoxic activities of <i>Eugenia uniflora</i> L. _____  | 77         |
| 5.5. Capítulo - Anti- <i>Candida</i> , cytotoxic and modulatory activity of <i>Eugenia uniflora</i> L._____  | 88         |
| 5.6. Capítulo - Trypanocide, cytotoxic, and anti- <i>Candida</i> activities of <i>Hyptis martiusii</i> Benth. _____  | 99         |
| 5.7. Capítulo - Evaluation of the anti- <i>Trypanosoma</i> and anti- <i>Leishmania</i> activity of <i>Mentha arvensis</i> and <i>Turnera ulmifolia</i> _____ | 114        |
| <b>6. CONCLUSÕES_____</b>  | <b>126</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS_____</b>   | <b>128</b> |
| <b>8. ANEXOS_____</b>  | <b>148</b> |



**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

- %AE – Percentual de inibição de epimastigotas
- AC – Grupo controle de absorbância
- ACB – Branco de meio de cultura
- AE – Absorbância do grupo experimental
- AEB – Branco de compostos
- BHI – Brain-Heart Infusion
- CE<sub>50</sub> – Concentração eficiente
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CIM/8 – Concentração subinibitória
- CPRG – Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EEJ – Extrato etanólico de *Eugenia jambolana*
- EEU – Extrato etanólico de *E. uniflora*
- EEHM – Extrato etanólico de *Hyptis martiusii*
- EEMA – Extrato etanólico de *Mentha arvensis*
- EEMC – Extrato etanólico de *Momordica charantia*
- EETU – Extrato etanólico de *Turnera ulmifolia*
- FBS – Fetal bovine serum (soro fetal bovino)
- HIA – Heart infusion agar
- LFQN – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular
- LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
- LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
- MIC – Minimum inhibitory concentration
- NCCLS – *National Comitee for Clinical Laboratory Standards*
- UFPB – Universidade Federal da Paraíba
- URCA – Universidade Regional do Cariri

## LISTAS DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Foto do inseto triatomíneo e as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____ | 12 |
| <b>Figura 2</b> – Estruturas químicas de Nifurtimox e Benzonidazol _____  | 14 |
| <b>Figura 3</b> - Estruturas químicas de Anfotericina B e Nistatina _____   | 16 |
| <b>Figura 4</b> – Foto de <i>Eugenia jambolana</i> _____  | 18 |
| <b>Figura 5</b> – Foto de <i>Eugenia uniflora</i> _____   | 19 |
| <b>Figura 6</b> – Foto de <i>Hyptis martiusii</i> Benth. _____  | 20 |
| <b>Figura 7</b> – Foto de <i>Mentha arvensis</i> _____  | 22 |
| <b>Figura 8</b> – Foto de <i>Momordica charantia</i> _____  | 23 |
| <b>Figura 9</b> – Foto de <i>Turnera ulmifolia</i> _____  | 25 |
| <b>Figura 10</b> – Mapa com a localização geográfica da área de estudo na chapada do Araripe e municípios próximos _____                | 28 |
| <b>Figura 11</b> - Estruturas químicas de mebendazol e metronidazol _____   | 32 |

**LISTA DE TABELA**

**Tabela 1** – Espécies, famílias botânicas, número das exsicatas e rendimento dos extratos que foram utilizados no estudo \_\_\_\_\_ 27

**RESUMO**

Países em desenvolvimento, ricos em biodiversidade e com abundantes conhecimentos tradicionais como no caso do Brasil, ainda apresentam uma alta incidência de doenças como tuberculose, malária, leishmaniose e doença de Chagas. A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas. O parasito pode ser transmitido aos humanos por insetos triatomíneos, alimentos contaminados pelas fezes do inseto, transfusão de sangue, transplantes de órgãos a partir de doadores infectados e por via transplacentária. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento específico para esta doença, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benzonidazol. Outro problema de saúde pública são as doenças fúngicas oportunistas, associadas a problemas de imunossupressão e comuns em ambientes hospitalares. Candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, frequentemente causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As manifestações clínicas das candidíases apresentam grande diversidade de quadros clínicos, podendo ser dividida em candidíase invasiva ou sistêmica e candidíase mucocutânea. Uma alternativa para o tratamento dessas doenças são produtos naturais de *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana*, *Mentha arvensis*, *Hyptis martiusii*, *Turnera ulmifolia* e *Momordica charantia*, plantas muito utilizadas na medicina tradicional e, para o presente estudo, seus extratos foram preparados. Para os estudos de atividade antiepipimastigota *in vitro*, foi utilizado o clone CL-B5 de *T. cruzi*. Formas epimastigotas do parasito foram semeados em uma concentração de  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  em 200  $\mu\text{l}$  de infusão de fígado triptose. Para o ensaio citotóxico foram utilizados macrófagos J774. Macrófagos J774 foram semeados ( $5 \times 10^4$  células/ poço) em placas de microdiluição de fundo chato de 96 poços com 100  $\mu\text{l}$  de meio RPMI 1640. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em infusão de coração e cérebro (BHI) 10%, pelo método de microdiluição em caldo, usando uma suspensão de  $10^5$  UFC/mL e concentrações dos extratos variando de 1024-8  $\mu\text{g/mL}$ . A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano foi observado. Quanto à atividade tripanocida, *E. jambolana* demonstrou a maior porcentagem de inibição do parasito, sendo capaz de eliminar 100% da amostra em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . *M. charantia*, *E. uniflora* e *H. martiusii* apresentaram uma inibição de 81, 80 e 46 % respectivamente em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . *M. arvensis* exibiu 65% de inibição a uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . *T. ulmifolia* inibiu 29% em uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Na avaliação da CIM dos extratos, apenas o extrato etanólico de *H. martiusii* demonstrou uma inibição de 256  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa *C. krusei* ATCC 40147, todos os outros extratos apresentaram uma CIM de 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Nos testes de modulação da atividade dos antifúngicos, todos os extratos reduziram a CIM do metronidazol em 2 pontos para as cepa *C. albicans* ATCC 40277 e *C. tropicalis* ATCC 13803.

**ABSTRACT**

Developing countries with abundant traditional knowledge and rich biodiversity, as in the case of Brazil, still grapple with a high incidence of disease such as tuberculosis, malaria, leishmaniasis and Chagas disease. Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 10 million people in the Americas. The parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods contaminated their feces, blood transfusion or organ transplants from infected donors and the transplacental route. Currently, chemotherapy is the only specific treatment available for this disease, where the most utilized drugs are nifurtimox and benznidazol. Another health problem is the opportunistic fungal diseases, problems associated with immunosuppression are common in hospital environments. Candidiasis is the most frequent infection caused by opportunistic fungi. The main species associated with this disease are *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The clinical features of candidiasis are quite diverse, can be divided into systemic or invasive candidiasis and mucocutaneous candidiasis. An alternative for replacing these drugs are natural extracts from *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana*, *Mentha arvensis*, *Hyptis martiusii*, *Turnera ulmifolia* and *Momordica charantia*, plants widely used in traditional medicine for this study, their extracts were prepared. To research *in vitro* antiepipmastigote activity, *T. cruzi* CL-B5 clone was used. Epimastigotes forms of parasite were inoculated at a  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> concentration in 200 µl triptose-liver infusion. For the citotoxicity assay J774 macrophages were used. J774 macrophages were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 µl of RPMI 1640 medium. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using 10% BHI by the microdilution method and suspensions with  $10^5$  CFU/ml and an extract concentration ranging between 1024-8 µg/ml. MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. As for trypanocidal activity, *E. jambolana* showed the highest percentage of inhibition of the parasite, being able to eliminate 100% of the sample at a concentration of 100 micrograms per milliliter. *M. charantia*, *E. uniflora* and *H. martiusii* showed an inhibition of 81, 80 and 46% respectively at a concentration of 100 micrograms per milliliter. *M. arvensis* exhibited 65% inhibition at a concentration of 500 mg / mL. *T. ulmifolia* inhibited 29% at a concentration of 500 mg / mL. In the evaluation of MIC of the extracts, only showed an inhibition ethanol extract of *H. martiusii* of 256 µg / mL for the strain *C. krusei* ATCC 40147, all other extracts showed a MIC of 1024 micrograms per milliliter. In tests of modulating the activity of antifungal agents, all the extracts reduced the MIC of metronidazole in 2 points for the strain and *C. albicans* ATCC 40277 *C. tropicalis* ATCC 13803.

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, as plantas têm sido utilizadas como fonte de medicamentos. Suas propriedades medicinais foram descritas em tabletes de argila pelos Assírios cerca de 2000 a.C., e documentadas nas culturas egípcia, Ayurveda indiana (PATWARDHAN 2005), medicina tradicional Chinesa e encontrada em vários documentos Europeus (KONG et al., 2009). Atualmente continuam a servir como base para muitos medicamentos (GINSBURG, DEHARO 2011). O conhecimento nativo sobre a utilização destas plantas tem sido bem documentado em várias partes do mundo (BEGOSSI et al., 2002). Esta prática de tratamento com produtos naturais é bastante comum em vários povos, sendo mais evidente nos países em desenvolvimento, onde a maior parte da população pobre não tem acesso aos medicamentos industrializados (AYYANAR, IGNACIMUTHU 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

Muitas pesquisas abordam o uso popular de plantas medicinais para direcionar estudos farmacológicos, sendo essa abordagem definida como avaliação etnorientada. A etnobotânica e a etnofarmacologia têm se destacado bastante neste tipo de avaliação. Enquanto a etnobotânica se ocupa da inter-relação entre pessoas e plantas (ALBUQUERQUE 2005), a etnofarmacologia se ocupa do estudo dos preparados tradicionais. Seu objetivo é avaliar a eficácia das técnicas tradicionais fazendo uso de um grande número de modelos farmacológicos (WALLER 1993; ALBUQUERQUE, HANAZAKI 2006). Um dos maiores desafios na determinação do efeito farmacológico de um extrato tem sido a elucidação de compostos ativos. As plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos. Quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos e isso se deve a presença de diferentes compostos (GEBHARDT 2000; MACIEL et al., 2002).

A criação de modelos nacionais de saúde pautados nas aptidões e carências de países em desenvolvimento é tida como fundamental para tornar o acesso à saúde pública mais abrangente e de melhor qualidade (WHO 2002). Especialmente em países com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais, como é o caso do Brasil, e com elevada incidência de doenças tropicais, tais como tuberculose, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose e doença do sono (FUNARI, FERRO 2005).

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, atinge cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas (WHO, 2010). O parasita pode ser transmitido aos seres humanos por insetos triatomíneos, alimentos contaminados por suas fezes, transfusão de sangue ou transplante de órgãos de doadores infectados e por via transplacentária de uma mãe contaminada para seu recém-nascido (WHO, 2010). Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível e os medicamentos mais utilizados são o nifurtimox e o benzonidazol (WHO, 2010). Vários estudos envolvendo a análise de extratos vegetais revelaram uma atividade potencial contra *T. cruzi*, por exemplo, extratos de *Arrabidaea triplinervia* (LEITE et al., 2006), *Dracocephalum kotschy* (SAEIDNIA et al., 2004) e *Azorella compacta* (ARAYA et al., 2003).

A avaliação da toxicidade de substâncias ativas é o primeiro passo para utilização destes compostos em modelos animais. Drogas correntemente utilizadas para o tratamento da doença de Chagas demonstram alta toxicidade devido aos metabólitos produzidos que apresentam alta reatividade afetando os tecidos do hospedeiro (DIAS, DESSOY 2009). A atividade citotóxica de várias plantas tem sido bem avaliada, como por exemplo, *Calophyllum brasiliense* (REYES-CHILPA et al., 2008), *Capparis spinosa*, *Kleinia odora* e *Psiadia punctulata* (ABDEL-SATTAR et al., 2010).

Outro fator que impulsiona esta procura por produtos naturais ativos é o surgimento de resistência de algumas cepas aos fármacos convencionais, tal como ocorre em algumas leveduras do gênero *Candida* (ALVES et al., 2006; BOFF et al., 2008). Além disso, a maioria dos antifúngicos apresentam muitos efeitos adversos o que impossibilita seu uso persistente por pessoas imunodeprimidas.

Candidíase ou candidose é a mais freqüente infecção fúngica oportunista, em que as espécies comumente implicadas neste quadro clínico são: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (SIDRIM, ROCHA 2004). O espectro clínico da candidíase é muito amplo, indo desde manifestações leves, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos (COUTINHO 2009). Estas leveduras são parte da microbiota normal, tornando-se patogênica em casos como o de imunodeficiência congênita ou adquirida e imunossupressão induzida pelo estresse grave (DIGNANI et al., 2003; COLOMBO, GUIMARÃES 2003). Uma variedade de extratos tem sido extensivamente estudada na busca de tratamentos alternativos para estas infecções oportunistas, como no caso de *Himatanthus articulata* (SEQUEIRA et al., 2009),



*Mentha longifolia* (AL-BAYATI 2009), *Malva sylvestris* e *Psidium guajava* (ALVES et al., 2009).

É notável que a busca e descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antitripanocida e antifúngica e baixos nível de toxicidade representam uma evolução farmacológica. Apesar da diferença existente entre as infecções causadas por *T. cruzi* e leveduras, esses microrganismos necessitam de esteróis específicos para a viabilidade e proliferação celular. Vários estudos têm mostrado que inibidores da biossíntese de ergosterol (EBI) comercialmente disponíveis, altamente eficazes no tratamento de doenças fúngicas (tais como cetoconazol, itraconazol ou terbinafina), possuem atividade supressiva, mas não curativa contra infecções por *T. Cruzi*. No entanto, novos derivados triazólicos como posaconazol tem mostrado cura parasitológica em modelos crônicos e agudos em ratos. Estes foram os primeiros compostos a relatar cura em formas sanguíneas da doença (URBINA, 2009a).

A região do Cariri, localizada ao Sul do Estado do Ceará, tem sua geografia marcada pela Chapada do Araripe, com uma área de proteção ambiental e uma floresta nacional. Esta região, com mais de oitenta municípios na chamada mesorregião do Araripe, compreendendo, além do Estado do Ceará, os Estados do Piauí, Pernambuco e Paraíba, sendo as cidades de Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha o seu centro de desenvolvimento político e econômico (FUNDETEC, 1998; COUTINHO 2008).

Na Chapada do Araripe, com área de 55.000km<sup>2</sup>, a exploração de recursos energéticos oriundos de madeira se dá sem manejo adequado, o que levou, em poucas décadas, a uma redução de sua cobertura florestal em 50% (FUNDETEC, 1998; AUGUSTO, GÓES 2007; COUTINHO 2008). A Chapada do Araripe abriga um bioma de características geológicas, geomorfológicas, pedológicas, climáticas, hidrográficas/hidrológicas e de vegetação bem diversificado. As formações florestais da Chapada do Araripe podem, de maneira simplificada, ser estratificadas em mata úmida, cerradão, cerrado, carrasco e caatinga. Esta variedade de ambientes possibilita uma grande variedade de tipos vegetais, tanto arbóreos quanto arbustivos. Essa produção florestal é absorvida pelos produtores rurais para atender necessidades energéticas e de infra-estrutura dentro das propriedades (entre outras, cercas, construções rurais, cabo de ferramentas agrícolas e portais), representando uma atividade complementar às atividades agropecuárias nos períodos de estiagem no semi-árido nordestino. Além do potencial energético e madeireiro,

também há a produção de frutos e produtos obtidos de espécies consideradas não madeireiras e que são utilizados como alimentos e como remédios na medicina tradicional tais como: araçá (*Psidium araçá Raddi*), cajuí (*Anacardium humile*), pitanga (*Eugenia michelli*), pequi (*Caryocar coriaceum*), janaguba (*Himatanthus drasticu*), faveira (*Dimorphandra gardneriana*), jatobá (*Hymenaea stignocarpa*) e pau de óleo ou copaíba (*Copaifera langsdorffii*), que apresentam valor econômico e cultural para a região (FUNDETEC, 1998; COUTINHO 2008).

# **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade microbiológica e citotóxica dos extratos etanólicos obtidos de folhas de *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana*, *Mentha arvensis*, *Hyptis martiusii*, *Turnera ulmifolia* e *Momordica charantia*, bem como, avaliar as possíveis interações dos extratos com drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade anti *Trypanosoma cruzi in vitro* dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana*, *Mentha arvensis*, *Hyptis martiusii*, *Turnera ulmifolia* e *Momordica charantia* em cultura de forma epimastigota, cepa CL-B5, do protozoário.
- Identificar os níveis de citotoxicidade *in vitro* dos extratos em cultura de Macrófago, linhagem J774.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos frente as cepas de leveduras *Candida albicans* ATCC 40277, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida krusei* ATCC 40147.
- Verificar a eficácia dos extratos na modulação da resistência fúngica aos fármacos Anfotericina B, Nistatina, Mebendazol e Metronidazol.

# **REVISÃO DE** **LITERATURA**

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Biodiversidade e Bioprospecção de Produtos Naturais**

O Brasil apresenta uma expressiva diversidade de ecossistemas florestais que se encontram divididas em seis biomas principais: floresta úmida da Amazônia, Pantanal, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga e Pampa (LEITÃO-FILHO 1987; GIULIETTI et al., 2005). Dentro desse mosaico de tipos vegetacionais, as plantas também apresentam estratégias específicas para enfrentar os aspectos bióticos (ataque de pragas e patógenos) e abióticos (seca, mudança de temperatura, solos salinos, dentre outros). Portanto, não surpreende o fato de que as plantas geralmente apresentem vários metabólitos secundários, muitos deles úteis para fins medicinais e industriais (BENKO-ISEPPON, CROVELLA 2010). Apesar de o território brasileiro concentrar a maior biodiversidade do mundo, estimada em 20% do número total de espécies do planeta, apenas 8% tem sido alvo de pesquisas (ELISABETSKY; COSTA CAMPOS 1996; GARCIA et al., 1996).

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que atualmente o mercado econômico mundial gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. Dentro desta perspectiva, se esperava que o Brasil fosse um país privilegiado. No entanto, a escassa inovação tecnológica em pesquisa e exploração de produtos naturais retarda este desenvolvimento (YUNES et al., 2001; FUNARI, FERRO 2005). A interação de empresas com universidades e centros de pesquisas é essencial para o desenvolvimento de fitoterápicos. O governo também representa um fator chave neste desenvolvimento, com a criação de políticas nacionais que estimulem o avanço necessário para incluir o Brasil neste mercado bilionário (FUNARI, FERRO 2005).

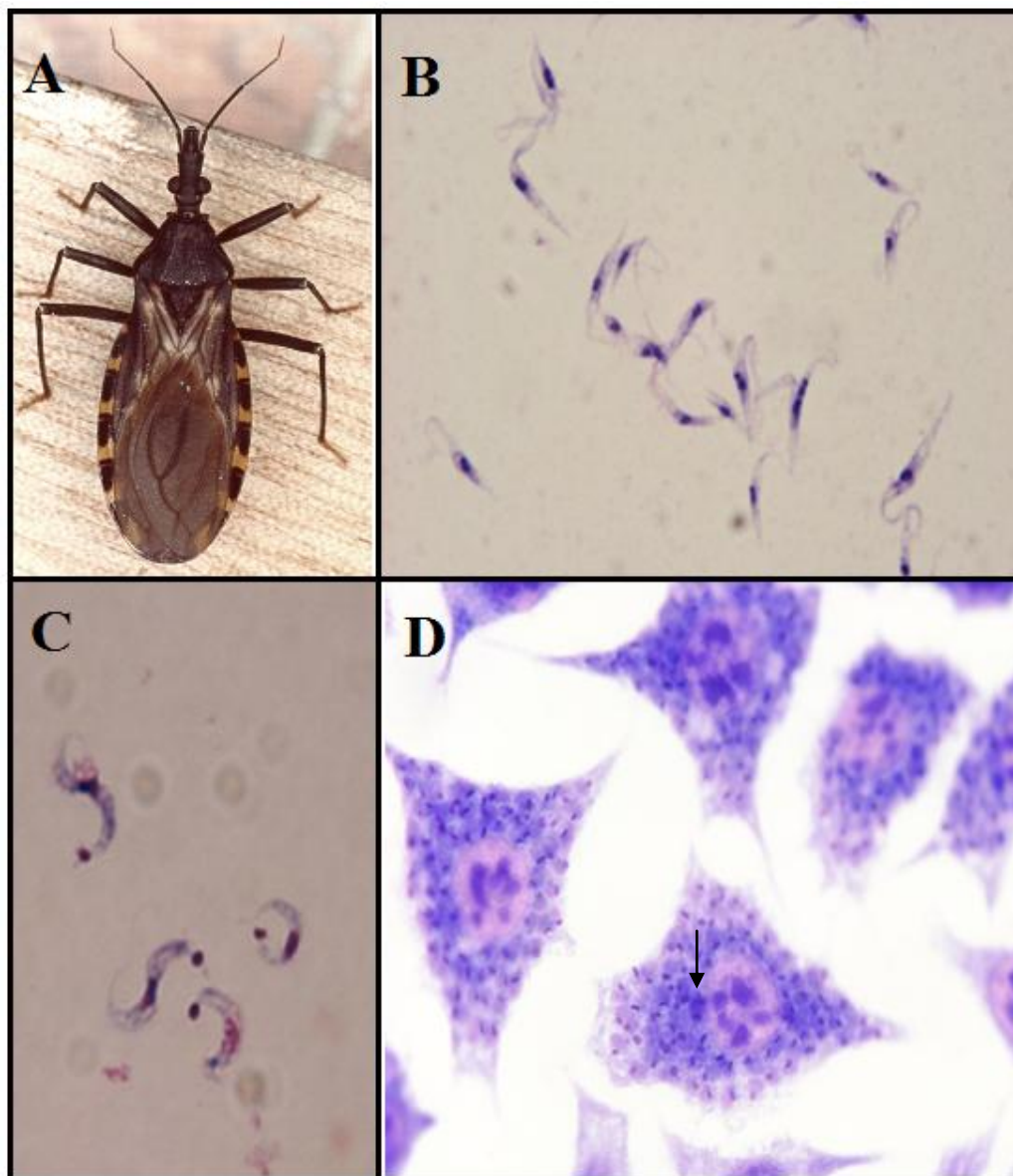
A bioprospecção ética da biodiversidade passa a ter importância estratégica para países em desenvolvimento, sendo um instrumento tanto para a descoberta de alternativas para o tratamento de doenças típicas destes países, quanto para estimular o crescimento de suas economias (MIGUEL, MIGUEL 2004; FUNARI, FERRO 2005).

### 3.2 Doença de Chagas e Terapêutica Atual

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é considerada um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. Esta doença, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, causando aproximadamente 10.000 mortes por ano, sendo que outros 25 milhões de indivíduos vivem em áreas com risco de contaminação (WHO, 2010).

O protozoário flagelado *T. cruzi* da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* é o agente causador da doença de Chagas (HOARE 1972). O parasita pode ser transmitido para humanos por insetos triatomíneos (Figura 1A), alimentos contaminados por suas fezes, transfusão de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados e por via transplacentária (WHO 2010). O ciclo de vida deste parasito é bastante complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados e diferentes estágios de desenvolvimento.

Considerando que o ciclo começa quando um inseto da família Reduviidae suga o sangue de vertebrados infectados com formas tripomastigotas (forma sanguínea circulante e infectante); uma vez ingerido, a maioria dos tripomastigotas (Figura 1C) sofrerá lise no estômago do inseto (CASTRO et al., 2007), os sobreviventes se transformarão em poucos dias em epimastigotas (forma presente no vetor); epimastigotas (Figura 1B) migram para o intestino, onde se dividem intensamente (ALVES et al., 2007, NOGUEIRA et al., 2007); nas regiões posteriores do intestino e reto, transformam-se em formas tripomastigotas metacíclicas que são lançadas juntamente com as fezes enquanto o inseto se alimenta (GARCIA et al., 2007). Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas invadem as células no local da inoculação (por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais). Este ciclo envolve várias etapas como a formação de um vacúolo parasitário, diferenciação de formas tripomastigotas em formas amastigotas (forma de replicação intracelular) (Figura 1D) e lise da membrana do vacúolo parasitário por enzimas secretadas pelo parasita, de modo que estas formas entram em contato direto com as organelas da célula (CARVALHO, SOUZA 1989; SOUZA et al., 2010).



**Figura 1:** A – Um exemplar de inseto triatomíneo *Triatoma infestans* (Popularmente conhecido como barbeiro), fonte: [www.icb.usp.br](http://www.icb.usp.br); B – Formas epimastigotas, C – Formas tripomastigotas, D – Formas amastigotas em cultura celular (B, C, D – formas do protozoário *Trypanosoma cruzi* – gentilmente cedidas pela Dra. Celeste Vega).

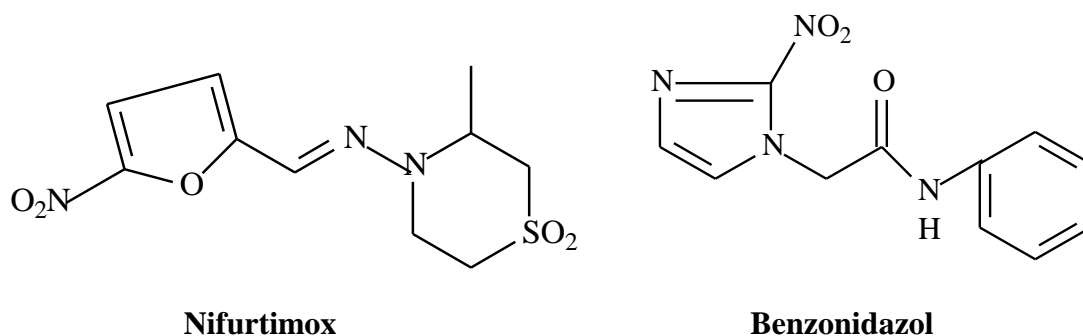
Embora a doença de Chagas ocorra no México, América Central e do Sul, as manifestações clínicas e as características epidemiológicas são diferentes nas diversas zonas endêmicas (MAYA et al., 2010). A heterogeneidade do parasita tem sido extensivamente estudada por métodos biológicos, bioquímicos e moleculares, o que explica as diferenças geográficas na morbidade e mortalidade (MACEDO et al., 2004; MANOEL-CAETANO, SILVA 2007; RASSI JR et al., 2010). Em 1999, um consenso (Recommendations From a Satellite Meeting, 1999) sobre as cepas de *T. cruzi* descreveu



duas linhagens principais: *T. cruzi* I, que predomina no ciclo de transmissão silvestre, parece ser menos resistente às drogas tripanocidas, e está associada à doença humana em todos os países endêmicos ao norte da bacia amazônica. *T. cruzi* II, que predomina no ambiente doméstico em todos os países do Cone Sul, parece ter aumentado a resistência à droga tripanocida e, pelo menos no Brasil e na Argentina, tem sido convincentemente relacionada ao dano tecidual causado pela doença de Chagas (FREITAS et al., 2005).

A doença se caracteriza por uma fase aguda que pode durar até 4 meses e uma fase crônica que se prolonga por toda a vida do hospedeiro (BOAINAIN, RASSI 1979; DIAS, DESSOY 2009). A fase aguda é geralmente assintomática, porém pode ocorrer uma série de sinais e sintomas como febre, dores musculares, mal estar, sudorese, hepatoesplenomegalia, insuficiência cardíaca e, com menor frequência, pode ocasionar meningoencefalite (MAYA et al., 2010). A fase latente ou indeterminada dura de 10 a 30 anos, sendo caracterizada pela ausência de sintomas. Uma miocardite focal se instala nesta fase. Durante a fase crônica da doença, os sintomas surgem de insuficiência e arritmias cardíacas e tromboembolismo arterial ou venoso. A insuficiência cardíaca é geralmente biventricular, que é a manifestação mais frequente e grave da doença e está associada com pior prognóstico e altas taxas de mortalidade em comparação com insuficiência cardíaca de outras causas (RASSI JR, RASSI 2010; RASSI et al., 2009).

Atualmente, dois medicamentos são indicados para o tratamento específico da doença de Chagas, o nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, da Bayer) e o benzonidazol (Rochagan<sup>®</sup>, da Roche) (WHO 2010), ambos são tripanocidas a todas as formas do parasita. Entretanto, a terapia nem sempre é bem sucedida, pois os medicamentos apresentam toxicidade elevada e muitos efeitos adversos, o que representa uma ameaça para seu uso clínico e, frequentemente, obriga a suspensão da terapia (MAYA et al., 2010; COURA 2007; ROCHA et al., 2007). O nifurtimox e benzonidazol (Figura 2) agem através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, afetando todas as macromoléculas do parasita (MAYA et al., 2003). Não existem medicamentos de eficácia superior ao nifurtimox e benzonidazol, porém numerosos compostos químicos naturais e sintéticos estão sendo adicionados à lista de medicamentos com potencial efeito tripanocida, como o alopurinol e seus análogos cetoconazol e itraconazol (antifúngicos imidazólicos), quinonas, diversos derivados de nitroheterocíclico, antioxidantes e outras drogas em uso clínico, tais como fenotiazinas (APT et al., 2005; MAYA et al., 2007; URBINA 2009b).



**Figura 2:** Estruturas químicas de Nifurtimox e Benzonidazol (fármacos utilizados na doença de Chagas)

### 3.3 Candidíase e Terapêutica Atual

A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista (SIDRIM, ROCHA 2004). Durante muito tempo, acreditava-se que apenas *Candida albicans* era capaz de causar doença no homem; hoje, sabe-se que, em sua grande maioria, as leveduras são capazes, em condições especiais do hospedeiro, de causar diversos tipos de quadro clínico (COUTINHO 2009). O habitat de espécies de *Candida* é bastante amplo, estando ligado, assim, à espécie humana e a todas as espécies de primatas até o momento investigadas. Animais domésticos, uma imensa variedade de mamíferos selvagens e todos os pássaros têm sido também imputados como reservatórios desse microrganismo (SIDRIM, ROCHA 2004).

*Candida albicans* cresce frequentemente nas membranas mucosas da boca, do trato intestinal e geniturinário. As infecções são normalmente resultado do supercrescimento oportunista, quando a flora competidora é suprimida por antibióticos ou outros fatores (TORTORA et al., 2005). As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (COLEMAN et al., 1998). A *C. albicans* é a mais frequente, sendo responsável por 100% dos casos de candidíase da orofaringe e 90% de candidíase vulvovaginal (LOPES 2006).

As manifestações clínicas das candidíases apresentam grande diversidade de quadros clínicos, podendo ser dividida em candidíase invasiva ou sistêmica e candidíase

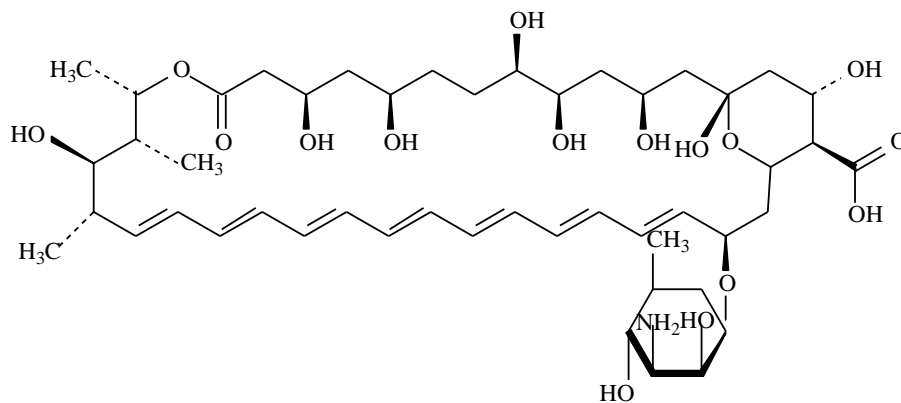
mucocutânea (oral, intertriginosa, balanoprepucial, vulvovaginal, paroníquia e mucocutânea crônica). Candidíase invasiva é uma infecção profunda e grave que acomete indivíduos imunocomprometidos. Qualquer órgão pode ser acometido, assim, tem-se candidíase ocular, hepatoesplênica, pulmonar, cardíaca, do sistema nervoso central, musculoesquelética, miosites, artrites, dentre outras (LOPES 2006). Candidemia é a infecção da corrente sanguínea causada por *Candida* sp. Representa um peso considerável em pacientes hospitalizados e está associada com tempo excessivo de internação e altas taxas de mortalidade (GUDLAUGSSON et al., 2003).

Candidíase oral, caracterizada por placas esbranquiçadas que comprometem toda a cavidade oral e, em casos graves, disseminam-se pela faringe, laringe, esôfago, traquéia e brônquios. Candidíase intertriginosa atinge dobras e superfície justapostas da pele, onde se observam lesões eritematosas e secretantes formando fissuras ou erosões. Candidíase balanoprepucial apresenta-se como lesões eritematoerosivas da glândula e prepúcio, recobertas ou não por induto esbranquiçado, com ardor e prurido. (LOPES 2006). Na candidíase paroníquia, observa-se uma tumefação inflamatória da região da pele que circunda a unha (SIDRIM, ROCHA 2004).

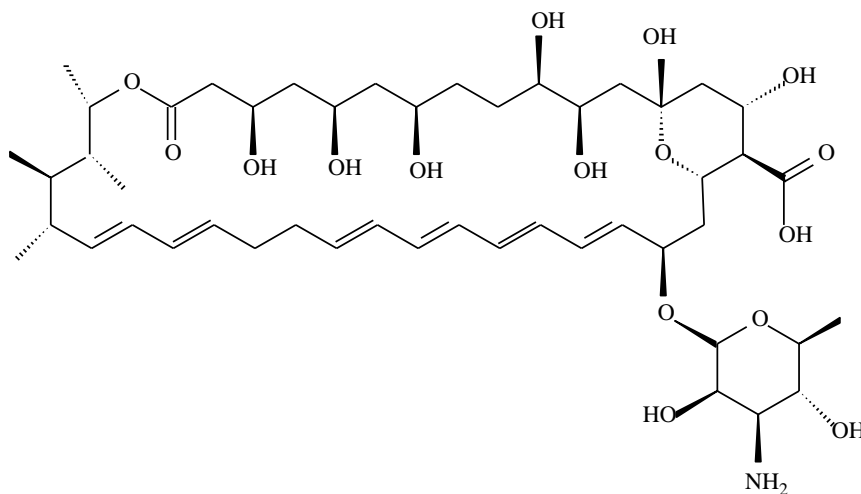
A candidíase vaginal afeta uma elevada proporção de mulheres em idade adulta. Estima-se que aproximadamente 75% destas apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, das quais 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes (FERRAZA et al., 2005). Candidíase mucocutânea crônica é uma infecção persistente ou refratária/recorrente da pele, unhas e membranas mucosas, geralmente causada por *C. albicans*, que pode estar relacionada a uma variedade de diferentes condições clínicas, ainda não totalmente identificadas (KIRKPATRICK, HILL 2001).

Os fármacos antifúngicos atualmente disponíveis são classificados em diversas categorias: fármacos sistêmicos para infecções sistêmicas, fármacos orais para infecções mucocutâneas e fármacos tópicos para infecções mucocutâneas. A anfotericina B (Figura 3) é um macrolídeo poliênico anfotérico utilizado para o tratamento das infecções sistêmicas e é o agente antifúngico com maior espectro de ação. Possui atividade contra as leveduras clinicamente importantes, incluindo *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. O fluconazol constitui o azol mais comumente utilizado para o tratamento da candidíase mucocutânea. A nistatina é um (Figura 3) macrolídeo poliênico muito semelhante à

anfotericina B, utilizada na terapia antifúngica tópica. Mostra-se ativa contra a maioria das espécies de *Candida* (KATZUNG 2005).



**Anfotericina B**



**Nistatina**

**Figura 3:** Estruturas químicas de Anfotericina B e Nistatina

### 3.4 Famílias, Gêneros e Espécies Botânicas Estudadas

#### 3.4.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende 121 gêneros e 3800-5800 espécies de arbustos ou árvores, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WILSON et al., 2001). Espécies da família Myrtaceae são frequentemente encontradas em várias florestas tropicais da América. No Brasil, a família Myrtaceae é uma das mais importantes, sendo muitas vezes uma das famílias lenhosas dominantes na Mata Atlântica (BARROSO, PERÓN 1994). Diversas espécies desta família são cultivadas por seus frutos comestíveis, de raro sabor e bom gosto, contribuindo para o desenvolvimento econômico (LANDRUM, KAWASAKI 1997; KÄHKÖNEN et al., 2001). Outras são consideradas medicinalmente relevantes e são largamente usadas pela população no tratamento de diarreias e outras desordens (STEFANELLO et al., 2011).

##### 3.4.1.1 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* possui cerca de 500 espécies, sendo um dos maiores e mais representativos gêneros da família Myrtaceae (CARDOSO, SAJO 2004); encontra-se bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (RODRIGUES, NAVE 2000; ARANTES, MONTEIRO 2002; ROMAGNOLO, SOUZA 2006).

*Eugenia jambolana* (Figura 4) é popularmente conhecida no Brasil como jambolão, e é muito usada na medicina popular para tratar diabetes, irritação da garganta e disenteria (MIGLIATO et al., 2006). Produtos naturais de *E. jambolana* apresentam vários relatos na literatura de atividades hipoglicemiante (SUNDARAM et al., 2009), hepatoprotetora (SISODIA, BHATNAGAR 2009), antiúlcero-gênica (CHATURVEDI et al., 2007), fototóxica (COUTINHO et al., 2009a), antibacteriana (COUTINHO et al., 2010a), moduladora da atividade de antibiótico (COUTINHO et al., 2010b) e atividade antioxidante (SANTOS et al., 2010). No extrato metanólico das folhas de *E. jambolana* já foram identificados triterpenoides, taninos, flavonoides e antraquinonas (BRAGA et al., 2007).



**Figura 4:** Foto de *Eugenia jambolana* (www.flickr.com)

*Eugenia uniflora* (pitanga) (Figura 5) ocorre naturalmente na Argentina, Uruguai e Brasil, sendo cultivada como ornamental e frutífera. A espécie é indicada para recomposição de áreas degradadas e seus frutos são apreciados pela fauna e pelo homem, em razão do sabor agradável e refrescante (BACKES, IRGANG 2002; LORENZI 2002). Além disso, é descrita e estudada por seu potencial antimicrobiano (HOLETZ et al., 2002), hipotensor (CONSOLINI, SARUBBIO 2002), antioxidante (VELAZQUEZ et al., 2003), fotossensibilizador e potencializador de antibióticos (COUTINHO et al., 2010b,c). Na análise de seus óleos já foram identificados monoterpenos, sesquiterpenos (principalmente dos grupos selinane e germacrano) (STEFANELLO et al., 2011), flavonoides (myricitrin e quercetina), taninos e fenois (BANDONI et al., 1972; WAZLAWIK et al., 1997).



**Figura 5:** Foto dos frutos de *Eugenia uniflora* (www.montosogardens.com)

### **3.4.2 Família Lamiaceae**

A família Lamiaceae (ordem Lamiales) é constituída por aproximadamente 258 gêneros e 7193 espécies, das quais 40% possui propriedades aromáticas. Gêneros, tais como *Salvia*, *Hyptis*, *Scutellaria*, *Coleus*, *Plectranthus*, *Stachys*, *Nepeta* e *Teucrium* têm uma distribuição ampla e cosmopolita, embora sejam especialmente abundantes na Região do Mediterrâneo (MELENDO et al., 2003; APG II 2003). No Brasil e em outras áreas de cerrado do leste da América do Sul, a família Lamiaceae, representada principalmente pela subtribo neotropical Hyptidianaee (tribo Ocimeae) mostra fortes padrões de variação florístico e taxonômico e produz um grande número de novas espécies (ALMEIDA, ALBUQUERQUE 2002).

#### **3.4.2.1 Gênero *Hyptis***

O gênero *Hyptis* é composto por aproximadamente 350-400 espécies na forma de pequenas ervas a arbustos de grande porte, que são distribuídos nos trópicos e regiões temperadas quentes de todo o mundo. Estudos anteriores sobre os constituintes de espécies do gênero *Hyptis* revelaram diterpenoides (FRAGOSO-SERRANO et al., 1999; OHSAKI et al., 2005), flavonoides (PEREDA-MIRANDA, DELGADO 1990; NOVELO et al., 1993; ISOBE et al., 2006), triterpenos (FALCÃO et al., 2003), lignanas (NOVELO et al.,

1993; KUHNT et al., 1994), Sesquiterpenos (FACEY et al., 2005) e derivados  $\alpha$ -pirona (PEREDA-MIRANDA et al., 1993; BOALINO et al., 2003; DENG et al., 2009).

Muitas espécies do gênero *Hyptis* são utilizadas na medicina popular, tais como *H. Suaveolens* e *H. Pectinata*, indicadas na forma de infusões, decocto e em forma de cigarro para o tratamento de cólicas menstruais, problemas digestivos, odontalgias, cefaleias, sendo também indicadas contra gripes, febres, problemas respiratórios, amenorreias e dismenorreias (GRENAND et al., 1987; AGRA et al., 1994; CORRÊA 1974). Um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas já foi relatado para muitas espécies do gênero *Hyptis*, como atividade antimicrobiana (ISOBE et al., 2006; SOUZA et al., 2003; COUTINHO et al., 2008a), antinoceptiva e antiinflamatória (RAYMUNDO et al., 2011).

*Hyptis martiusii* (Figura 6), popularmente conhecida no Nordeste como cidreira-do-campo, é uma herbácea usada na medicina tradicional contra doenças intestinais e estomáticas (AGRA et al., 2008). São poucos os relatos de suas atividades biológicas e farmacológicas, entretanto, já foi relatada atividade antitumoral (COSTA-LOTUFO et al., 2004), citotóxica (ARAÚJO et al., 2006), genotóxica (CAVALCANTI et al., 2008), inseticida (ARAÚJO et al., 2003) e antibacteriana (COUTINHO et al., 2008a; 2009a, 2010d,e).



**Figura 6:** Foto de *Hyptis martiusii* Benth. ([www.plantes-rizieres-guyane.cirad.fr](http://www.plantes-rizieres-guyane.cirad.fr)).



### 3.4.2.2 Gênero *Mentha*

Há mais de 25 espécies no gênero *Mentha*. Entre as mais bem estudadas pode-se destacar a *M. arvensis* (menta japonesa), *M. citrata* (menta-do-levante) e *M. piperita* (hortelã pimenta) (ZAUZA et al., 2003). Espécies de *Mentha* são bastante conhecidas por suas propriedades na medicina tradicional e popular. As folhas são utilizadas para tratar distúrbios digestivos tais como dispepsia, disenteria bacilar, flatulência, gastrite e enterite. Também é usada no tratamento de bronquite, diabetes, diarreia, febre, hipertensão, icterícia, náuseas, dores, doenças respiratórias e infecções do trato urinário (BALIGA, RAO 2010).

Diversas atividades já foram descritas para este gênero, como espasmolítica (ESTRADA-SOTO et al., 2010), antimicrobiana (HÖFLING et al., 2010; COUTINHO et al., 2008b, 2009b; RAJA, DEVI 2010), inseticida (PAVELA 2005; 2008), anticarcinogênica (JAIN et al., 2010), antiinflamatória (PEARSON et al., 2010), radioprotetora (BALIGA, RAO 2010; JAGETIA 2007), neuroprotetora (LÓPEZ et al., 2010), antioxidante (LÓPEZ et al., 2007) e gastroprotetora (LONDONKAR, PODDAR 2009).

*Mentha arvensis* (Figura 7), é popularmente conhecida como hortelã japonesa ou menta, é uma planta aromática com folhas e inflorescências ricas em óleo essencial, sendo o mentol seu principal constituinte. O óleo essencial da menta é empregado na indústria alimentícia, farmacêutica e de higiene. Na medicina popular, a menta é utilizada no tratamento de distúrbios digestivos e de verminoses (MARTINS et al., 1994). Muitos estudos têm demonstrado suas atividades antimicrobiana (RAJA, DEVI 2010; COUTINHO et al., 2008b, 2009b; HUSSAIN et al., 2010), gastoprotetora (LONDONKAR, PODDAR 2009), citotóxica (HUSSAIN et al., 2010) e radioprotetora (JAGETIA 2007).



**Figura 7:** Foto de *Mentha arvensis* L. ([www.popgen.unimaas.nl](http://www.popgen.unimaas.nl)).

### **3.4.3 Família Cucurbitaceae Juss.**

A família Cucurbitaceae é constituída por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 825 espécies (MABBERLY 1987). Segundo o sistema de classificação APG II (2003), esta família pertence a ordem Cucurbitales, sendo seus membros encontrados principalmente em regiões tropicais, com ocorrência muito rara em áreas temperadas. É considerada uma das mais importantes famílias de plantas utilizadas para a produção de alimentos e fibras (MONTES-HERNADEZ, EGUIARTE 2002; CARDOSO 2003).

#### **3.4.3.1 Gênero *Momordica***

O gênero *Momordica* é reconhecido por sua diversidade em atividades biológicas relatadas na literatura, como por exemplo, atividade citotóxica e inibição de síntese protéica (CHUETHONG et al., 2007), atividade imunomoduladora (TSOI et al., 2006), antioxidante (TSOI et al., 2005), antitumoral (TIEN et al., 2005), atividade antiplasmodial (BENOIT-VICAL et al., 2006), propriedade inseticida (NARASIMHAN et al., 2005).

*Momordica charantia* (Figura 8) é uma herbácea popularmente conhecida no Brasil como melão-de-São-Caetano. Originária da Índia, é amplamente cultivada na Ásia, África

e América do sul. O melão-de-São-Caetano é utilizado como alimento e bastante indicado na medicina popular para o diabetes e suas complicações, no tratamento de cólicas, doenças virais, hemínticas, malária e infecções microbianas, sendo ainda usado como carminativo e emenagogo (GROVER et al., 2002; RAMAN, LAU 1996).

Diversos fitoconstituintes já foram isolados a partir de *M. charantia*, como alcaloides, triterpenos, taninos, flavonoides, carboidratos e proteínas (ROOPASHREE et al., 2008). Esta herbácea possui um amplo espectro de propriedades, tais como hipoglicemiante (FERNANDES et al., 2007; TRIPATHI, CHANDRA 2009), antimicrobiana (ROOPASHREE et al., 2008; FARIA et al., 2009; COUTINHO et al., 2010f; MWAMBETE 2009; BRACA et al., 2008), antipsoriático (ROOPASHREE et al., 2008), citoprotetor-hepático (CHEN et al., 2010), antilipidêmico (NERURKAR et al., 2010; FERNANDES et al., 2007), anticarcinogênico (RAY et al., 2010; AGRAWAL, BEOHAR 2010), antileishmania (GUPTA et al., 2010), antiinflamatório (UMUKORO, ASHOROBI 2006), fototóxica (COUTINHO et al., 2010c) e antioxidante (TRIPATHI, CHANDRA 2009; THENMOZHI, SUBRAMANIAN 2010).



**Figura 8:** Foto de *Momordica charantia* (www.floridasnature.com)

### 3.4.4 Família Turneraceae DC.

A família Turneraceae possui 10 gêneros e cerca de 190 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo como principal centro de diversidade a América tropical (ARBO 2004).

#### 3.4.4.1 Gênero *Turnera*

O gênero *Turnera* L. é o mais representativo da família Turneraceae, com cerca de 120 espécies, distribuídas nas Américas e África (ARBO 2005). Espécies deste gênero são reconhecidas pelo hábito herbáceo a arbustivo. No Nordeste brasileiro são conhecidas pelo nome popular de “chanana”. Espécies como *Turnera difusa* e *T. ulmifolia* são utilizadas principalmente como afrodisíaco (ELISABETSKY et al., 1992), abortivo (WINKELMAN, 1989), no tratamento de úlceras gástricas (SOUZA et al., 2002) e do diabetes (BARBOSA-FILHO et al., 2005).

*Turnera ulmifolia* (Figura 9) é uma erva de pequeno porte que se encontra distribuída desde a Guiana até o sul do Brasil (PIO CORRÊA 1984; GRACIOSO et al., 2002). Tal erva tem sido muito utilizada na medicina tradicional por sua atividade antioxidante (NASCIMENTO et al., 2006), antiulcerogênica (GRACIOSO et al., 2002), antiinflamatória (ANTONIO, SOUZA BRITO 1998) e hipoglicemiante (ALARCON-AGUILARA et al., 1998), sendo alvo de diversos estudos. Um outro uso dessa planta, como expectorante e no tratamento de albuminúria, leucorreia, furunculose, asma e reumatismo foi identificado (PIO CORRÊA 1984; BRAGA 1976; HOSAMANI 1993). Dentre os componentes isolados desse vegetal podem ser citados alcaloides, taninos, flavonoides e fenois (ANTONIO, SOUZA BRITO 1998; NASCIMENTO et al., 2006; GRACIOSO et al., 2002).



**Figura 9:** Foto de *Turnera ulmifolia* – ([www.visoflora.com](http://www.visoflora.com))

# **MATERIAL E MÉTODOS**

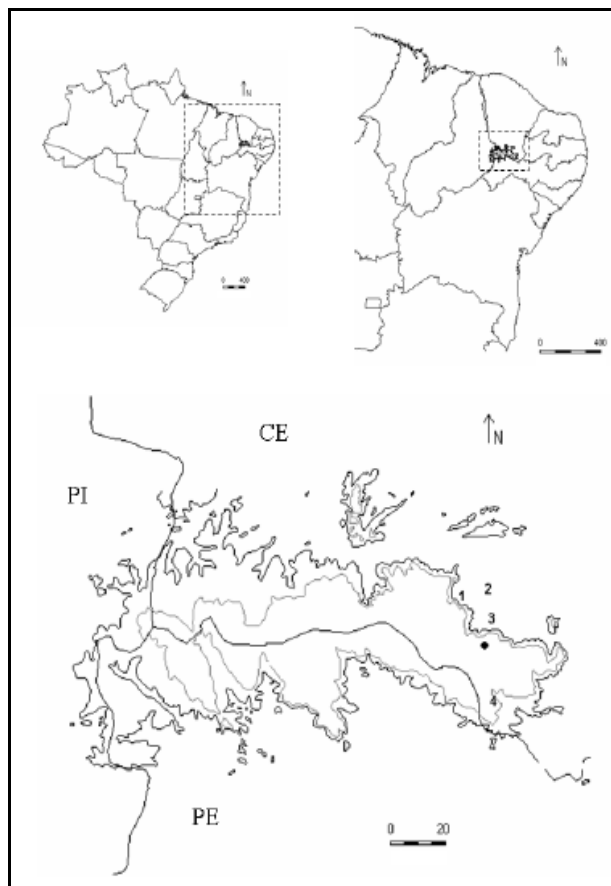
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção e coleta do material botânico

As plantas *Eugenia uniflora*, *E. jambolana*, *Hyptis martiusii*, *Mentha arvensis*, *Momordica charantia* e *Turnera ulmifolia* foram investigadas sobre a forma de extratos etanólicos, obtidos de suas folhas, com o objetivo de avaliar a atividade antiépimastigota, citotóxica e antifúngica destas amostras frente às linhagens de microrganismos patogênicos. As espécies vegetais foram coletadas em localidades do município do Crato, no Sul do estado do Ceará, conforme mapa demonstrado na Figura 10. O material botânico foi identificado pela Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva, curadora do Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, onde as exsicatas estão depositadas (Tabela 1). As plantas foram escolhidas devido ao seu uso intensivo na medicina tradicional das pequenas comunidades existentes na região do Cariri, mais especificamente, na encosta da Chapada do Araripe.

**Tabela 1** – Espécies, famílias botânicas, número das exsicatas e rendimento dos extratos que foram utilizados no estudo.

| ESPÉCIE                    | FAMÍLIA       | EXSICATA | RENDIMENTO |
|----------------------------|---------------|----------|------------|
| <i>Eugenia jambolana</i>   | Myrtaceae     | #3107    | 5-6 g      |
| <i>Eugenia uniflora</i>    | Myrtaceae     | #3106    | 5-6 g      |
| <i>Hyptis martiusii</i>    | Lamiaceae     | #464     | 5-6 g      |
| <i>Mentha arvensis</i>     | Lamiaceae     | #2886    | 5-6 g      |
| <i>Momordica charantia</i> | Cucurbitaceae | #703     | 5-6 g      |
| <i>Turnera ulmifolia</i>   | Turneraceae   | #1618    | 5-6 g      |



**Figura 10:** Mapa com a localização geográfica da área de estudo na chapada do Araripe e municípios próximos (1 - Crato, 2 - Juazeiro do Norte, 3 - Barbalha e 4 - Jardim). (COSTA, ARAÚJO 2007)

#### 4.2 Obtenção dos extratos alcoólicos

A obtenção dos extratos etanólicos foi realizada pela equipe de Pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob a coordenação do professor Dr. José Galberto Martins da Costa.

#### 4.3 Preparação dos extratos etanólicos de *Eugenia jambolana* (EEEJ), *Eugenia uniflora* (EEEU), *Hyptis martiusii* (EEHM), *Mentha arvensis* (EEMA), *Momordica charantia* (EEMC) e *Turnera ulmifolia* (EETU)

As folhas 200g foram desidratadas sem exposição à luz solar e pulverizadas à temperatura ambiente. O material pulverizado foi extraído por maceração, usando 1L de



etanol a 95% como solvente à temperatura ambiente. A mistura descansou por 72h à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo a vácuo sob 60°C de temperatura e 760mm/Hg de pressão (BRASILEIRO et al., 2006). Cada 200g de folhas obteve rendimento aproximado de 5-6g de extrato. Todos os extratos foram diluídos usando 1 mL de DMSO.

### **4.3 Preparo das soluções a partir do extrato**

#### **4.3.1 Preparo da solução inicial e das soluções de teste.**

O preparo da solução inicial das amostras foi efetuado da seguinte forma: 200 mg dos extratos foram solubilizados em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha), para obter uma concentração inicial de 200 mg/mL. A partir desta concentração, foi feita uma diluição 1:20 em água destilada estéril (10 mg/mL). Em seguida, uma nova diluição de 1:10 foi realizada em água destilada estéril para atingir a concentração de 1024 µg/mL (solução teste).

### **4.4 Linhagens celulares utilizadas**

Para estudos *in vitro* de *T. cruzi*, cepas de parasito CL-B5 (clone CL-B5) foram usados (BUCKNER et al., 1996). Os parasitos estavelmente transfectados com o gene  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* (LacZ) foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Buckner por meio do Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). Os epimastigotas foram cultivados a 28°C em infusão de fígado triptose (LIT) com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina como descrito anteriormente (LE SENNE et al., 2002), e colhidas durante a fase de crescimento exponencial.

Na avaliação *in vitro* da citotoxicidade foi utilizado linhagens de macrófagos J774. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640(Sigma) suplementado com 10% de FBS

inativado pelo calor (30 minutos a 56°C), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Para os experimentos, as células na fase pré-confluência foram colhidas com tripsina. As culturas celulares foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> umidificado. O procedimento para a medição da viabilidade celular foi avaliada com resazurina por um método colorimétrico descrito anteriormente (ROLÓN et al., 2006).

As cepas fúngicas utilizadas nos testes *in vitro* foram *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147, *C. tropicalis* ATCC 13803. As cepas foram obtidas da coleção de microrganismos do laboratório de Micologia da UFPB. Todas as linhagens foram mantidas em meio de Agar infusão de coração (HIA) (Difco), antes dos ensaios, as células foram crescidas por 24h a 37°C em infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco).

#### 4.5 Reagentes e Drogas

Resazurina sódica foi obtida a Sigma–Aldrich (St Louis, MO) e armazenada a 4°C protegida da luz. A solução de resazurina foi preparada em solução de fosfato 1% (PBS), pH 7, filtrada e esterilizada antes do uso. Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianápolis, IN) foi dissolvido em 0.9% Triton X- 100 (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Espanha), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Espanha). As drogas utilizadas como antifúngico foram Anfotericina B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazol (Figura 11) (Lasa – Indústria Farmacêutica LTDA., Brasil), Nistatina (Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Brasil) e Metronidazol (Figura 11) (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brasil). Todas as soluções foram preparadas de acordo com as recomendações do National committee for clinical laboratory standards – NCCLS (NCCLS 2003).

#### **4.6 Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi***

O ensaio de rastreamento foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços (Sarstedt, Sarstedt, Inc.) com culturas que não atingiram a fase estacionária, como descrito por VEGA et al., 2005. Epimastigotas foram semeadas a  $1 \times 10^5$  por mililitro em 200  $\mu\text{l}$ , as placas foram então incubadas com os extratos a 28°C por 72 horas, momento em que 50  $\mu\text{l}$  de solução CPRG foram adicionados para dar a concentração final de 200  $\mu\text{M}$ , as placas foram incubadas a 37°C por mais 6 h adicionais e então lidas a 595 nm em espectrofotômetro. O Nifurtimox foi utilizado como droga de referência. Cada concentração foi testada em triplicata. Cada experimento foi realizado duas vezes separadamente. O percentual de inibição (%AE) foi calculado como segue:  $\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \cdot 100$ , onde AE = absorvância do grupo experimental; AEB = branco de compostos; AC = grupo controle de absorvância; ACB = branco de meio de cultura. As soluções dos extratos a ser analisado foram preparados em dimetilsulfóxido, com a concentração final uma mistura água/DMSO jamais excedendo 0.2% do solvente final.

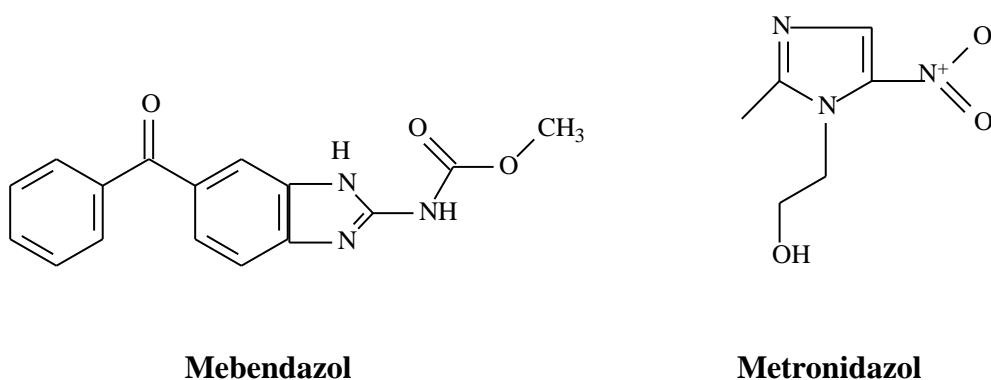
#### **4.7 Ensaio de citotoxicidade**

Macrófagos J774 foram semeados ( $5 \times 10^4$  células/ poço) em placas de microdiluição de fundo chato de 96 poços com 100  $\mu\text{l}$  de meio RPMI 1640. Deixou-se que as células pavimentassem as placas por 24h a 37°C e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio foi substituído por diferentes concentrações das drogas em 200  $\mu\text{l}$  de meio e, em seguida, foram incubados por mais 24h. Controles de crescimento também foram incluídos. Posteriormente, um volume de 20  $\mu\text{l}$  da solução 2mM de resazurina foi adicionado e as placas foram devolvidas à incubadora por outras 3h para avaliar a viabilidade celular. A redução da resazurina foi determinada por medida de absorvância do comprimento de onda a 490nm e 595nm. Cada concentração foi testada três vezes. Meio e drogas controle foram

usados em cada teste como brancos. A citotoxicidade de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de citotoxicidade (C%).

#### 4.8 Atividade antifúngica e modulação

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em BHI 10% pelo método de microdiluição em caldo, usando uma suspensão de  $10^5$  UFC/mL e concentrações dos extratos variando de 1024-8  $\mu\text{g/mL}$  (JAVADPOUR et al., 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano foi observado. Para a avaliação dos extratos como modificadores da resistência a antifúngicos, a concentração subinibitória (CIM/8) foi adicionado uma concentração da substância teste variando de 1024/0,5  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas por 24h a  $37^\circ\text{C}$  e então lidas visualmente.



**Figura 11:** Estruturas químicas de mebendazol e metronidazol.

#### 4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prisma 5.0. As medidas da concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), que representa a concentração da amostra necessária para matar 50% dos parasitas foram calculadas através da análise de regressão linear pelo

método dos mínimos quadrados plotando a porcentagem da atividade efetiva *versus* as concentrações dos extratos de cada amostra. A  $CE_{50}$  foi obtida pela resolução da equação (substituindo o valor de Y por 50) que é a concentração necessária para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para o extrato da planta (MENSOR, 2001).

# **RESULTADOS E** **DISCUSSÃO**

## LISTA DOS CAPÍTULOS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Capítulo 5.1</b> – Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of <i>Momordica charantia</i> – <b>Artigo aceito na Pharmaceutical Biology</b> _____   | 40  |
| <b>Capítulo 5.2</b> – Cytotoxic, tripanocide and antifungal activities of <i>Eugenia jambolana</i> L. – <b>Artigo aceito no Journal of Medicinal Food</b> _____  | 55  |
| <b>Capítulo 5.3</b> – Anti- <i>Candida</i> activity of <i>Mentha arvensis</i> and <i>Turnera ulmifolia</i> – <b>Artigo aceito no Journal of Medicinal Food</b> _____   | 69  |
| <b>Capítulo 5.4</b> – Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> and cytotoxic activities of <i>Eugenia uniflora</i> L. – <b>Artigo submetido na Experimental Parasitology</b> _____   | 77  |
| <b>Capítulo 5.5</b> – Anti- <i>Candida</i> , cytotoxic and modulatory activity of <i>Eugenia uniflora</i> L. – <b>Artigo submetido no Medical Mycology</b> _____   | 88  |
| <b>Capítulo 5.6</b> – Trypanocide, cytotoxic, and anti- <i>Candida</i> activities of <i>Hyptis martiusii</i> Benth. – <b>Artigo submetido no European Journal of Clinical Microbiology &amp; Infectious Diseases</b> _____ | 99  |
| <b>Capítulo 5.7</b> – Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma</i> e anti- <i>Leishmania</i> de <i>Mentha arvensis</i> e <i>Turnera ulmifolia</i> – <b>Artigo submetido na Revista Brasileira de Biociências</b> _____  | 114 |

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de atividade antiepipimastigota de *Trypanosoma cruzi* para os extratos etanólicos de *Eugenia jambolana*, *Eugenia uniflora*, *Hyptis martiusii*, *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. MESIA et al (2008) mostraram que *Momordica charantia* apresenta atividade contra *T. cruzi*, seu valor de EC<sub>50</sub> foi similar ao nosso ( $37 \pm 3.5$ ), indicando que esta planta apresenta atividade anti *T. cruzi* em formas sanguíneas. *E. jambolana* apresentou a melhor atividade na concentração de 100 µg/mL entre os extratos testados, porém, quando a concentração diminuiu para 10 µg/mL a atividade apresentou uma diminuição considerável. Observando os níveis de citotoxicidade de *E. jambolana* não houve grande modificação entre as concentrações de 100 e 10 µg/mL, pois os níveis continuaram moderados.

O extrato de *E.uniflora* apresentou um percentual de inibição de aproximadamente 80% na concentração de 100 µg/mL, quando a concentração da amostra caiu para 10 µg/mL a atividade foi maior que 50%, esse é um dado bastante relevante, pois a citotoxicidade que já era baixa em 100 µg/mL foi inexistente na concentração de 10 µg/mL. Esta atividade foi previamente relatada para a família Myrtaceae. *Siphoneugena densiflora* demonstrou um forte efeito contra *T. cruzi*, no entanto, seus compostos isolados não mostraram atividade similar (GALLO et al., 2008).

*H. martiusii* apresentou uma atividade semelhante nas concentrações de 100 e 10 µg/mL, mas a citotoxicidade também não apresentou grande redução quando passou de 100 para 10 µg/mL permanecendo em um nível moderado. *T. ulmifolia* e *M. arvensis* foram testadas em duas concentrações (500 e 100 µg/mL), *M. arvensis* apresentou um percentual de inibição próximo ou maior que 50% de inibição a uma concentração de 500 µg/mL, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 500µg/mL é considerado clinicamente relevante (ROSAS et al. 2007). No entanto, *M. arvensis* demonstrou um alto nível de citotoxicidade na concentração de 500 µg/mL. Outras espécies do gênero *Mentha* já foram testadas contra *T. cruzi*. *M. spicata* demonstrou atividade moderada e *M. piperita* foi inativa contra formas epimastigotas (ROJAS et al. 2007). *T. ulmifolia* não foi capaz de inibir 50% da amostra a uma concentração de 500 µg/mL e o nível de citotoxicidade nesta concentração foi considerado alto.



Os extratos vegetais possuem diversos fitoconstituintes, estes podem estar interagindo de forma a aumentar ou diminuir determinada atividade, além disso, existe uma grande diferença ao se testar determinada substância em modelos *in vitro* e *in vivo*. Todas as plantas utilizadas neste estudo possuem reconhecidas atividades biológicas e são rotineiramente usadas na medicina tradicional, esse fato sugere que testes de toxicidades devem ser realizados em modelos *in vivo*. Deste modo, novos testes devem ser realizados em modelos *in vivo* tanto com o extrato, quanto com frações e até mesmo substâncias isoladas dos mesmos.

O extrato de *M. charantia* não apresentou atividade clinicamente relevante quando testada contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, a Concentração Inibitória Mínima foi  $\geq 1024$ . No entanto, quando o extrato foi testado em uma concentração sub-inibitória com as drogas anfotericina B, mebendazol, nistatina e metronidazol apresentou um efeito modulatório para a droga metronidazol, diminui dois pontos da CIM da droga contra a cepa *C. tropicalis*. Este é o primeiro relato de potencialização da atividade da droga metronidazol combinado com o extrato de *M. charantia*. Esse efeito de potencialização de aminoglicosídeos já foi demonstrado pelo extrato de *M. charantia* contra bactérias multiresistentes (COUTINHO et al., 2010c,f).

A CIM de *E. jambolana* foi  $\geq 1024$ , esse dado não é considerando clinicamente relevante, porém quando o extrato foi testado em uma concentração sub-inibitória com a droga metronidazol foi capaz de diminuir em dois pontos a CIM da droga para a cepa *C. albicans*. BRAGA et al (2007) avaliou o extrato metanólico de *E. jambolana* contra as leveduras *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, o extrato apresentou atividade antimicrobiana de relevância clínica somente contra *C. neoformans*, demonstrado uma CIM de 78 $\mu$ g/mL. A atividade potencializadora de aminoglicosídeos já foi demonstrada pelo extrato de *E. jambolana* contra bactérias multiresistentes (COUTINHO et al., 2009a; 2010a,b).

O extrato etanólico de *E. uniflora* apresentou uma CIM  $\geq 1024$ . No entanto, quando o extrato foi testado em uma concentração sub-inibitória com a droga metronidazol foi capaz de diminuir em dois pontos a CIM da droga para a cepa *C. tropicalis*. HOLETZ et al (2002) testou *E. uniflora* contra as leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, e demonstrou atividade de relevância clínica contra estas cepas, exceto para *C. albicans*. Outros estudos utilizando o óleo essencial de *E. uniflora* demonstraram atividade

contra dermatófitos (LIMA et al., 1993). Estes resultados poderiam indicar que os fitoconstituintes extraídos com etanol não demonstram atividade contra as cepas testadas. Este é o primeiro relato de potencialização de uma droga antifúngica quando combinada com o extrato de *E. uniflora*. A atividade potencializadora de aminoglicosídeos já foi demonstrada pelo extrato de *E. uniflora* contra bactérias multiresistentes (COUTINHO et al., 2010b,c)

Este é o primeiro relato de atividade e potencialização da atividade de uma droga antifúngica combinada com um extrato de *H. martiusii*. A atividade potencializadora de aminoglicosídeos já foi demonstrada pelo extrato de *H. martiusii* contra bactérias multiresistentes (COUTINHO et al., 2008a, 2009a,d,e).

Os extratos de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* não mostraram atividade antifúngica contra as cepas de leveduras testadas, apresentando a CIM  $\geq 1024$ . Nenhum efeito modulatório foi observado para os antifúngicos anfotericina B e nistatina, pois a CIM permaneceu a mesma que o controle feito apenas com os antifúngicos. A potencialização da atividade antifúngica contra *C. tropicalis* foi demonstrado com metronidazol, quando combinado com *M. arvensis* e *T. ulmifolia*. A atividade potencializadora de aminoglicosídeos já foi demonstrada pelos extratos de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* contra bactérias multiresistentes (COUTINHO et al., 2009b; 2010c).

Os extratos de várias plantas, tais como *Himatanthus articulatus* (SEQUEIRA et al., 2009), *Mentha longifolia* (AL-BAYATI 2009), *Malva sylvestris* e *Psidium guajava* (ALVES et al., 2009), foram testados contra leveduras do gênero *Candida* e representam uma alternativa na busca de um tratamento para candidose.

Muitas pesquisas têm abordado a utilização combinada de drogas, seja sintética ou de origem vegetal, essa nova abordagem tem sido útil no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes. Estudos com extratos de plantas têm mostrado uma interessante atividade quando combinada a antimicrobianos atualmente utilizados, aumentando a sensibilidade do microrganismo resistente à determinada droga.

Dentro dessa perspectiva, novos ensaios *in vivo* devem ser realizados com frações e substâncias isoladas a partir dos extratos que mostraram o menor efeito tóxico e maior

atividade, além de avaliar essa atividade isolada deste material é interessante utilizar associações com as drogas utilizadas na quimioterapia específica da doença de Chagas.

## 5.1 Atividades tripanocida, citotóxica e antifúngica de *Momordica charantia*

### RESUMO

*Contexto:* A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, é considerada um problema de saúde pública. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível para esta doença, e os medicamentos usados atualmente, nifurtimox e benzonidazol apresentam níveis elevados de toxicidade. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), utilizada na medicina tradicional devido as suas atividades antimicrobianas e biológicas

*Objetivo:* Neste estudo, o extrato de *Momordica charantia* foi avaliado quanto à atividade antiepipimastigota, antifúngica e citotóxica.

*Material e métodos:* O extarto etanólico das folhas de *M. charantia* foi preparado. Para a pesquisa da atividade antiepipimastigota *in vitro*, *T. cruzi* clone CL-B5 foi usado. Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em 200  $\mu$ l de infusão de fígado e triptose. Para o ensaio de citotoxicidade macrófagos J774 foram usados. A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de microdiluição usando as cepas *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

*Resultados:* A concentração eficiente capaz de matar 50% dos parasitas (IC<sub>50</sub>) foi 46,06  $\mu$ g/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) foi  $\geq 1024$   $\mu$ g/mL. Metronidazol mostrou uma potencialização do seu efeito antifúngico quando combinado com o extrato de *M. charantia*.

*Conclusão:* Nossos resultados indicam que *M. charantia* poderia ser uma fonte de produtos naturais derivados de plantas com atividade antiepipimastigota, e moduladora de antifúngicos com toxicidade moderada.

Palavras-chave: Doença de Chagas, atividade antiepipimastigota, atividade moduladora, *Candida* spp

**Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia***

Karla K.A. Santos<sup>1</sup>, Edinaldo F.F. Matias<sup>1</sup>, Celestina E. Sobral-Souza<sup>1</sup>, Saulo R. Tintino<sup>1</sup>, Maria F.B. Morais-Braga<sup>1</sup>, Glaucia M.M. Guedes<sup>1</sup>, Francisco A.V. Santos<sup>1</sup>, Ana Carla A. Sousa<sup>1</sup>, Mirian Rolón<sup>2</sup>, Celeste Vega<sup>2</sup>, Antonieta R. Arias<sup>2</sup>, José G.M. Costa<sup>3</sup>, Irwin R.A. Menezes<sup>4</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>2</sup>Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\*Corresponding author:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## Abstract

*Context:* Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered a public health problem. Currently, chemotherapy is the only available treatment for this disease, and the drugs currently used, nifurtimox and benznidazol present high toxicity levels. An alternative for replacing these drugs are natural extracts from *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), used in traditional medicine due to their antimicrobial and biological activities.

*Objective:* In this study the extract of *Momordica charantia* we evaluated for its antiepipimastigote, antifungal and cytotoxic activities.

*Materials and methods:* An ethanol extract of leaves from *M. charantia* was prepared. To research *in vitro* antiepipimastigote activity, *T. cruzi* CL-B5 clone was used. Epimastigotes were inoculated at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL in 200  $\mu$ l triptose-liver infusion. For the cytotoxicity assay J774 macrophages were used. The antifungal activity was evaluated by microdilution using strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*.

*Results:* The effective concentration capable of killing 50% of parasites (IC<sub>50</sub>) was 46.06  $\mu$ g/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) was  $\leq 1024$   $\mu$ g/mL. Metronidazole shown a potentiation of its antifungal effect when combined with extract of *M. charantia*.

*Conclusion:* Our results indicate that *M. charantia* could be a source of plant-derived natural products with antiepipimastigote and antifungal modifying activity with moderate toxicity.

**Keywords:** Chagas disease, antiepipimastigote activity, modifying activity, *Candida* spp.

## Introduction

Developing countries with abundant traditional knowledge and rich biodiversity, as in the case of Brazil, still grapple with a high incidence of so-called “neglected diseases,”

such as tuberculosis, malaria and Chagas disease (Funari & Ferro, 2005), diseases with the potential to be treated with natural products of plant origin. Brazil has the largest biodiversity in the world, with more than 55,000 species of plants catalogued, out of an estimated total of 550,000 species (Elisabetsky & Costa-Campos), but only 8% have been studied in the search for bioactive compounds (Garcia et al., 1996).

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas (Reyes-Chilpa et al., 2008). The parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods contaminated their feces, blood transfusion or organ transplants from infected donors and the transplacental route from a contaminated mother to her newborn (WHO, 2010). Currently, chemotherapy is the only treatment available for this disease, where the most utilized drugs are nifurtimox and benznidazol (WHO, 2010), which show a 50-70% cure rate in the acute phase and less than 20% in the chronic phase (Dias & Desso, 2009). Various studies involving the analysis of plant extracts have revealed an alternative source with potential against *T. cruzi*, for example, extracts of *Arrabidaea triplinervia* (Mart. ex DC.) Baill. (Bignoniaceae) (Leite et al., 2006), *Dracocephalum kotschy* (Saeidnia et al., 2004) and *Azorella compacta* Phil. (Apiaceae) (Araya et al., 2003).

The evaluation of the toxicity of active substances is one of the first steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized for Chagas disease show a high toxicity because the metabolites produced affect host tissues due to their high reactivity (Dias & Desso, 2009).

Candidiasis or candidosis is the most frequent infection by opportunistic fungi, where the species commonly implicated in the clinical picture are: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The spectrum of candidiasis is very extensive, going from mild manifestations, such as a colonization of mucosal tissues, up to systemic pictures, with the invasion of various organs (Coutinho, 2009a). These yeasts are part of the normal microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression induced by severe stress (Dignani et al., 2003). A variety of extracts have been extensively studied in the search for alternative treatments for these opportunistic infections, as in the case of *Himatanthus articulatus* (Vahl) R. E. Woodson (Apocynaceae) (Sequeira et al., 2009),

*Mentha longifolia* (L.) Huds. (Labiatae) (Al-Bayati, 2009), *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) and *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) (Alves et al., 2009).

*Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), is a herb popularly known in the Brazil as “melão-de-São-Caetano”. This plant is commonly found in other tropical areas of Asia, America and Africa. Several flavonoids with pharmacological and biological activities have been identified in *M. charantia* (Grover & Yadav, 2004; Coutinho et al., 2009b,c). *M. charantia*, it has been well studied because of its potential as an antioxidant (Coutinho et al., 2010a), antimicrobial (Roopashree et al., 2008; Faria et al., 2009), antidiabetic and antilipidemic (Fernandes et al., 2007), immunomodulatory activity (Juvekar et al., 2009), antiinflammatory (Umukoro & Ashorobi, 2006).

Therefore, due to the social and economic importance of Chagas’ disease and the increase in the number of individuals with immunodeficiency, such as in the case of seropositives, we evaluated here the antiepipimastigote, antifungal and cytotoxic activities of *Momordica charantia*.

## Methods

### *Plant material*

Leaves of *M. charantia* were collected in the rainy season (April, 2008) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dra. Arlene Pessoa, and voucher specimen have been deposited with the identification number 703 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of Universidade Regional do Cariri – URCA.

### *Preparation of ethanol extract of Momordica charantia (EEMC)*

Leaves (200 g) were dried with no sunlight exposition and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L at 95% as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760 mm/Hg of temperature and pressure, respectively (Brasileiro et al., 2006). Each 200 g of aerial parts yield 5-6 g of extract. The EEMC was diluted using DMSO.



### ***Cell strains used***

For *in vitro* studies of *T. cruzi*, the clone CL-B5 was used (Buckner et al., 1996). The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr F. Buckner through Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). Epimastigotes were grown at 28°C in liver infusion tryptose broth (Difco, Detroit, MI) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain) and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described previously (Le Senne et al., 2002), and harvested during the exponential growth phase. Murine J774 macrophages were grown in plastic 25  $\mu$ l flasks in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 20 % heat inactivated (30 min, 56°C) fetal bovine serum (FBS) and penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C and subpassaged once a week. For the experiments, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The procedure for cell viability measurement was evaluated with resazurin by a colorimetric method described previously (Rolón et al., 2006). The fungal strains utilized were *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The strains were obtained from the collection of microorganisms, Mycology Laboratory, UFPB. All strains were maintained in heart infusion agar slants (HIA; Difco), and before the assays, the cells were grown for 24 h at 37°C in brain heart infusion (BHI, Difco).

### ***Reagents***

Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and stored at 4°C protected from light. A solution of resazurin was prepared in 1% phosphatebuffered solution (PBS), pH 7, and filter sterilised prior to use. Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain). The antifungal drugs used were amphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nistatin (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) e metronidazole (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). All solutions were prepared following the recommendations of National committee for clinical laboratory standards - NCCLS (NCCLS, 2008).

### ***Epimastigote susceptibility assay***

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase, as described (Vega et al., 2005). Briefly, epimastigotes were seeded at  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in 200  $\mu\text{L}$  of liver tryptose broth medium. The plates were then incubated with the drugs (0.1-50  $\mu\text{g/mL}$ ) at 28°C for 72 h, at which time 50  $\mu\text{L}$  of CPRG solution was added to give a final concentration of 200  $\mu\text{M}$ . The plates were incubated at 37°C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Nifurtimox was used as the reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the antiepimatigote percentual (AE%).

### ***Cytotoxicity assays***

Macrophages J774 were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100  $\mu\text{L}$  of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  and the medium was replaced by different concentrations of the drugs in 200  $\mu\text{L}$  of medium, and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. Afterwards, a volume 20  $\mu\text{L}$  the 2 mM resazurin solution was added and plates were returned to incubator for another 3 h to evaluate cell viability. The reduction of resazurin was determined by dual wavelength absorbance measurement at 490 nm and 595 nm. Background was subtracted. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test as blanks. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentile (C%).

### ***Antifungal and modulatory activity***

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in 10% BHI by the microdilution method, using a suspension of  $10^5$  CFU/ml and an extract concentration of 1024-8  $\mu\text{g/ml}$  (NCCLS, 2008). MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. For the evaluation of the extracts as modifiers of resistance to antifungals, a subinhibitory concentration (MIC/8) was added to a concentration of the test substance varying 1024-0.5  $\mu\text{g/ml}$ . The plates were incubated for 24 h at 37°C.

### ***Statistical analysis***

The statistical analysis was realized using Prism program 5.0. The groups were compared using two-way ANOVA, with Bonferroni analysis. The effective concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated by the linear regression method.

### **Results**

The trypanocidal activity of EEMC is shown in Table 1. The results demonstrated that there was activity against the strain CL of *T. cruzi*, showing 81.33% inhibition at a concentration of 100 µg/mL and an IC<sub>50</sub> = 46.06 µg/mL, which was quite impressive since an EC<sub>50</sub> less than 500 µg/mL is considered clinically relevant (Rosas et al., 2007). J774 macrophages were utilized to evaluate the cytotoxicity and the results are presented in Table 1. A toxicity of 25% was observed at a concentration of 100 µg/mL and toxicity was reduced to 16% with 10 µg/mL.

The antifungal activity of EEMC is shown Table 2. The minimal inhibitory concentration was  $\geq 1024$  µg/mL, which did not demonstrate activity of clinical relevance with respect to the yeast strains tested (Houghton et al., 2007). No modulatory effect was observed with respect to amphotericin B, nystatin and mebendazole, because MIC was the same as the control with only the antifungals. Potentiation of antifungal activity against *C. tropicalis* was demonstrated with metronidazole when combined with EEMC, where MIC was reduced to 32 µg/mL.

### **Discussion**

Mesia et al. (2008) showed the activity of *M. charantia* against *T. cruzi*. The IC values on this work were similar to ours (IC<sub>50</sub> 37 ± 3.5), indicating the trypanocide activity of this plant. About the cytotoxic activity, our extract presented a toxic effect higher than the observed on the work of Mesia et al. (2008). This may be due the different experimental and geographic conditions between these works. Other plants of the Brazilian flora have shown substantial trypanocidal activity, such as extracts and fractions of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a native plant of the Amazon forest, containing compounds with potential for use as a prophylactic agent against the parasite (Rosas et al., 2007). The ethyl acetate fraction of the aqueous extract

of leaves of *Camellia sinensis* L. (Theaceae) and the principal components of this fraction (catechins) demonstrated a trypanocidal effect against trypomastigote and amastigote forms (Paveto et al., 2004). Trypanocidal activity has been reported in native plants of Iran, such as *Dracocephalum komarovi* Lipsky (Lamiaceae) (Saeidnia et al., 2004), and of Asian countries, such as *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae) (Kiuchi et al., 2004). Studies involving the analysis of extracts of other plants have also revealed a potential effect against *T. cruzi*, for example, extracts of *Arrabidaea triplinervia* (Mart. ex DC.) Baill. (Bignoniaceae) (Leite et al., 2006) and *Azorella compacta* Phil. (Apiaceae) (Araya et al., 2003).

An important criterion in the search for active compounds with trypanocidal activity is its toxicity toward mammalian host cells. The macrophage strain J774 is often utilized as a cytotoxicity indicator due to their phagocytic capacity. *M. charantia* showed moderate and low toxicities using 100 µg and 10 µg of the extract, respectively in the J774 macrophages (Table 1). This result indicates the necessity of new experiments *in vivo* to determine the effect of this toxicity in a living system.

The cytotoxic activity of other plants has been evaluated in different human cell models, such as: compounds isolated from *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), tested in human lymphocytes (Reyes-Chilpa et al., 2008); extracts and fractions of *Capparis spinosa* L. (Capparaceae), *Kleinia odora* (Forssk)DC (Asteraceae) and *Psidia punctulata* (DC.) Oliv. & Hiern ex Vatke. (Compositae), tested in MRC-5 cells (Abdel-Sattar et al., 2010); and neolignans such as licarin A and burchellin, evaluated in peritoneal macrophages (Cabral et al., 2010). The extract of *Momordica charantia* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the moderate level of toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

There are reports about the antifungal activity against *Candida albicans* of *Himatanthus articulatus* (Sequeira et al., 2009), *Mentha longifolia* (Al-Bayati, 2009), *Malva sylvestris* and *Psidium guajava* (Alves et al., 2009), using disk diffusion method (Mwambete, 2009), representing an alternative in the treatment of candidosis. However, this is the first report of potentiation of the activity of an antifungal drug combined with a *M. charantia* extract. The potentiating effect of the extracts of *M. charantia* and of other plants has been demonstrated against bacteria showing multidrug resistance with

respect to antibiotics (Coutinho et al., 2009b, c, d, e; 2010b, c, d). This strategy is called "herbal shotgun" or " synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible (Coutinho et al., 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

Our results indicate that *Momordica charantia* could be a source of plant-derived natural products with antiepipimastigote and antifungal- modifying activity with moderate toxicity, representing an interesting alternative in efforts to combat infectious diseases such as candidiasis and Chagas disease.

## References

- Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM (2010): *In vitro* activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytother Res* 24: 1-9.
- Al-Bayati FA (2009): Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8: 1-6.
- Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV (2009): *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 222-224.
- Araya JE, Neira I, Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G, González J (2003): Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 413-418.
- Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D (2006): Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Cienc Farm* 42: 195-202.

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC (1996): Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2592-2597.

Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares RO (2010): Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 124: 319-324.

Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2008): Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 54: 328-330.

Coutinho HDM (2009a): Factors influencing the virulence of *Candida Spp.* *West Indian Med J* 58: 160-163.

Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO (2009b): Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: 467-471.

Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Júnior JP (2009c): *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. *Pharm Biol* 47: 1056-1059.

Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2009d): Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo* 23: 287-289.

Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP (2009e): Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med* 9: 1-4.

Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Jr JP, Lima EO (2010a): *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. *R Bras Bioci* 8: 299-301.

Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO (2010b): Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food* 13:1024-1026.

Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO (2010c): *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Biol* 48: 1002-1006.

Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-JR JP (2010d): Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 131: 106-108.

Dias LC, Dessoay MA (2009): Chemotherapy of Chagas disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova* 32: 2444-2457.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E (2003). Candida. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Medical Mycology*. Philadelphia, Churchill Livingstone p. 195-239.

Elisabetsky E, Costa-Campos L (1996): Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J Ethnopharmacol* 51: 110-120.

Faria FA, Bueno CJ, Papa MFS (2009): Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Acta Scient Agr* 31: 383-389.

Fernandes NPC, Lagishetty CV, Panda VS, Naik SR (2007): An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized *Momordica charantia* fruit extract. *BMC Complement Altern Med* 7: 1-8.

Funari CS, Ferro VO (2005): Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacogn* 15: 178-182.

Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Corrêa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR (1996). Fitoterápicos. In: Tosello A, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Campinas, Editora da UFSC, p. 17.

Grover JK, Yadav SP (2004): Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review. *J Ethnopharmacol* 93: 123-132.

Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G (2007): Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 110: 391-400.

Juvekar AR, Hule AK, Sakat SS, Chaughule VA (2009): *In vitro* and *in vivo* evaluation of immunomodulatory activity of methanol extract of *Momordica charantia* fruits. *Drug Invent today* 1: 89-94.

Kiuchi F, Matsio K, Ito M, Qui TK, Honda G (2004): New norditerpenoids with Trypanocidal activity from *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull* 52: 1492-1494.

Leite JPV, Oliveira AB, Lombardi JA, Filho JDS, Chiari E (2006): Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol Pharm Bull* 29: 2307-2309.

Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JA, Gómez-Barrio A (2002): Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1101-1105.

Mesia GK, Tona GL, Nanga TH, Cimanga RK, Apers S, Cos P, Maes L, Pieters L, Vlietinck AJ (2008): Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 115: 409-415.

Mwambete KD (2009): The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: A Tanzania medicinal plant. *Afr Health Sci* 9: 34-39.

NCCLS (2008): *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*: ninth

Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, pp 120-126.

Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN (2004): Anti-trypanosoma cruzi activity of Green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 69-79.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S (2008): Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 431-436.

Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, Veja C, Marrero-Ponce Y, Huguaburu V, Yaluff G, Gómez-Barrio A, Sanabria L, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Pandolfi E (2008): Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. *Eur J Med Chem* 43: 1797-1807.

Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, Malpartida F (2006): Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 28: 104-109.



Roopashree TS, Dang R, Shobha Rani RH, Narendra C (2008): Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *Int J Appl Res Nat Prod* 1: 20-28.

Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, Nomizo A, Toldo MP, Albuquerque S, Pereira PS (2007): *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res* 40: 663-670.

Saeidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F (2004): Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Biol Pharm Bull* 52: 1249-1250.

Sequeira BJ, Vital MJS, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GSB (2009): Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 659-661.

Umukoro S, Ashorobi RB (2006): Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. *Afr J Biomed Res* 9: 119 -124.

Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A (2005): A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res* 95: 296-298.

Wagner H, Ulrich-Merzenich G (2009): Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16: 97-110.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340 (2010). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Located: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> accessed: September 2010.

**Table 1:**

Percent of anti-*Trypanosoma* activity induced by extracts of *Momordica charantia* against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strain

| Extract    | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | %AE   | %SD  | % C | IC <sub>50</sub> |
|------------|---------------------------------------|-------|------|-----|------------------|
| EEMC       | 100                                   | 81,33 | 0,25 | 25  | 46,06            |
|            | 10                                    | 37,15 | 0,56 | 16  |                  |
|            | 1                                     | 2,46  | 0,75 | 10  |                  |
| Nifurtimox | 10                                    | 89,1  | 3,3  | -   | 0,91             |
|            | 1                                     | 54,9  | 0,7  | -   |                  |
|            | 0,5                                   | 45,6  | 4,2  | -   |                  |

%AE – anti-epimastigote activity, %SD – standard deviation, % C – cytotoxic activity, IC<sub>50</sub> – concentration of extract needed to necessary to inhibit 50% of the cell concentration.

**Table 2:**

Antifungal and modulation activity of *Momordica charantia* against the yeast strains of *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

| Extract/antifungal | <i>C. albicans</i> |             | <i>C.krusei</i> |             | <i>C.tropicalis</i> |             |
|--------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------|
|                    | alone              | +EEMC       | alone           | +EEMC       | alone               | +EEMC       |
| EEMC               | $\geq 1024$        | -           | $\geq 1024$     | -           | $\geq 1024$         | -           |
| Amphotericin B     | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Mebendazole        | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Nystatin           | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Metronidazole      | 64                 | 64          | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | 128                 | 32          |

## 5.2 Atividades citotóxica, tripanocida e antifúngica de *Eugenia jambolana* L.

### RESUMO

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, é considerada um problema de saúde pública. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível para esta doença, e os medicamentos usados atualmente, nifurtimox e benzonidazol apresentam níveis elevados de toxicidade. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Eugenia jambolana*, planta utilizada na medicina tradicional devido as suas atividades antimicrobianas e biológicas. O extrato etanólico das folhas de *E. jambolana* foi preparado. Para a pesquisa da atividade antiepipimastigota *in vitro*, *T. cruzi* clone CL-B5 foi usado. Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL<sup>-1</sup> em 200 µl de infusão de fígado e triptose. Para o ensaio de citotoxicidade macrófagos J774 foram usados. Para a atividade antifúngica, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram utilizados. Este é o primeiro relato de atividade tripanocida para *E. jambolana*. A concentração eficiente capaz de matar 50% dos parasitas (EC<sub>50</sub>) foi 56,42 µg/mL. A CIM - concentração inibitória mínima foi  $\geq 1024$ . Metronidazol mostrou uma potencialização do seu efeito antifúngico quando combinado com o extrato etanólico de *E. jambolana*. Nossos resultados indicam que *E. jambolana* poderia ser uma fonte de produtos naturais derivados de plantas com atividade antiepipimastigota, e moduladora de antifúngicos com toxicidade moderada.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Eugenia jambolana*, atividade antiepipimastigota, citotoxicidade, atividade antifúngica, atividade moduladora

**Cytotoxic, tripanocide and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L.**

Karla KA Santos<sup>1\*</sup>, Edinaldo FF Matias<sup>1</sup>, Saulo R Tintino<sup>1</sup>, Celestina ES Souza<sup>1</sup>, Maria FBM Braga<sup>1</sup>, Gláucia MM Guedes<sup>1</sup>, Miriam Rolón<sup>2</sup>, Celeste Vega<sup>2</sup>, Antonieta Rojas de Arias<sup>2</sup>, José GM Costa<sup>3</sup>, Irwin A Menezes<sup>4</sup>, Henrique DM Coutinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>2</sup>Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Karla Katiúcia Alves dos Santos.

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.

E-mail: [katiucia\\_santos@hotmail.com](mailto:katiucia_santos@hotmail.com)

## ABSTRACT

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered a public health problem. Nowadays, chemotherapy is the only available treatment for this disease, and the drugs currently used, nifurtimox and benznidazol present high toxicity levels. An alternative for replacing these drugs are natural extracts from *Eugenia jambolana*, plant used in traditional medicine due to their antimicrobial and biological activities. An ethanolic extract from *E. jambolana* was prepared. To research *in vitro* antiepipimastigote activity, *T. cruzi* CL-B5 clone was used. Epimastigotes were inoculated at a  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> concentration in 200µl triptose-liver infusion. For the citotoxicity assay J774 macrophages were used. For the antifungal activity, *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *c. krusei* were used. This is the first record of tripanocide activity for *E. jambolana*. Effective concentration capable of killing 50% of parasites (CE50) was 56,42 µg/mL. The MIC – minimum inhibitory concentration was  $\leq 1024$ . Metronidazole showed a potentiation of its antifungal effect when combined with ethanol extract of *E. jambolana*. Our results indicate that *E. jambolana* could be a source of plant-derived natural products with antiepipimastigote and antifungic modifying activity with moderate toxicity.

**Keywords:** Chagas' disease, *Eugenia jambolana*, antiepipimastigote activity, citotoxicity, antifungal activity, modifying activity.

## Introduction

Developing countries with traditional use of the biodiversity as medicine, including Brazil, still suffer with the so-called “neglected diseases,” such as tuberculosis, malaria and Chagas disease<sup>1</sup>, which are treated by traditional communities with plant natural products. Brazil features the largest biodiversity in the world<sup>2</sup>, however only 8% have been studied in search for bioactive compounds<sup>3</sup>.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas<sup>4</sup>. This parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods, blood and organs from infected donors, or by transplacental contamination<sup>5</sup>. Currently,

the chemotherapy of this disease consists mainly of nifurtimox and benznidazole<sup>5</sup>, which show a cure rate of 70-50% in the acute phase and less than 20% in the chronic phase<sup>6</sup>. Several studies involving the analysis of natural plant products have recommended them as alternative sources of drugs against *T. cruzi*, including *Arrabidaea triplinervia*, *Dracocephalum kotschyi* and *Azorella compacta*<sup>7-9</sup>.

The evaluation of the toxicity of active substances is one of the first steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized for Chagas' disease show a high toxicity because the metabolites produced affect host tissues due to their high reactivity<sup>6</sup>.

Candidiasis is the most frequent infection caused by opportunistic fungi. The main species associated with this disease are *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The clinical features of candidiasis are quite diverse, varying between mucosal colonization to the invasion of several internal organs<sup>10</sup>. These yeasts remain in the microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression<sup>11</sup>. Several natural products have been studied extensively in the search for alternative treatments for these fungi, including *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava*<sup>12-14</sup>.

*Eugenia jambolana* (Myrtaceae), known in Brazil as “jambolão” and “oliva”, presents several scientific synonyms as *Syzygium cumini* and *S. jambolanum*<sup>15</sup>. This plant is used as a food and in the traditional medicine due its biological properties<sup>16,17</sup>. Natural products of *E. jambolana* show biological activities reported in the literature: hipoglicemic<sup>18</sup>, hepatoprotective<sup>19</sup>, antiulcer<sup>20</sup>, antinematode<sup>21</sup>, phototoxic<sup>22</sup>, antibacterial<sup>23</sup>, modulatory of antibiotic activity<sup>24</sup> and antioxidant activity<sup>25</sup>. Many compounds from the leaves of *E. jambolana* were isolated, as alkaloids, tannins, phlobatannins, triterpenes and saponins<sup>26</sup>.

*Eugenia jambolana* is used in the phytotherapy as dry or hydroethanol extract<sup>27</sup>. These natural products are indicated against diarrhea and show anti-inflammatory, adstringent, carminative and hypoglycemic activities<sup>27</sup>. Besides its use by the traditional medicine, the “jambolão” is very consumed in several forms as pies, drinks, juices and wine<sup>28</sup>.

Thus, due to the social and economic importance of Chagas disease and candidiasis as neglected diseases and the medicinal use of this fruit in ethnomedicine, this work evaluated the anti-*Trypanosoma*, antifungal and cytotoxic activities of *Eugenia jambolana*.

## Materials and methods

### *Plant material*

Leaves of *E. jambolana* were collected in the rainy season (April, 2008) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dra. Arlene Pessoa, and voucher specimen have been deposited with the identification number 3107 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of Universidade Regional do Cariri – URCA.

### *Preparation of Ethanol Extract of Eugenia jambolana (EEEJ)*

200 g of leaves were dried with no sunlight exposition and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively<sup>29</sup>. Each 200 g of aerial parts yield 5 - 6 g of extract. The EEEJ was diluted using DMSO.

### *Cell strains used*

For in vitro studies of *T. cruzi*, the clone CL-B5 was used<sup>30</sup>. The parasites transfected with the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr F. Buckner through Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). The epimastigotes were cultivated at 28°C in Liver Infusion Tryptose broth (Difco, Detroit, MI), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain) and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described previously<sup>31</sup>, and harvested during the exponential growth phase.

Murine J774 macrophages were used to evaluate the cytotoxic potential of the extract. This cell strain was grown in plastic 25 µl flasks with RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), heat inactivated (30 min, 56°C), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) in a humidified, with 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C. For the assay, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin and kept at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cell viability measurement was a colorimetric method using resazurin as described previously<sup>32</sup>.

The fungic strains utilized in the assays were *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The strains were obtained from the Clinical Mycology Laboratory, UFPB, Brazil. All strains were maintained in Heart Infusion Agar slants (HIA; Difco), and prior to the assays, the cells were grown for 24 h at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI, Difco).

### *Reagents*

Resazurin sodium salt was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and stored at 4°C protected from light. The resazurin solution was prepared using 1% phosphate buffered solution (PBS), pH 7, and sterilized by filtration prior to use. Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN, USA) was dissolved in 0.9% Triton X- 100 (pH 7.4). The solutions of antibiotics Penicillin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) and the antifungal drugs Amphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nystatin (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) and Metronidazole (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil) were prepared following the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS<sup>33</sup>.

### *Epimastigote susceptibility assay*

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase, as described<sup>34</sup>. Briefly, epimastigotes were seeded at 1 x 10<sup>5</sup>/ mL in 200µL of Liver Tryptose Broth medium. The plates were incubated with the drugs in concentrations ranging between 0.1-50 µg/mL, at 28°C for 72 h, at which



time 50  $\mu\text{L}$  of CPRG solution was added to reach a final concentration of 200  $\mu\text{M}$ . The plates were incubated at 37°C for 6 h and were evaluated using a spectrophotometer at 595 nm. Nifurtimox was used as the reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the anti-epimastigote percentage (AE%).

#### *Cytotoxicity assays*

J774 macrophages were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100  $\mu\text{l}$  of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h in a humidified, with 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere at 37°C. The medium was replaced by 200  $\mu\text{l}$  of medium with different concentrations of the drugs and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. Next, 20  $\mu\text{l}$  of resazurin solution with 2 mM were added and the plates were returned to the incubator for another 3 h. Resazurin reduction was determined by dual wavelength absorbance measurements at 490 and 595 nm, respectively. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentage (C%).

#### *Antifungal and modulatory activity*

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using 10% BHI by the microdilution method and suspensions with  $10^5$  CFU/ml and an extract concentration ranging between 1024-8  $\mu\text{g/ml}$ <sup>35</sup>. MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. For evaluation of the extracts as modulators of resistance to antifungals, a subinhibitory concentration (MIC/8) was mixed with the antifungal drug assayed, in which the concentration varied between 1024-0.5  $\mu\text{g/ml}$ . The plates were incubated for 24 h at 37°C.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis was realized using Prism program 5.0. The effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was calculated by the linear regression method.

## Results and discussion

### *T. cruzi* epimastigote susceptibility assay

The trypanocidal activity of EEEJ is shown in Table 1. The results demonstrated that there was activity against the strain CL of *T. cruzi*, showing 100% inhibition at a concentration of 100 µg/mL and an EC<sub>50</sub> = 56,42 µg/mL, which was quite impressive due the fact that EC<sub>50</sub> lower than 500 µg/mL is considered clinically relevant<sup>36</sup>.

This is the first report of trypanocidal activity for *E. jambolana*. This activity was previously reported for the family Myrtaceae. *Siphoneugena densiflora* showed a strong effect against *T. cruzi*; however, its isolated compounds did not show similar activity<sup>37</sup>. Other plants of the Brazilian flora have shown substantial trypanocidal activity, such as *Ampelozizyphus amazonicus*, a plant native to the Amazon forest, containing compounds with potential for use as a prophylactic agent against that parasite<sup>36</sup>. The ethyl acetate fraction of the aqueous extract of *Camellia sinensis* leaves and the principal components of this fraction (catechins) demonstrated anti-trypano and amastigote forms<sup>38</sup>. Trypanocidal activity has also been reported for *Dracocephalum komarovi*, *Vitex trifolia*, *Arrabidaea triplinervia* and *Azorella compacta*<sup>7-9,39</sup>.

### Citotoxic activity

An important criterion in the search for active compounds with trypanocidal activity is its toxicity toward mammalian host cells. J774 macrophages were utilized to evaluate this cytotoxicity, and the results are presented in Table 1. A toxicity of 37% was observed at a concentration of 100 µg/mL, and toxicity was reduced to 29% with a concentration of 10 µg/mL. These cells are often utilized as indicators of cytotoxicity due to their phagocytic capacity. The moderate toxicity of EEEJ, compared with observed by Roldos<sup>40</sup>, associated with trypanocidal and modulatory activity indicates that new assays need to be carried out *in vivo* to demonstrate the real potential of the EEEJ against these pathogens and the effective nutraceutical potential.

The evaluation of cytotoxic activity of natural products could be demonstrated by the numerous reports using different cell models: *Calophyllum brasiliense*, tested with human lymphocytes; *Capparis spinosa*, *Kleinia odora* and *Psiadia punctulata*,

assayed with MRC-5 cells; and neolignans, such as licarin A and burchellin, evaluated against peritoneal macrophages<sup>4,41,42</sup>. The ethanolic extract of *E. jambolana* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the low level of toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

### *Antifungal Activity*

The antifungal activity of EEEJ is shown Table 2. The minimal inhibitory concentration was  $\geq 1024$ , which did not demonstrate activity of clinical relevance with respect to the yeast strains tested<sup>43</sup>. No modulatory effect was observed with respect to amphotericin B, nystatin and mebendazol, because MIC was the same as the control with only the antifungals. However, an interesting potentiation of antifungal activity was demonstrated when EEEJ was associated with metronidazole against the *C. albicans* strain, lowering the MIC of this antifungal drug fourfold.

Braga<sup>44</sup> evaluated the methanol extract of *Eugenia jambolana* against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. This extract presented antimicrobial activity with clinical relevance only against *C. neoformans*, demonstrating a MIC of 78 $\mu$ g/mL. Extracts of various plants, such as *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava*<sup>12-14</sup>, have been tested against yeasts of the genus *Candida* and represent a better alternative to the treatment of candidosis. However, this is the first report of potentiation of the activity of an antifungal drug combined with a *Eugenia jambolana* extract. The potentiating effect of the extracts of *E. jambolana* and of other plants has been demonstrated against bacteria showing multidrug resistance with respect to antibiotics<sup>24,45-48</sup>.

This modulatory strategy is called "herbal shotgun" or "synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible<sup>49,50</sup>.

Our results indicate that *E. jambolana* (and the family Myrtaceae in general) could be a source of plant-derived natural products with antiepipimastigote and

antifungal- modifying activity with low toxicity, representing an interesting alternative in efforts to combat infectious diseases such as candidiasis and Chagas' disease.

## References

1. Funari CS, Ferro VO: Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacogn*, 2005; 15: 178-182.
2. Elisabetsky E, Costa-Campos L: Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J Ethnopharmacol*, 1996; 51: 110-120.
3. Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Corrêa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR, et al: Fitoterápicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 4° Ed, Editora da UFSC, André Tosello, 1996, PP. 17.
4. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S: Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008; 103: 431-436.
5. WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed set 2010).
6. Dias LC, Dessoay MA: Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova*, 2009; 32: 2444-2457.
7. Leite JPV, Oliveira AB, Lombardi JA, Filho JDS, Chiari E: Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29: 2307-2309.
8. Saeidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F: Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Biol Pharm Bull*, 2004; 52: 1249-1250.
9. Araya JE, Neira I, Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, et al.: Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 413-418.
10. Coutinho HDM: Factors Influencing the Virulence of *Candida Spp*. *West Indian Med J*, 2009; 58: 160-163.
11. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E: *Candida*. In: *Medical Mycology* 1° ed, Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003, pp 195-239.
12. Sequeira BJ, Vital MJS, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GSB: Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104: 659-661.

13. Al-Bayati FA: Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2009; 8: 1-6.
14. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV: *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2009; 42: 222-224.
15. Migliato KF, Baby AR, Zague V, Velasco MVR, Corrêa MA, Sacramento LVS, ET al.: Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta Farm Bonaerense*, 2005; 25: 310-314.
16. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP: Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97: 1027-1031.
17. Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS: Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*, 2006; 104: 367-373.
18. Sundaram EN, Reddy PUM, Singh KP: Effect of alcoholic extracts of Indian Medicinal plants on the altered enzymatic of Diabetic Rats. *Indian J Pharm Sci*, 2009; 71: 594-598.
19. Sisodia SS, Bhatnagar M: Hepato protective activity of *E. jambolana* Lam. In carbon tetrachloride treated rats. *Indian J. Pharmacol*, 2009; 41: 23-27.
20. Chaturvedi A, Kumar MM, Bhawani G, Chaturvedi H, Kumar M, Goel RK: Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2007; 51: 131-140.
21. Meyer SLF, Lakshman DK, Zasada IA, Vinyard BT, Chitwood DJ: Dose-response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incógnita*. *Pest Manag Sci*, 2008; **64**: 223 – 229.
22. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Júnior JP: *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J Photochem Photobiol B*, 2009; 96: 63-65.
23. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Júnior JP: Anti-staphylococcal activity of *Eugenia jambolana* l. Against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Propert*, 2010; 13: 1405-1410.
24. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO: Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food*, 2010; 13: 1024-1026.
25. Santos AKL, Costa JGM, Menezes IRA, Cansanção IF, Santos KKA, Matias EFF, et al.: Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. *Pharmacogn Mag*, 2010; 6: 335-338.

26. Keneria M, Baravalia Y, Vaghasiya Y, Chanda S: Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region, India. *Indian J Pharm Sci*, 2009; 71: 406-412.
27. The British Herbal Medicine Association. *The British Herbal Pharmacopoeia*. Bournemouth, 1983, pp 204-205.
28. Viegas JM, Narayan MS, Laxman PM, Neelwarne B: Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini*. *Food Chem*, 2007; 105: 619-627.
29. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D: Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz J Pharm Sci*, 2006; 42: 195-202.
30. Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC: Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996; 40: 2592–2597.
31. Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JA, Gómez-Barrio A: Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97: 1101–1105.
32. Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, et al.: Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*, 2006; 28: 104–109.
33. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*. USA, Atlanta, 8, 2003, 2-8.
34. Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A: A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res*, 2005; 95: 296–298.
35. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell S, et al.: De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem*, 1996; 39: 3107–3113.
36. Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, et al.: *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40: 663-670.
37. Gallo MBC, Marques ASF, Vieira PC, Silva MFGD, Fernandes JB, Silva M, et al.: Enzymatic Inhibitory activity and trypanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. *Z Naturforsch C*, 2008; 63: 371-382.

38. Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, et al.: Anti-Trypanosoma cruzi activity of Green tea (Camellia sinensis) Catechins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48: 69-79.
39. Kiuchi F, Matsuo K, Ito M, Qui TK, Honda G: New norditerpenoids with Trypanocidal activity from vitex trifolia. *Chem Pharm Bull*, 2004; 52: 1492-1494.
40. Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, et al.: Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi: In silico, in vitro and in vivo activity studies. *J Med Chem*, 2008; 43: 1797-1807.
41. Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM: *In vitro* Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother Res*, 2010; 24: 1-9.
42. Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, et al.: Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi. *Exp Parasitol*, 2010; 124: 319-324.
43. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G: Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*, 2007; 110: 391-400.
44. Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, de O Matos M, Moreira FO, Scio E, ET al.: Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal Ethnopharmacol*, 2007; 111: 396-404.
45. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP: Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo*, 2009; 23: 287-289.
46. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Jr JP: Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med*, 2009; 9: 1-4.
47. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO: *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Biol*, 2010; 48: 1002-1006.
48. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-JR JP: Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. *Indian J Med Res*, 2010; 131: 106-108.
49. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior J P: Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 2008; 54: 328-330.

50. Wagner H, Ulrich-Merzenich G: Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 2009; 16: 97-110.

**Table 1:**

Anti-*Trypanosoma* and cytotoxic activity induced by ethanol extract of *Eugenia jambolana*.

| Extract    | Concentrations<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | %AE  | %SD  | % C | EC <sub>50</sub> |
|------------|--|------|------|-----|------------------|
| EEEJ       | 100                                    | 100  | 26,6 | 37  | 56,42            |
|            | 10                                     | 2,33 | 0,9  | 29  |                  |
|            | 1                                      | 0,0  | 1,58 | 19  |                  |
| Nifurtimox | 10                                     | 89,1 | 3,3  | -   | 0,91             |
|            | 1                                      | 54,9 | 0,7  | -   |                  |
|            | 0,5                                    | 45,6 | 4,2  | -   |                  |

%AE – Percentual of antiepipimastigote activity; %SD – standard deviation; %C – cytotoxic percentual; EC<sub>50</sub> – concentration that present 50% of maximum effect.

**Table 2:**

Antifungal and modulation activity of *Eugenia jambolana* against the yeast strains of *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

| Extract/antifungal | <i>C. albicans</i> |             | <i>C.krusei</i> |             | <i>C.tropicalis</i> |             |
|--------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------|
|                    | alone              | +EEEJ       | alone           | +EEEJ       | Alone               | +EEEJ       |
| EEEJ               | $\geq 1024$        | -           | $\geq 1024$     | -           | $\geq 1024$         | -           |
| Anphotericin B     | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Mebendazol         | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Nistatin           | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Metronidazol       | 64                 | 16          | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | 128                 | 128         |



### 5.3 Atividade Anti-*Candida* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*

#### RESUMO

Candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, frequentemente causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. *Mentha arvensis* L. é uma planta herbácea que ocorre em toda a América do Sul e é usada como um chá e na medicina tradicional. *T. ulmifolia* já é conhecida por seu valor medicinal. Os extratos etanólicos de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* foram ensaiados para a atividade antifúngica contra as cepas *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Nenhuma atividade antifúngica clinicamente relevante foi demonstrada pelos extratos, entretanto, um efeito de potencialização foi observado quando os extratos foram associados com o metronidazol contra *C. tropicalis*. *M. arvensis* e *T. ulmifolia* poderia representar uma fonte de produtos naturais com a modulação da atividade antifúngica.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, atividade potencializadora, metronidazol

**Anti-Candida activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*****Running Head:** Anti-Candida activity

Karla K.A. Santos<sup>1</sup>, Edinaldo F.F. Matias<sup>1</sup>, Celestina E.S. Souza<sup>1</sup>, Saulo R. Tintino<sup>1</sup>, Maria F.B.M. Braga<sup>1</sup>, Glaucia M.M. Guedes<sup>1</sup>, Lavouisier F.B. Nogueira<sup>1</sup>, Edson C. Morais<sup>1</sup>, José G.M. Costa<sup>2</sup>, Irwin R.A. Menezes<sup>3</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Henrique Douglas Melo Coutinho

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.

E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## ABSTRACT

Candidiasis is the most frequent infection by opportunistic fungi, frequently caused by *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. *Mentha arvensis* L. is a herbaceous plant that occurs in the whole of South America and is used as a tea and in the folk medicine. *T. ulmifolia* L. is already known to be of medicinal value. Ethanol extracts from *M. arvensis* and *T. ulmifolia* were assayed for the antifungal activity against strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. No clinically relevant antifungal activity was demonstrated by the extracts, however, a potentiation effect was observed when the extracts were associated with metronidazole against *C. tropicalis*. *M. arvensis* and *T. ulmifolia* could represent a source of natural products with modifying antifungal activity.

**KEYWORDS:** antifungal activity, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, potentiation activity, metronidazole.

## INTRODUCTION

Candidiasis or candidosis is the most frequent infection by opportunistic fungi, where the species commonly implicated in the clinical picture are: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The spectrum of candidiasis is very extensive, going from mild manifestations, such as a colonization of mucosal tissues, up to systemic pictures, with the invasion of various organs<sup>1</sup>.

*Mentha arvensis* (Labiatae) is a herbaceous plant that occurs in the whole of South America. This plant and particularly its essential oils are commonly used in folk medicine, exploiting a wide range of biological and pharmacological activities. Several compounds have been isolated from these oils, mainly menthol, *p*-menthone, menthol acetate and other phytochemicals.<sup>2,3</sup> *M. arvensis* (called “hortelã-japonesa” and “menta” in Brazil) is used by the traditional medicine in the treatment of worm diseases and digestive problems. The main component of the essential oil is menthol, very utilized in the food and pharmaceutical industries.<sup>4</sup>

*Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae), a small annual herb, can be found in the north and northeast Brazilian regions, where it is considered a weed.<sup>5</sup> It grows preferentially in sandy soils and on hill slopes. *T. ulmifolia* L. is already known to be of medicinal value, being used popularly as an anti-inflammatory, as an expectorant, and in the treatment of several problems.<sup>5-7</sup> Authors detected flavonoids, alkaloids, tannins and phenolic compounds in preparations from this plant.<sup>8-10</sup>

Therefore, due to the social and economic importance of candidiasis and the increase in the number of individuals with immunodeficiency, such as in the case of seropositives, we evaluated here the antifungal activity of *M. arvensis* and *T. ulmifolia*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant Material*

Leaves of *M. arvensis* and *T. ulmifolia* were collected in the rainy season (April, 2008) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr Arlene Pessoa and a voucher specimen was deposited with the number 2886 and 1618 respectively.

### *Preparation of Ethanol Extracts of Mentha arvensis (EEMA) and Turnera ulmifolia (EETU)*

200 g of leaves were dried and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively.<sup>11</sup> Each 200 g of aerial parts yield 5 - 6 g of extract. The ethanolic extract of *M. arvensis* (EEMA) and *T. ulmifolia* (EETU) was diluted using DMSO.

### *Cell strains used*

The fungal strains utilized were *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The strains were obtained from the collection of microorganisms of Laboratory of Mycology - UFPB. All strains were maintained in

Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco laboratories Ltd., USA), and before the assays, the cells were grown for 24 h at 37°C in brain heart infusion (BHI, Difco laboratories Ltd., USA).

### *Drugs*

The antifungal drugs used were Amphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Nistatin (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) and Metronidazole (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). All solutions were prepared following the recommendations of National committee for clinical laboratory standards – NCCLS.<sup>12</sup>

### *Antifungal and modulatory activity*

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in 10% BHI by the microdilution method, using a suspension of 10<sup>5</sup> CFU/ml and an extract concentration of 1024-8 µg/ml.<sup>13</sup> MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. For the evaluation of the extracts as modifiers of resistance to antifungals, a subinhibitory concentration (MIC/8) was added to a concentration of the test substance varying 1024-0,5 µg/ml. The plates were incubated for 24 h at 37 °C.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The extracts did not demonstrate an antifungal activity with clinical significance, presenting MIC  $\geq$  1024 µg/mL. No modulatory effect was observed with respect to amphotericin B and nystatin, because MIC was the same as the control with only the antifungals. Potentiation of antifungal activity against *C. tropicalis* was demonstrated with metronidazole when combined with EEMA and EETU, where MIC was lowered 4 times (Table I).

Extracts of various plants, such as *Himatanthus articulatus*,<sup>14</sup> *Mentha longifolia*,<sup>15</sup> *Malva sylvestris* and *Psidium guajava*,<sup>16</sup> have been tested against yeasts of the genus *Candida* and represent an alternative in the treatment of candidosis. However, this is the first report of potentiation of the activity of an antifungal drug combined with a *M. arvensis* and *T. ulmifolia* extracts. The potentiating effect of the extracts of *M. arvensis* and *T. ulmifolia* extracts has been demonstrated against bacteria showing multidrug resistance to antibiotics.<sup>17-20</sup>

This strategy is called "herbal shotgun" or " synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible.<sup>21</sup>

## CONCLUSIONS

In conclusion, *M. arvensis* and *T. ulmifolia* could represent a source of natural products with modifying antifungal activity, representing an interesting alternative in efforts to combat infectious diseases such as candidiasis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP.

## AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

## REFERENCES

1. Coutinho HDM: Factors influencing the virulence of *Candida* spp. *West Indian Med J* 2009; 58: 160-163.
2. Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia* 2005; 76: 233-236.
3. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 305-311.
4. Martins ER, Castro DM, Castellani DC. Plantas medicinais. UFV – imprensa Universitária, Viçosa, 1994.
5. Braga R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. ESAM (Coleção Mossoroense), Fortaleza, 1976.

6. Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.
7. Hosamani KM. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. *Phytochemistry* 1993; 34: 1363-1365.
8. Antonio MA, Souza Brito AR. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *J Ethnopharmacol* 1998; 6: 215-228.
9. Gracioso JS, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Souza Brito AR. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 487-491.
10. Nascimento MA, Silva AK, Franca LC, Quignard EL, Lopez JA, Almeida MG. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. *Biores Technol* 2006; 97: 1387-1391.
11. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz J Pharm Sci* 2006; 42: 195-202.
12. NCCLS - National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Sixteenth informational supplement. Document M100-S16. NIH, Wayne, PA, 2006.
13. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML. *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 1996; 39: 3107-3113.
14. Sequeira BJ, Vital MJS, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GSB. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 659-661.
15. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 1-6.

16. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 222-224.
17. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008; 54: 328-330.
18. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo* 2009; 23: 287-289.
19. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complem Alt Med* 2009; 9: 1-4.
20. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. Increasing of the aminoglycosydes antibiotic activity against a multidrug-resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlopromazine. *Biol Res Nurs* 2010; 11: 332-335.
21. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 2009; 16: 97-110.

### Tabela I:

Antifungal and modulation activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia* against the yeast strains of *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

| Extracts          | Anphotericin B |       |       | Nystatin |       |       | Metronidazole |       |     |
|-------------------|----------------|-------|-------|----------|-------|-------|---------------|-------|-----|
|                   | C.a            | C.k   | C.t   | C.a      | C.k   | C.t   | C.a           | C.k   | C.t |
| Antibiotic alone  | ≥1024          | ≥1024 | ≥1024 | ≥1024    | ≥1024 | ≥1024 | 64            | ≥1024 | 128 |
| EEMA + antibiotic | ≥1024          | ≥1024 | ≥1024 | ≥1024    | ≥1024 | ≥1024 | 64            | ≥1024 | 32  |
| EETU + Antibiotic | ≥1024          | ≥1024 | ≥1024 | ≥1024    | ≥1024 | ≥1024 | 64            | ≥1024 | 32  |

C.a – *Candida albicans*, C.k – *C. krusei*, C.t – *C. tropicalis*, EEMA – Ethanol Extract *Mentha arvensis*, EETU – Ethanol Extract *Turnera ulmifolia*.



#### 5.4 Atividades Anti-*Trypanosoma cruzi* e citotóxica de *Eugenia uniflora* L.

##### RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é considerada um problema de saúde pública. Uma alternativa para combater este patógeno são produtos naturais isolados de frutas como *Eugenia uniflora*, uma planta usada por comunidades tradicionais, como alimentos e remédios, devido às suas atividades antimicrobianas e biológicas. Um extrato etanólico de *E. uniflora* foi utilizado para avaliar a atividade antiepipimastigota e citotóxica *in vitro*. Este é o primeiro relato de atividade anti-*Trypanosoma* de *E. uniflora*, demonstrando que a concentração a apresentar 50% de atividade foi de 62,76 µg/mL. Nossos resultados indicam que *E. uniflora* pode ser uma fonte de produtos naturais derivados de vegetais com atividade antiepipimastigota e baixa toxicidade.

**Palavras-Chave:** Doença de chagas, *Eugenia uniflora*, atividade antiepipimastigota, citotoxicidade, *Trypanosoma cruzi*.

**Anti-*Trypanosoma cruzi* and Cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L.****Short Title: *Eugenia uniflora* L.**

Karla K.A. Santos<sup>a</sup>, Edinando F.F. Matias<sup>a</sup>, Saulo R. Tintino<sup>a</sup>, Celestina E.S. Souza<sup>a</sup>, Maria F.B.M. Braga<sup>a</sup>, Gláucia M.M. Guedes<sup>a</sup>, Miriam Rolón<sup>b</sup>, Celeste Vega<sup>b</sup>, Antonieta Rojas de Arias<sup>b</sup>, José G.M. Costa<sup>c</sup>, Irwin RA Menezes<sup>d</sup>, Henrique DM Coutinho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>b</sup> Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; <sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>d</sup> Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Henrique Douglas Melo Coutinho

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Departamento de Química Biológica - DQB, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## Abstract

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered a public health problem. An alternative to combat this pathogen are natural products isolated from fruits such as *Eugenia uniflora*, a plant used by traditional communities as food and medicine due to its antimicrobial and biological activities. An ethanolic extract from *E. uniflora* was used to evaluate *in vitro* anti-epimastigote and cytotoxic activity. This is the first record of anti-*Trypanosoma* activity of *E. uniflora*, demonstrating that a concentration presenting 50% of activity (EC<sub>50</sub>) was 62.76 µg/mL. Our results indicate that *E. uniflora* could be a source of plant-derived natural products with anti-epimastigote activity with low toxicity.

**Keywords:** Chagas disease, *Eugenia uniflora*, antiepipimastigote activity, cytotoxicity, *Trypanosoma cruzi*.

## 1. Introduction

Developing countries with traditional use of the biodiversity as medicine, including Brazil, still suffer with the so-called “neglected diseases,” (Funari and Ferro, 2005), which are treated by traditional communities with plant natural products. Brazil features the largest biodiversity in the world (Elisabetsky and Costa Campos, 1996); however only 8% have been studied in search for bioactive compounds (Garcia et al., 1996).

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas (Reyes-Chilpa et al., 2008). This parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods, blood and organs from infected donors, or by transplacental contamination (WHO, 2010). Currently, the chemotherapy of this disease consists mainly of nifurtimox and benznidazole (WHO, 2010), which show a cure rate of 70-50% in the acute phase and less than 20% in the chronic phase (Dias and Dessoy, 2009). Several studies involving the analysis of natural plant products have recommended them as alternative sources of drugs against *T. cruzi*, including *Arrabidaea triplinervia* (Leite

et al., 2006), *Dracocephalum kotschy* (Saeidnia et al., 2004) and *Azorella compacta* (Araya et al., 2003).

The effects of all natural products can be limited by their toxicity. Evaluating the toxicity of active substances is one of the most important steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized against Chagas disease feature high toxicity, affecting host tissues (Dias and Dessoy, 2009).

*Eugenia uniflora* is often used as food and medicine in folk medicine due antimicrobial (Holetz et al., 2002) and other biological activities (Sharma et al., 2006). Known in Brazil as *pitanga*, this plant has been studied due its antioxidant (Velazquez et al., 2003), hypotensive (Consolini and Sarubbio, 2002), photosensitizing and antibiotic modulatory (Coutinho et al., 2010ab) activities. Several phytoconstituents of *E. uniflora* have been isolated, such as flavonoids myricitrin, quercetin and quercitrin 3-rhamnoside, as well as steroids, mono- and triterpenoid compounds, tannins, anthraquinones, phenols, cineol and essential oils (Bandoni et al., 1972; Wazlawik et al., 1997).

Thus, due to the social and economic importance of Chagas disease as neglected diseases and the medicinal use of this fruit in ethnomedicine, this work evaluated the anti-*Trypanosoma* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora*.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Plant Material*

Leaves of *E. uniflora* were collected during the rainy season (April, 2008) in the municipality of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Arlene Pessoa, and a voucher specimen was deposited with identification number #3106 at the “Dárdano de Andrade Lima” Herbarium of Universidade Regional do Cariri – URCA.

### *2.2. Preparation of Eugenia uniflora Ethanol Extract (EEEU)*

A total of 200 g of leaves were dried and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room

temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator (60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure) (Brasileiro et al., 2006). Each 200 g of aerial parts yield 5.6 g of extract. The EEEU was diluted using DMSO.

### 2.3. Cell strains

For *in vitro* studies of anti-*Trypanosoma* activity, epimastigote clone CL-B5 was used (Buckner et al. 1996). The parasites transfected with the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr F. Buckner through Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). The epimastigotes were cultivated at 28°C in Liver Infusion Tryptose broth (Difco, Detroit, MI), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain) and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described by Le Senne et al. (2002). Cells were harvested during the exponential growth phase. Murine J774 macrophages were used to evaluate the cytotoxic potential of the extract. This cell strain was grown in plastic 25  $\mu$ l flasks with RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), heat inactivated (30 min, 56°C), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in a humidified, with 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C. For the assay, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin and kept at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cell viability measurement was a colorimetric method using resazurin as described by Rolón et al. (2006).

### 2.4. Reagents

Resazurin sodium salt was obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and stored at 4°C protected from light. The resazurin solution was prepared using 1% phosphate buffered solution (PBS), pH 7, and sterilized by filtration prior to use. Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN, USA) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). The solutions of antibiotics Penicillin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) were prepared following the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (NCCLS, 2003).

### 2.5. *Epimastigote susceptibility assay*

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase, as described by Vega et al. (2005). Briefly, epimastigotes were seeded at  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in 200  $\mu\text{L}$  of Liver Tryptose Broth medium. The plates were incubated with the drugs in concentrations ranging between 0.1-50  $\mu\text{g/mL}$ , at 28°C for 72 h, at which time 50  $\mu\text{L}$  of CPRG solution was added to reach a final concentration of 200  $\mu\text{M}$ . The plates were incubated at 37°C for 6 h and were evaluated using a spectrophotometer at 595 nm. Nifurtimox was used as the reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the anti-epimastigote percentage (AE%) (Table 1).

### 2.6. *Cytotoxicity assays*

J774 macrophages were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100  $\mu\text{l}$  of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h in a humidified, with 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere at 37°C. The medium was replaced by 200  $\mu\text{l}$  of medium with different concentrations of the drugs and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. Next, 20  $\mu\text{l}$  of resazurin solution with 2 mM were added and the plates were returned to the incubator for another 3 h. Resazurin reduction was determined by dual wavelength absorbance measurements at 490 and 595 nm, respectively. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentage (C%) (Table 1).

### 2.7. *Statistical analysis*

The EC50 values (concentration of extract needed to necessary for produce of 50% maximal effect) were determined by linear regression analysis of the using Prism Software 5.0.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Anti-epimastigote assay

The anti-epimastigote activity of EEEU is shown in Table 1. The results showed 80% inhibition with a concentration of 100 µg/mL, featuring  $EC_{50} = 62.76$  µg/mL, which was quite impressive due the fact that  $EC_{50}$  lower than 500 µg/mL is considered clinically relevant (Rosas et al., 2007).

This is the first report of anti-*Trypanosoma* activity for *E. uniflora*. This activity was previously reported for the family Myrtaceae. *Siphoneugena densiflora* showed a strong effect against *T. cruzi*; however, its isolated compounds did not show similar activity (Gallo et al., 2008). Other plants of the Brazilian flora have shown substantial trypanocidal activity, such as *Ampelozizyphus amazonicus*, a plant native to the Amazon forest, containing compounds with potential for use as a prophylactic agent against that parasite (Rosas et al., 2007). The ethyl acetate fraction of the aqueous extract of *Camellia sinensis* leaves and the principal components of this fraction (catechins) demonstrated anti-trypano and amastigote forms (Paveto et al., 2004). Trypanocidal activity has also been reported for *Dracocephalum komarovi* (Saeidnia et al., 2004), *Vitex trifolia* L. (Kiuchi et al., 2004), *Arrabidaea triplinervia* (Leite et al., 2006) and *Azorella compacta* (Araya et al., 2003).

#### 3.2. Cytotoxic activity

The cytotoxic activity of natural products against mammalian cells is an important point in the search for active compounds with biological activity. The results of cytotoxic activity of EEEU against J774 macrophages are presented in Table 1. A low toxicity was observed (8% to 100 µg/mL, and this toxicity was reduced to 0% with a concentration of 10 µg/mL). This low toxicity associated with trypanocidal and modulatory activity indicates that new assays need to be carried out *in vivo* to demonstrate the real potential of the EEEU against these pathogens and its effective nutraceutical potential.

The evaluation of cytotoxic activity of natural products could be demonstrated by the numerous reports using different cell models: *Calophyllum brasiliense*, tested

with human lymphocytes (Reyes-Chilpa et al., 2008); *Capparis spinosa*, *Kleinia odora* and *Psiadia punctulata*, assayed with MRC-5 cells (Abdel-Sattar et al., 2010); and neolignans, such as licarin A and burchellin, evaluated against peritoneal macrophages (Cabral et al., 2010). The ethanolic extract of *E. uniflora* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the low level of toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

#### 4. Conclusion

Our results indicate that *E. uniflora* (and the family Myrtaceae in general) could be a source of nutraceuticals with anti-*Trypanosoma* activity, representing an interesting alternative to combat infectious diseases as Chagas disease. This plant appears to be promising in the development of therapies, mainly due the low toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP.

#### References

- Abdel-Sattar, E., Maes, L., Salama, M.M., 2010. *In vitro* Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother. Res.* 24, 1-9.
- Araya, J.E., Neira, I., Silva, S., Mortara, R.A., Manque, P., 2003. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98, 413-418.
- Bandoni, A.L., Mendiondo, M.E., Rondina, R.V.D., Coussio, J.D., 1972. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia.* 35, 69-80.
- Brasileiro, B.G., Pizziolo, V.R., Raslan, D.S., Jamal, C.M., Silveira, D., 2006. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42, 195-202.
- Buckner, F.S., Verlinde, C.L., La Flamme, A.C., Van Voorhis, W.C., 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2592-2597.



- Cabral, M.M.O., Barbosa-Filho, J.M., Maia, G.L.A., Chaves, M.C.O., Braga, M.V., 2010. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 124, 319-324.
- Consolini, A.E., Sarubbio, M.G., 2002. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J. Ethnopharmacol.* 81, 57-63.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-JR, J.P., Lima, E.O., 2010a. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J. Med. Food* 13, 1024-1026.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Siqueira-JR, J.P., Lima, E.O., 2010b. *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. *Braz. J. Biosci.* 8, 299-301.
- Dias, L.C., Dessoay, M.A., 2009. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim. Nova.* 32, 2444-2457.
- Elisabetsky, E., Costa-Campos, L., 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J. Ethnopharmacol.* 51, 110-120.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev. Bras. Farmacog.* 15, 178-182.
- Gallo, M.B.C., Marques, A.S.F., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.D., Fernandes, J.B., 2008. Enzymatic Inhibitory activity and trypanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. *Zeitschrift Naturforschung C.* 63, 371-382.
- Garcia, E.S., Silva, A.C.P., Gilbert, B., Corrêa, C.B.V., Cavalheiro, M.V.S., Santos, R.R., 1996. Fitoterápicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 4º Ed., Campinas, Editora da UFSC.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 1027-1031.
- Kiuchi, F., Matsuo, K., Ito, M., Qui, T.K., Honda, G., 2004. New norditerpenoids with Trypanocidal activity from *vitex trifolia*. *Chem. Pharma. Bull.* 52, 1492-1494.

- Leite, J.P.V., Oliveira, A.B., Lombardi, J.A., Filho, J.D.S., Chiari, E., 2006. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. *Biol. Pharma. Bull.* 29, 2307-2309.
- Le Senne, A., Muelas-Serrano, S., Fernandez-Portillo, C., Escario, J.Á., Gómez-Barrio, A., 2002. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 1101–1105.
- NCCLS - National committee for clinical laboratory standards., 2003. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. Atlanta, NIH.
- Paveto, C., Güida, M.C., Esteva, M.I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M.M., 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 69-79.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Veja-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., Hernández-Ortega, S., 2008. Trypanocidal constituents in plants Mammea-type coumarins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103, 431-436.
- Rolón, M., Seco, E., Veja, C., Nogal, J.J., Escario, J.A., Gómez-Barrio, A., 2006. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28, 104-109.
- Rosas, L.V., Cordeiro, M.S.C., Campos, F.R., Nascimento, S.K.R., Januário, A.H., França, S.C., 2007. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 663-670.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G., Kiuchi, F., 2004. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Biol. Pharma. Bull.* 52, 1249-1250.
- Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., 2006. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 104, 367-373.
- Vega, C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A.R., Escario, J.Á., Gómez-Barrio, A., 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol. Res.* 95, 296–298.

Velazquez, E., Tournier, H.A., Mordujovich de Buschiazso, P., Saavedra, G., Schinella, G.R., 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 74, 91-97.

Wazlawik, E., Da Silva, M.A., [Peters, R.R., Correia, J.F., Farias, M.R., Calixto, J.B., 1997.](#) Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J. Pharma. Pharmacol.* 49, 433-437.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340., 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> accessed: 10 September 2010.

**Table 1:**

Percent parasite lysis induced by extracts of *Eugenia uniflora* against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strain

| Extract    | Concentrations<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | %AE   | %SD | % C | EC <sub>50</sub> |
|------------|--|-------|-----|-----|------------------|
| EEEU       | 100                                    | 80.83 | 0.1 | 8   | 62.76            |
|            | 10                                     | 64.80 | 3.6 | 0   |                  |
|            | 1                                      | 27.29 | 7.3 | 0   |                  |
| Nifurtimox | 10                                     | 89.1  | 3.3 | -   | 0.91             |
|            | 1                                      | 54.9  | 0.7 | -   |                  |
|            | 0.5                                    | 45.6  | 4.2 | -   |                  |

%AE – Percentual of antiepipimastigote activity; %SD – standard deviation; %C – cytotoxic percentual; EC<sub>50</sub> –concentration that present 50% of effect.

### 5.5 Atividades anti-*Candida*, citotóxica e moduladora de *Eugenia uniflora* L.

#### RESUMO

Candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, frequentemente causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O extrato etanólico de *Eugenia uniflora* foi analisado quanto a atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Quanto à atividade modulatória associado com drogas antifúngicas, metronidazol mostrou uma interessante potencialização da atividade antifúngica quando combinado com o extrato etanólico de *E. uniflora*. Nossos resultados indicam que *E. uniflora* pode ser uma fonte de produtos naturais derivados de plantas com atividade modulatória de antifúngicos com baixa toxicidade.

**Palavras-chave:** *Eugenia uniflora*, *Candida* sp., citotoxicidade, atividade antifúngica, atividade moduladora.

**Anti-Candida, cytotoxic and modulatory activity of *Eugenia uniflora* L.****Short Title: *Eugenia uniflora* L.**

Karla K.A. Santos<sup>a</sup>, Edinaldo F.F. Matias<sup>a</sup>, Saulo R. Tintino<sup>a</sup>, Celestina E.S. Souza<sup>a</sup>, Maria F.B.M. Braga<sup>a</sup>, Gláucia M.M. Guedes<sup>a</sup>, José G.M. Costa<sup>b</sup>, Irwin RA Menezes<sup>c</sup>, Henrique DM Coutinho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>b</sup> Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>c</sup> Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Henrique Douglas Melo Coutinho

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Departamento de Química Biológica - DQB, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## Abstract

Candidiasis is the most frequent infection by opportunistic fungi, frequently caused by *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. Ethanol extract from *Eugenia uniflora* was assayed for the antifungal activity against strains of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. Regarding the modulatory activity associated with antifungal drugs, metronidazole showed an interesting potentiation of antifungal activity when combined with ethanol extract of *E. uniflora*. Our results indicate that *E. uniflora* could be a source of plant-derived natural products antifungal modifying activity with low toxicity.

**Keywords:** *Eugenia uniflora*, *Candida* sp., citotoxicity, antifungal activity, modifying activity.

## Introduction

Developing countries with traditional use of the biodiversity as medicine, including Brazil, still suffer with the so-called “neglected diseases,” [1], which are treated by traditional communities with plant natural products. Brazil features the largest biodiversity in the world [2]; however only 8% have been studied in search for bioactive compounds [3].

Candidiasis is the most frequent infection caused by opportunistic fungi. The main species associated with this disease are *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The clinical features of candidiasis are quite diverse, varying between mucosal colonization to the invasion of several internal organs [4]. These yeasts remain in the microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression [5]. Several natural products have been studied extensively in the search for alternative treatments for these fungi, including *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava* [6-8].

The effects of all natural products can be limited by their toxicity. Evaluating the toxicity of active substances is one of the most important steps for the utilization of

these compounds in animal models. The drugs currently utilized against Chagas disease and candidiasis feature high toxicity, affecting host tissues [9].

*Eugenia uniflora* is often used as food and medicine in folk medicine due antimicrobial and other biological activities [10,11]. Known in Brazil as *pitanga*, this plant has been studied due its antioxidant, hypotensive, photosensitizing and antibiotic modulatory activities [12-15]. Several phytoconstituents of *E. uniflora* have been isolated, such as flavonoids myricitrin, quercetin and quercitrin 3- ramnoside, as well as steroids, mono- and triterpenoid compounds, tannins, anthraquinones, phenols, cineol and essential oils [16,17].

Thus, due to the social and economic importance of candidiasis as neglected diseases and the medicinal use of this fruit in ethnomedicine, this work evaluated the antifungal and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora*.

## **Materials and Methods**

### *Plant Material*

Leaves of *E. uniflora* were collected during the rainy season (April, 2008) in the municipality of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Arlene Pessoa, and a voucher specimen was deposited with identification number #3106 at the “Dárdano de Andrade Lima” Herbarium of Universidade Regional do Cariri – URCA.

### *Preparation of Eugenia uniflora Ethanol Extract (EEEU)*

A total of 200 g of leaves were dried and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator (60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure) [18]. Each 200 g of aerial parts yield 5.6 g of extract. The EEEU was diluted using DMSO.

### *Cell strains*

The fungal strains utilized in the assays were *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The strains were obtained from the Clinical Mycology Laboratory, UFPB, Brazil. All strains were maintained in Heart Infusion Agar slants (HIA; Difco), and prior to the assays, the cells were grown for 24 h at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI, Difco).

### *Reagents*

The antifungal drugs Amphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nystatin (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) and Metronidazole (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil) were prepared following the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS [19].

### *Cytotoxicity assays*

J774 macrophages were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 µl of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h in a humidified, with 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C. The medium was replaced by 200 µl of medium with different concentrations of the drugs and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. Next, 20 µl of resazurin solution with 2 mM were added and the plates were returned to the incubator for another 3 h. Resazurin reduction was determined by dual wavelength absorbance measurements at 490 and 595 nm, respectively. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentage (C%) (Table 1).

### *Antifungal and modulatory activity*

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using 10% BHI by the microdilution method and suspensions with  $10^5$  CFU/ml and an extract concentration ranging between 1024-8 µg/ml [20]. MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. For evaluation of the extracts as modulators of resistance to antifungals, a subinhibitory concentration (MIC/8) was mixed with the



antifungal drug assayed, in which the concentration varied between 1024-0.5 µg/ml. The plates were incubated for 24 h at 37°C.

## Results and Discussion

### *Antifungal Activity*

The antifungal and modulatory activity of EEEU is shown in Table 2. The Minimal Inhibitory Concentration was  $\geq 1024$ , which did not demonstrate clinical relevance of the possible use of EEEU as an antifungal drug [21]. However, an interesting potentiation of antifungal activity was demonstrated when EEEU was associated with metronidazole against the *C. tropicalis* strain, lowering the MIC of this antifungal drug fourfold.

Holetz et al. [10] have tested *Eugenia uniflora* against the yeasts *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, and demonstrated substantial clinical activity against these yeasts, except for *C. albicans*. Other reports using the essential oil of *E. uniflora* demonstrated activity against dermatophytes [22]. These results could indicate that the phytoconstituents extracted with ethanol do not show activity against the strains tested, or that plants from different regions could show different activities. Extracts of other plants, such as *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava* [6-8], have been tested against yeasts of the genus *Candida* and represent a better alternative to the treatment of candidosis. However, this is the first report demonstrating the potentiation of the activity of an antifungal drug when combined with *Eugenia uniflora* extract. The potentiating effect of the extracts of *E. uniflora* and of other plants has been demonstrated against multidrug-resistant bacteria [23-26].

This modulatory strategy is called "herbal shotgun" or "synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible [27,28].

### *Cytotoxic activity*

The cytotoxic activity of natural products against mammalian cells is an important point in the search for active compounds with biological activity. The results of cytotoxic activity of EEEU against J774 macrophages are presented in Table 1. A low toxicity was observed (8% to 100  $\mu\text{g/mL}$ , and this toxicity was reduced to 0% with a concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ ). This low toxicity associated with trypanocidal and modulatory activity indicates that new assays need to be carried out *in vivo* to demonstrate the real potential of the EEEU against these pathogens and its effective nutraceutical potential.

The evaluation of cytotoxic activity of natural products could be demonstrated by the numerous reports using different cell models: *Calophyllum brasiliense*, tested with human lymphocytes; *Capparis spinosa*, *Kleinia odora* and *Psiadia punctulata*, assayed with MRC-5 cells, and neolignans, such as licarin A and burchellin, evaluated against peritoneal macrophages [29-31]. The ethanolic extract of *E. uniflora* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the low level of toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

### **Conclusion**

Our results indicate that *E. uniflora* (and the family Myrtaceae in general) could be a source of nutraceuticals with antifungal-modifying activity, representing an interesting alternative to combat infectious diseases such as candidiasis. This plant appears to be promising in the development of therapies, mainly due the low toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

### **Conflict of interest statement**

No conflict of interest to declare

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP.

## References

1. Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacog* 2005;15: 178-182.
2. Elisabetsky E, Costa-Campos L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J Ethnopharmacol* 1996; 51: 110-120.
3. Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, *et al.* Fitoterápicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4<sup>th</sup> Ed., Campinas: Editora da UFSC, 1996.
4. Coutinho HDM. 2009. Factors Influencing the Virulence of *Candida Spp.* *West Indian Med J* 2009; 58: 160-163.
5. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA., eds. *Medical Mycology*. 1<sup>st</sup> ed., Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003.
6. Sequeira BJ, Vital MJS, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GSB. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 659-661.
7. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 1-6.
8. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 222-224.
9. Dias LC, Dessoy MA. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova* 2009; 32: 2444-2457.
10. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 1027-1031.
11. Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 2006; 104: 367-373.
12. Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich de Buschiazzi P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 2003; 74: 91-97.
13. Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 57-63.

14. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food* 2010; 13: 1024-1026.
15. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP, Lima EO. *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. *Braz J Biosci* 2010; 8: 299-301.
16. Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia* 1972; 35: 69-80.
17. Wazlawik E, Da Silva MA, [Peters RR, et al.](#) Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J Pharma Pharmacol* 1997; 49: 433-437.
18. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz J Pharm Sci* 42: 195-202.
19. NCCLS - National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*. NIH: Atlanta, 2003.
20. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB. *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 1996; 39: 3107–3113.
21. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 391–400.
22. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses* 1993; 36: 333-336.
23. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo* 2009; 23: 287–289.
24. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9: 1-4.

25. Coutinho HDM, Costa JG, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharma Biol* 2010; 48: 1002-1006.
26. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Siqueira-Júnior JP. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 2010; 131: 106-108.
27. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008; 54: 328-330.
28. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 2009; 16: 97-110.
29. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, *et al.* Trypanocidal constituents in plants Mammea-type coumarins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 431-436.
30. Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM. *In vitro* Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother Res* 2010; 24: 1-9.
31. Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2010; 124: 319-324.

**Table 1:**

Percent parasite lysis induced by extracts of *Eugenia uniflora* against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strain

| Extract | Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) | % C |
|---------|-------------------------------------|-----|
| EEEU    | 100                                 | 8   |
|         | 10                                  | 0   |
|         | 1                                   | 0   |

%C – cytotoxic percentual; EC<sub>50</sub> – concentration that present 50% of effect.

**Table 2:**

Minimum inhibitory concentration (MIC) and modulatory activity of *Eugenia uniflora* combined with antifungal drugs against the yeast strains.

| Extract/antifungal | <i>C. albicans</i> |             | <i>C.krusei</i> |             | <i>C.tropicalis</i> |             |
|--------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------|
|                    | Alone              | +EEEU       | Alone           | +EEEU       | Alone               | +EEEU       |
| EEEU               | $\geq 1024$        | -           | $\geq 1024$     | -           | $\geq 1024$         | -           |
| Anphotericin B     | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Mebendazole        | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Nistatin           | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Metronidazole      | 64                 | 64          | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | 128                 | 32          |

## 5.6 Atividades tripanocida, citotóxica e anti-*Candida* de *Hyptis martiusii* Benth.

### RESUMO

**Objetivo:** A doença de Chagas é considerada um problema de saúde pública. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível para esta doença, e os medicamentos correntemente usados apresentam altos níveis de toxicidade. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Hyptis martiusii*, planta usada na medicina tradicional, devido às suas atividades antimicrobianas e biológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade tripanocida, anti-*Candida* e citotóxica de *H. martiusii*.

**Métodos:** O extrato etanólico de *H. martiusii* foi preparado. Para avaliar a atividade antiepipimastigota *in vitro*, *T. cruzi* clone CL-B5 foi usado. Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL<sup>-1</sup> em 200 µl de infusão de fígado e triptose. Para o ensaio de citotoxicidade macrófagos J774 foram usados. Para a atividade antifúngica, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram utilizados.

**Resultados:** Este é o primeiro relato de atividade tripanocida para *Hyptis martiusii*. A concentração eficiente capaz de matar 50% dos parasitas (EC<sub>50</sub>) foi 23,98 µg/mL. A concentração inibitória mínima foi  $\geq 1024$ . Metronidazol mostrou uma potencialização do seu efeito antifúngico quando combinado com o extrato etanólico de *Hyptis martiusii*.

**Conclusão:** Nossos resultados indicam que *H. martiusii* poderia ser uma fonte de produtos naturais derivados de plantas com atividade antiepipimastigota, e moduladora de antifúngicos com toxicidade moderada.

**Palavras-Chave:** Doença de Chagas, *Hyptis martiusii*, atividade antiepipimastigota, citotoxicidade, atividade antifúngica, atividade moduladora.

**Trypanocide, Cytotoxic, and anti-*Candida* activities of *Hyptis martiusii* Benth.**

Short title: **anti-*Trypanosoma* and anti-*Candida* activity**

Karla K.A. Santos<sup>1</sup>, Edinaldo F.F. Matias<sup>1</sup>, Celestina E. Sobral-Souza<sup>1</sup>, Saulo R. Tintino<sup>1</sup>, Maria F.B. Morais-Braga<sup>1</sup>, Gláucia M.M. Guedes<sup>1</sup>, Miriam Rolón<sup>2</sup>, Celeste Vega<sup>2</sup>, Antonieta Rojas de Arias<sup>2</sup>, José G.M. Costa<sup>3</sup>, Irwin R.A. Menezes<sup>4</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>2</sup>Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)



## Abstract

**Purpose:** Chagas disease is considered a public health problem. Nowadays, chemotherapy is the only available treatment for this disease, and the drugs currently used present high toxicity levels. An alternative for replacing these drugs are natural extracts from *Hyptis martiusii*, plant used in traditional medicine due to their antimicrobial and biological activities. The objective of this work was evaluate the Trypanocide, anti – *Candida* and cytotoxic activities of *H. martiusii*.

**Methods:** Ethanoli extract from *H.martiusii* was prepared. To research *in vitro* antiepipmastigote activity, *T. cruzi* CL-B5 clone was used. Epimastigotes were inoculated at a  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> concentration in 200µl triptose-liver infusion. For the cytotoxicity assay J774 macrophages were used. For the antifungal activity, *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* were used.

**Results:** This is the first record of trypanocide activity for *H.martiusii*. Effective concentration capable of killing 50% of parasites (CE50) was 23,98 µg/mL. The antifungal MIC was  $\leq 1024$  µg/mL. Metronidazole showed a potentiation of its antifungal effect when combined with ethanol extract of *H. martiusii*.

**Conclusion:** Our results indicate that *H. martiusii* could be a source of plant-derived natural products with antiepipmastigote and antifungic modifying activity with moderate toxicity.

**Keywords:** Chagas disease, *Hyptis martiusii*, antiepipmastigote activity, cytotoxicity, antifungal activity, modifying activity.

## Introduction

Developing countries with abundant traditional knowledge and rich biodiversity, as in the case of Brazil, still grapple with a high incidence of so-called “neglected diseases,” such as tuberculosis, malaria and Chagas disease [1], diseases with the potential to be treated with natural products of plant origin. Brazil has the largest biodiversity in the world, with more than 55,000 species of plants catalogued,

out of an estimated total of 550,000 species [2], but only 8% have been studied in the search for bioactive compounds [3].

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas [4]. The parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods contaminated their feces, blood transfusion or organ transplants from infected donors and the transplacental route from a contaminated mother to her newborn [5]. Currently, chemotherapy is the only treatment available for this disease, where the most utilized drugs are nifurtimox and benznidazol [5], which show a 50-70% cure rate in the acute phase and less than 20% in the chronic phase [6]. Various studies involving the analysis of plant extracts have revealed an alternative source with potential against *T. cruzi*, for example, extracts of *Arrabidaea triplinervia*, *Dracocephalum kotschyi* and *Azorella compacta* [7-9].

The evaluation of the toxicity of active substances is one of the first steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized for Chagas disease show a high toxicity because the metabolites produced affect host tissues due to their high reactivity [6].

Candidiasis or candidosis is the most frequent infection by opportunistic fungi, where the species commonly implicated in the clinical picture are: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The spectrum of candidiasis is very extensive, going from mild manifestations, such as a colonization of mucosal tissues, up to systemic pictures, with the invasion of various organs [10]. These yeasts are part of the normal microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression induced by severe stress [11]. A variety of extracts have been extensively studied in the search for alternative treatments for these opportunistic infections, as in the case of *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava* [12-14].

*Hyptis martiusii* Benth (“Cidreira-do-campo”) is a small shrub belonging to family Labiatae used in Brazilian traditional medicine against intestinal and stomachic diseases [15], with few pharmacological reports. Antitumoral, cytotoxic, phototoxic, genotoxic and insecticidal activities were identified [16-20]. The modifying antibiotic activity of this plants has been reported on the works of Coutinho et al. [21-23], however, no antifungal activity had been reported.

Therefore, due to the social and economic importance of Chagas disease and the increase in the number of individuals with immunodeficiency, such as in the case of seropositives, we evaluated here the antiepipmastigote, antifungal and cytotoxic activities of *H. martiusii*.

## Materials and Methods

### Plant material

Leaves of *H. martiusii* were collected in the rainy season (April, 2008) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dra. Arlene Pessoa, and voucher specimen have been deposited with the identification number 464 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of Universidade Regional do Cariri – URCA.

### Preparation of Ethanol Extract of *Hyptis martiusii* (EEHM)

200 g of leaves were dried with no sunlight exposition and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively [24]. Each 200 g of aerial parts yield 5 - 6 g of extract. The EEHM was diluted using DMSO.

### Cell strains used

For in vitro studies of *T. cruzi*, the clone CL-B5 was used [25]. The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr F. Buckner through Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). Epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (Difco, Detroit, MI) with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain) and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described previously [26], and harvested during the exponential growth phase.

Murine J774 macrophages were grown in plastic 25  $\mu$ l flasks in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 20% heat inactivated (30 min, 56 °C) foetal bovine serum (FBS) and penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in a humidified

5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37° C and subpassaged once a week. For the experiments, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The procedure for cell viability measurement was evaluated with resazurin by a colorimetric method described previously [27].

The fungal strains utilized were *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 40147 and *C. tropicalis* ATCC 13803. The strains were obtained from the collection of microorganisms, Mycology Laboratory, UFPB. All strains were maintained in heart infusion agar slants (HIA; Difco), and before the assays, the cells were grown for 24 h at 37°C in brain heart infusion (BHI, Difco).

#### Reagents

Resazurin sodium salt was obtained from Sigma–Aldrich (St Louis, MO) and stored at 4 °C protected from light. A solution of resazurin was prepared in 1% phosphatebuffered solution (PBS), pH 7, and filter sterilised prior to use. Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofr´e S.A., Barcelona, Spain). The antifungal drugs used were Anphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nystatin (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) e Metronidazole (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). All solutions were prepared following the recommendations of National committee for clinical laboratory standards – NCCLS [28].

#### Epimastigote susceptibility assay

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase, as described [29]. Briefly, epimastigotes were seeded at  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in 200µL of liver tryptose broth medium. The plates were then incubated with the drugs (0.1-50µg/mL) at 28°C for 72 h, at which time 50 µL of CPRG solution was added to give a final concentration of 200µM. the plates were incubated at 37°C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Nifurtimox was used as the reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the antiepmatigote percentual (AE%).

#### Cytotoxicity assays

Macrophages J774 macrophages were seeded ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100  $\mu$ l of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and the medium was replaced by different concentrations of the drugs in 200  $\mu$ l of medium, and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. Afterwards, a volume 20  $\mu$ l the 2 mM resazurin solution was added and plates were returned to incubator for another 3 h. to evaluate cell viability. The reduction of resazurin was determined by dual wavelength absorbance measurement at 490 nm and 595 nm. Background was subtracted. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test as blanks. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentual (C%).

#### Antifungal and modulatory activity

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in 10% BHI by the microdilution method, using a suspension of  $10^5$  CFU/ml and an extract concentration of 1024-8  $\mu$ g/mL [30]. MIC is defined as the lowest concentration at which no microbial growth is observed. For the evaluation of the extracts as modifiers of resistance to antifungals, a subinhibitory concentration (MIC/8) was added to a concentration of the test substance varying 1024-0,5  $\mu$ g/ml. The plates were incubated for 24 h at 37 °C.

#### Statistical analysis

The statistical analysis was realized using Prism program 5.0. The groups were compared using two-way ANOVA, with Bonferroni analysis. The effective concentration (EC<sub>50</sub>) was calculated by the linear regression method.

### Results

The results demonstrated by the EEHM against the strain CL of *T. cruzi*, showed an inhibition of 46,05% at 100  $\mu$ g/mL, presenting an EC<sub>50</sub> = 23,98  $\mu$ g/mL. The toxicity at 100  $\mu$ g/mL was 37% and toxicity was reduced to 29% when the concentration was reduced to 10  $\mu$ g/mL (Table 1).

#### TABLE 1

The EEHM shown antifungal activity at 256 µg/mL against the strain of *C. krusei*, but did not show relevant antifungal activity against the strains of *C. albicans* and *C. tropicalis* (MIC ≥ 1024 µg/mL). No modulatory effect was observed when the extract was combined with amphotericin B, nystatin and mebendazol, but was observed a potentiation of antifungal activity against *C. tropicalis* when metronidazole was combined with EEHM, with the MIC had been reduced 4 times (Table 2).

## TABLE 2

### Discussion

#### *T. cruzi* epimastigote susceptibility assay

The activity by EEHM was quite impressive since an EC<sub>50</sub> less than 500 µg/mL is considered clinically relevant [31]. This is the first report of trypanocidal activity for *H. martiusii*. Other plants of the Brazilian flora have shown substantial trypanocidal activity, such as extracts and fractions of *Ampelozizyphus amazonicus*, a native plant of the Amazon forest, containing compounds with potential for use as a prophylactic agent against the parasite [31]. The ethyl acetate fraction of the aqueous extract of leaves of *Camellia sinensis* and the principal components of this fraction (catechins) demonstrated a trypanocidal effect against trypomastigote and amastigote forms [32]. Trypanocidal activity has been reported in native plants of Iran, such as *Dracocephalum komarovi*, and of Asian countries, such as *Vitex trifolia* L. [8,33]. Studies involving the analysis of extracts of other plants have also revealed a potential effect against *T. cruzi*, for example, extracts of *Arrabidaea triplinervia* and *Azorella compacta* [7,9].

#### Citotoxic activity

An important criterion in the search for active compounds with trypanocidal activity is its toxicity toward mammalian host cells. These cells are often utilized as indicators of cytotoxicity due to their phagocytic capacity. *H. martiusii* shown a moderate toxicity using 100 and 10 µg in J774 macrophages, when compared with the results exhibited on the work of Roldos et al. [34]. This result indicates the necessity of new experiments *in vivo* to determine the effect of this toxicity in a living system.

The cytotoxic activity of other plants has been evaluated in different human cell models, such as: compounds isolated from *Calophyllum brasiliense*, tested in human lymphocytes [4]; extracts and fractions of *Capparis spinosa*, *Kleinia odora* and *Psidia punctulata*, tested in MRC-5 cells [35]; and neolignans such as licarin A and burchellin, evaluated in peritoneal macrophages [36]. The ethanolic extract of *H. martiusii* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the moderate level of toxicity *in vitro*, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

#### Antifungal Activity

Extracts of various plants, such as *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* and *Psidium guajava* [12-14], have been tested against yeasts of the genus *Candida* and represent an alternative in the treatment of candidosis. However, this is the first report of activity and potentiation of the activity of an antifungal drug combined with a *H. martiusii* extract. The potentiating effect of the extracts of *H. martiusii* and of other plants has been demonstrated against bacteria showing multidrug resistance with respect to antibiotics [16,17,22,23,38-40].

This strategy is called "herbal shotgun" or "synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible [41,42].

#### Conclusion

Our results indicate that *Hyptis martiusii* could be a source of plant-derived natural products with antiepipimastigote and antifungal- modifying activity with moderate toxicity, representing an interesting alternative in efforts to combat infectious diseases such as candidiasis and Chagas' disease.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP, by funding and grants (BPI-0031-00118.01.00/10).

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Funari CS, Ferro VO (2005) Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacog* 15: 178-182.
2. Elisabetsky E, Costa-Campos L (1996) Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J Ethnopharmacol* 51: 110-120.
3. Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Corrêa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR (1996) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, Campinas.
4. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S (2008) Trypanocidal constituents in plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 431-436.
5. WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Accessed 12 sept 2010.
6. Dias LC, Dessoay MA (2009) Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova* 32: 2444-2457.
7. Leite JPV, Oliveira AB, Lombardi JA, Filho JDS, Chiari E (2006) Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. *Biol Pharm Bull* 29: 2307-2309.
8. Saeidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F (2004) Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Biol Pharm Bull* 52: 1249-1250.
9. Araya JE, Neira I, Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G, González J (2003) Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 413-418.
10. Coutinho HDM (2009) Factors Influencing the Virulence of *Candida* Spp. *West Indian Med J* 58: 160-163.



11. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E (2003) *Medical Mycology*. Churchill Livingstone, Filadélfia.
12. Sequeira BJ, Vital MJS, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GSB (2009) Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 659-661.
13. Al-Bayati FA (2009) Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8: 1-6.
14. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV (2009) *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 222-224.
15. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM (2008) Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18:472-508.
16. Araújo ECC, Silveira ER, Lima MAS, Andrade-Neto M, Andrade IL, Lima MAA (2003) Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *J Agr Food Chem* 51:3760-3762.
17. Costa-Lotufo LV, Araújo EC, Lima MA, Moraes ME, Pessoa C, Silveira ER, Moraes MO (2004) Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). *Pharmazie* 59:78-79.
18. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Jr JP (2009) *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J Photochem Photobiol B* 96: 299-301.
19. Cavalcanti BC, Moura DJ, Rosa RM, Moraes MO, Araujo EC, Lima MA, Silveira ER, Salfi J, Henriques JÁ, Pessoa C, Costa-Lotufo LV (2008) Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. *Food Chem Toxicol* 46: 388-392.
20. Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG (2005) Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Rev Bras Farmacog* 15: 304-309.
21. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Jr JP (2009) *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth & chlorpromazine against an aminoglycosides-resistant *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 129: 566-568.

22. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-JR JP (2010) Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. Indian J Med Res 131: 106-108.
23. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO (2010) *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharma Biol 48: 1002-1006.
24. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D (2006) Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Rev Bras Cienc Farm 42: 195-202.
25. Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC (1996) Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. Antimicrob Agents Chemother 40: 2592-2597.
26. Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JA, Gómez-Barrio A (2002) Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 1101-1105.
27. Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, Malpartida F (2006) Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents 28: 104-109.
28. NCCLS - National committee for clinical laboratory standards (2003) NIH, Atlanta.
29. Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A (2005) A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. Parasitol Res 95: 296-298.
30. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML (1996) *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. J Med Chem 39: 3107-3113.
31. Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, Nomizo A, Toldo MP, Albuquerque S, Pereira OS (2007) *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Braz J Med Biol Res 40: 663-670.

32. Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN (2004) Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 69-79.
33. Kiuchi F, Matsio K, Ito M, Qui TK, Honda G (2004) New norditerpenoids with Trypanocidal activity from *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull* 52: 1492-1494.
34. Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, Vega C, Marrero-Ponce Y, Huguaburu V, Yaluff G, Gómez-Barrio A, Sanabria L, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Pandolfi E (2008) Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *In silico*, in vitro and in vivo activity studies. *Eur J Med Chem* 43: 1797-1807.
35. Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM (2010) *In vitro* Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother Res* 24: 1-9.
36. Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares RO (2010) Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 124: 319-324.
37. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G (2007) Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 110:391-400.
38. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2009) Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo* 23: 287-289.
39. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP (2009) Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med* 9: 1-4.
40. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO (2010) Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food* 13:1024-1026.
41. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP (2008) Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 54: 328-330.

42. Wagner H, Ulrich-Merzenich G (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16: 97-110.

**Table 1:**

Percent parasite lysis induced by extracts of *Hyptis martiusii* against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strain

| Extract    | Concentrations<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | %AE   | %SD  | % C | EC <sub>50</sub> |
|------------|--|-------|------|-----|------------------|
| EEHM       | 100                                    | 46,05 | 1,55 | 37  |                  |
|            | 10                                     | 41,10 | 2,31 | 29  | 23,98            |
|            | 1                                      | 10,77 | 2,92 | 19  |                  |
| Nifurtimox | 10                                     | 89,1  | 3,3  | -   |                  |
|            | 1                                      | 54,9  | 0,7  | -   | 0,91             |
|            | 0,5                                    | 45,6  | 4,2  | -   |                  |

%AE – kill percentual of anti-epimastigote activity, %SD – standard deviation, % C – citotoxic percentual, EC<sub>50</sub> – Effective concentration with 50% of activity.

**Table 2:**

Antifungal and modulation activity of *Hyptis martiusii* against the yeast strains of *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

| Extract/antifungal | <i>C. albicans</i> |             | <i>C.krusei</i> |             | <i>C.tropicalis</i> |             |
|--------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------|
|                    | alone              | +EEHM       | Alone           | +EEHM       | Alone               | +EEHM       |
| EEHM               | $\geq 1024$        | -           | 256             | -           | $\geq 1024$         | -           |
| Anphotericin B     | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Mebendazole        | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Nistatin           | $\geq 1024$        | $\geq 1024$ | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | $\geq 1024$         | $\geq 1024$ |
| Metronidazole      | 64                 | 64          | $\geq 1024$     | $\geq 1024$ | 128                 | 32          |

## 5.7 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*

### RESUMO

Doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas nas Américas. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível para esta doença, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benznidazol. Leishmaniose tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitas pode ser encontrada na Região Amazônica. Revisões recentes na quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. Foram preparados extratos etanólicos das folhas de *M. arvensis* e *T. ulmifolia*. Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 e para *Leishmania brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. Nossos resultados indicam que *M. arvensis* foi eficaz contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis*.

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania brasiliensi*, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, atividade citotóxica.

**Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia***

**Evaluation of the anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia***

Karla K.A. Santos<sup>1</sup>, Edinaldo F.F. Matias<sup>1</sup>, Celestina E. Sobral-Souza<sup>1</sup>, Saulo R. Tintino<sup>1</sup>, Maria F.B. Morais-Braga<sup>1</sup>, Glaucia M.M. Guedes<sup>1</sup>, Miriam Rolón<sup>2</sup>, Celeste Vega<sup>2</sup>, Antonieta R. Arias<sup>2</sup>, José G.M. Costa<sup>3</sup>, Irwin R.A. Menezes<sup>4</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>1\*</sup>

1. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;
2. Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay;
3. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;
4. Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Corresponding author:

Henrique Douglas Melo Coutinho

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.

E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

**Abstract** (Evaluation of the anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*): Tripanosomiasis or “Chagas disease”, cause by *Trypanosoma cruzi*, affect 18 million people in Latin America. Today, the chemotherapy is the only treatment against this disease, being the most used drugs the nifurtimos and benzonidazole. Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, mainly founded in regions with forests, as the Amazonia. Recent reports about the Leishmaniasis indicate an deficit of therapeutical drugs available against this disease and reinforce the necessity of the discovering of new drugs. An interesting approach is the use of natural products, as the extracts of plants as *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. For the in vitro assays against *T. cruzi* and *Leishmania*, was used the clone CL-B5 and promastigote forms, respectively. The cytotoxic assay ws performed using fibroblasts. Our results indicated that *M. arvensis* was active against all strains assayed, representing and interesting and alternative source of natural products with anti-kinetoplastida activity.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensi*, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, cytotoxic activity.

## INTRODUÇÃO

Países em desenvolvimento, ricos em biodiversidade e com abundantes conhecimentos tradicionais como no caso do Brasil, ainda apresentam uma alta incidência das chamadas “doenças negligenciadas”, como tuberculose, malária, leishmaniose e doença de Chagas (Funari & Ferro 2005), doenças que podem ser tratadas com produtos naturais de origem vegetal. O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, com mais de 55 mil espécies de plantas catalogados, de um total de 550 mil espécies (Elisabetsky & Costa-Campos 1996), mas somente 8% têm sido estudados na procura de compostos bioativos (Garcia *et al.* 1996).

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas nas Américas (Reyes-Chilpa *et al.* 2008). O parasita pode ser transmitido aos humanos por insetos triatomíneos, alimentos contaminados pelas fezes do inseto, transfusão de sangue, transplantes de órgãos a partir de doadores infectados e por via

transplacentária (WHO 2010). Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento disponível para esta doença, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benzonidazol (WHO 2010), que mostra uma taxa de cura de 50-70% na fase aguda e menos de 20% na fase crônica (Dias & Dessoy 2009). Vários estudos envolvendo a análise de extratos de plantas têm revelado uma alternativa na procura por compostos com potencial contra *T. cruzi*, como por exemplo, extratos de *Arrabidaea triplinervia* (Leite *et al.* 2006), *Dracocephalum kotschy* (Saeidnia *et al.* 2004) e *Azorella compacta* (Araya *et al.* 2003).

Leishmaniose tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade dermatópica de espécies de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitas pode ser encontrada na Região Amazônica (Rangel & Lainson 2009). Revisões recentes sobre a quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos (Croft *et al.* 2005, Croft *et al.* 2006). Leishmanioses é um grupo de doenças tropicais causada por parasitas de cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que foram transmitido por um grupo de 50 espécies e subespécie de insetos flebotomíneo (Tesh 1989, Young & Duncan, 1994). Leishmaniose apresenta diversas e complexas manifestações clínicas (Desjeux 2004).

A avaliação da toxicidade de substâncias ativas é um dos primeiros passos para a utilização destes compostos em modelos animais. Atualmente as drogas utilizadas para parasitas como *T. cruzi* e *L. braziliensis* mostra uma alta toxicidade porque metabólitos produzidos afetam tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade (Dias & Dessoy 2009).

*Mentha arvensis* (Labiatae) é uma planta herbácea que ocorre em toda America do Sul. Esta planta e particularmente seu óleo essencial são comumente usado na medicina popular, explorando uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas (Coutinho *et al.* 2008, 2009a). Vários compostos tem sido isolado destes óleos, principalmente mentol, *p*-mentona, acetato de mentol e outros fitoquímicos (Wannissorn *et al.* 2005, Duarte *et al.* 2005).

*Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae), uma pequena erva anual, pode ser encontrado no Norte e Nordeste brasileiro, onde é considerada uma erva daninha (Braga



1976). Ela cresce preferencialmente em solos arenosos e em encostas. *T. ulmifolia* L. já é conhecida por ser de valor medicinal, sendo utilizada popularmente como anti-inflamatórios, como um expectorante, e no tratamento de vários problemas (Braga 1976, Pio Corrêa 1984, Hosamani 1993). Autores detectaram flavonoides, alcaloides, taninos e compostos fenólicos em preparados desta planta (Antonio & Souza Brito 1998, Gracioso *et al.* 2002, Nascimento *et al.* 2006) assim como diversas atividades farmacológicas (Coutinho *et al.* 2009b, 2010).

## MATERIAIS E METODOS

### *Material vegetal*

Folhas de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* foram coletadas na estação chuvosa (April, 2008) na cidade do Crato, estado do Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado pela Dra. Arlene Pessoa, e as exsicatas foram depositadas com os números 2886 e 1618, respectivamente, no Herbário “Dárdano de Andrade Lima” da Universidade Regional do Cariri – URCA.

### *Preparação dos Extratos Etanólicos de Mentha arvensis (EEMA) e Turnera ulmifolia (EETU)*

200 g de folhas de cada espécie foram secas em estufa e pulverizadas em temperatura ambiente. O material pulverizado foi macerado utilizando 1L de etanol 95% em temperatura ambiente durante 72h. O extrato obtido foi filtrado e concentrado à vácuo em rotaevaporador a 60°C e 760mm/Hg de temperatura e pressão, respectivamente (Brasileiro *et al.* 2006). O rendimento dos extratos obtidos foi entre 5-6 g de cada extrato. Os extratos EEMA e EETU foram diluídos em DMSO para realização dos testes.

### *Linhagens celulares utilizadas*

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner *et al.* 1996). Os parasitas, transfectados de forma estável com o gene para a  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28°C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado

com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne *et al.* (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay – IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. Seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.* (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivada a 22 °C em meio Schneider's Drosophila, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón *et al.* 2006).

### *Reagentes*

Resazurina sódica foi obtida da Sigma–Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4°C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0.9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

### *Teste de atividade antiépimastigota*

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega *et al.* (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> em 200µL de liver tryptose broth medium. As

placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 µg/mL a 28°C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 µL da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200µM. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6h a 37°C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepimastigota (AE%).

#### *Teste de atividade antipromastigota*

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliense* foram cultivadas até uma concentração de 10<sup>6</sup> células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

#### *Teste de citotoxicidade*

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em microplacas de 96 cavidades a uma concentração final de 3 x 10<sup>4</sup> células/cavidade. As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 µL, sendo realizado um novo cultivo por 24h. Após esta incubação, 20 µL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados são mostrados na tabela 1, EEMA apresentou toxicidade moderada na concentração de 100 µg/mL, já EETU demonstrou não citotóxico na concentração de 100 µg/mL.

Na avaliação da atividade antiparasitária, EEMA apresentou 65% e 47% de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* respectivamente em 500 µg/mL, já EETU

apresentou 29% e 9% de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* respectivamente em 500 µg/mL.

A estratégia de pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença de chagas passa por ensaios *in vitro* e *in vivo* que são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) um candidato deve ser submetido a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiparasitária, realizada essa primeira triagem os resultados são analisados para definir a possibilidade de ensaios *in vivo* (Dias & Dessoy 2009).

Os resultados demonstram que o extrato de *M. arvensis* apresentou uma melhor atividade contra as duas linhagens de parasitas quando comparado com o extrato de *T. ulmifolia*. Contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliense*, *M. arvensis* apresentou um percentual de inibição próximo ou maior que 50% de inibição a uma concentração de 500 µg/mL, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 500µg/mL é considerado clinicamente relevante (Rosas *et al.* 2007). Este é o primeiro relato de atividade anti-trypanosoma e anti-leishmania para *M. arvensis*. Outras espécies do gênero *Mentha* já foram testadas contra *T. cruzi*. *M. spicata* demonstrou atividade moderada e *M. piperita* foi inativa contra formas epimastigotas (Rojas *et al.* 2007). Extrato de *Haplophyllum myrtifolium* já foi testado contra formas promastigotas de *Leishmania*, demonstrando uma atividade inibitória significativa contra o parasita (Östan *et al.* 2007).

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade tripanocida e leishmanicida é a avaliação da toxicidade em células do hospedeiro. A atividade citotóxica de outras plantas foram avaliadas em diferentes modelos de células humanas, tais como: linfócitos humanos (Reyes-Chilpa *et al.* 2008), células MRC-5 (Cabral *et al.* 2010) e macrófagos peritoneais (Houghton *et al.* 2007).

Nossos resultados indicam que *M. arvensis* foi eficaz contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis*. Em se tratando da citotoxicidade novos testes devem ser realizados já que os níveis foram elevados, viabilizando futuros ensaios *in vivo*.

## References

- ANTONIO, M.A. & SOUZA BRITO, A.R. 1998. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 6: 215-228.
- ARAYA, J.E., NEIRA, I., SILVA, S., MORTARA, R.A., MANQUE, P., CORDERO, E., SAGUA, H., LOYOLA, A., BÓRQUEZ, J., MORALES, G. & GONZÁLEZ, J. 2003. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 413-418.
- BRAGA, R. 1976. *Plantas do nordeste, especialmente do Ceará*. 3rd ed. Fortaleza: ESAM (Coleção Mossoroense).
- BRASILEIRO, B.G., PIZZIOLO, V.R., RASLAN, D.S., JAMAL, C.M. & SILVEIRA, D. 2006. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42: 195-202.
- BUCKNER, F.S., VERLINDE, C.L., LA FLAMME, A.C. & VAN VOORHIS, W.C. 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 2592–2597.
- CABRAL, M.M.O., BARBOSA-FILHO, J.M., MAIA, G.L.A., CHAVES, M.C.O., BRAGA, M.V., DE SOUZA, W. & SOARES, R.O. 2010. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 124: 319-324.
- CHAGAS DISEASE (AMERICAN TRYPANOSOMIASIS). 2010. In: WHO-World Health Organ fact sheet n° 340. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> acesso em: 9 Set. 2010.
- COUTINHO, H.D., COSTA, J.G., LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA, V.S. & SIQUEIRA JR, JP. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54:328–330.
- COUTINHO, H.D., COSTA, J.G., LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA, V.S. & SIQUEIRA JR, JP. 2009a. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo*, 23:287–289.
- COUTINHO, H.D., COSTA, J.G., LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA, V.S. & SIQUEIRA JR, JP. 2009b. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity

against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9:13.

COUTINHO, H.D., COSTA, J.G., LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA, V.S. & SIQUEIRA JR, JP. 2010. Increasing of the aminoglycoside antibiotic activity against a multidrug resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and chlorpromazine. *Biological Research for Nursing*, 11: 332–335

CROFT, S.L., BARRETT, M.P & URBINA, J.A. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 21: 508-512.

CROFT, S.L., SUNDAR, S. & FAIRLAMB, A.H. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 111-126.

DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*, 27:305-318.

DIAS, L.C. & DESSOY, M.A. 2009. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quimica Nova*, 32: 2444-2457.

DUARTE, M.C., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L. & DELARMELENA, C. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97:305–311.

ELISABETSKY, E. & COSTA-CAMPOS, L. 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, 51: 110-120.

FUNARI, C.S. & FERRO, V.O. 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 178-182.

GARCIA, E.S., SILVA, A.C.P., GILBERT, B., CORRÊA, C.B.V., CAVALHEIRO, M.V.S. & SANTOS, R.R. 1996. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Campinas: Editora da UFSC.

GRACIOSO, J.S., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A. & SOUZA BRITO, A.R. 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25:487-491.

HOSAMANI, K.M. 1993. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. *Phytochemistry*, 34:1363-1365.

HOUGHTON, P.J., HOWES, M.J., LEE, C.C. & STEVENTON, G. 2007. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 391–400.

LE SENNE, A., MUELAS-SERRANO, S., FERNANDEZ-PORTILLO, C., ESCARIO, J.A. & GÓMEZ-BARRIO, A. 2002. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 1101–1105.

LEITE, J.P.V., OLIVEIRA, A.B., LOMBARDI, J.A., FILHO, J.D.S. & CHIARI, E. 2006. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2307-2309.

NASCIMENTO, M.A., SILVA, A.K., FRANCA, L.C., QUIGNARD, E.L., LOPEZ, J.A. & ALMEIDA, M.G. 2006. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 97: 1387-1391.

ÖSTAN, I., SAĞLAM, H., LIMONCU, M.E., TOZ, S.Ö., ÖZBEL, Y. & ÖZBILGIN A. 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of *Haplophyllum myrtifolium* against *Leishmania tropica*. *New Microbiologica*, 30: 439-445.

PIO CORRÊA, M. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

RANGEL, E.F. & LAINSON, R. 2009. Proven and putative vectores of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 937-954.

REYES-CHILPA, R., ESTRADA-MUÑIZ, E., VEJA-AVILA, E., ABE, F., KINJO, J. & HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. 2008. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 431-436.

ROJAS, J., SÓLIS, H. & PALACIOS O. 2010. Evaluación *in vitro* de La actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71: 161-165.

ROLÓN, M., SECO, E., VEGA, C., NOGAL, J.J., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. & MALPARTIDA, F. 2006. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28: 104–109.

- ROSAS, L.V., CORDEIRO, M.S.C., CAMPOS, F.R., NASCIMENTO, S.K.R., JANUÁRIO, A.H., FRANÇA, S.C., NOMIZO, A., TOLDO, M.P., ALBUQUERQUE, S. & PEREIRA, P.S. 2007. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40: 663-670.
- SAEIDNIA, S., GOHARI, A.R., UCHIYAMA, N., ITO, M., HONDA, G. & KIUCHI, F. 2004. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 52: 1249-1250.
- TESH, R.B. 1989. The epidemiology of Phlebotomus (sandfly) fever. *Israel Journal of Medical Science*, 25:214-217.
- VEJA, C., ROLÓN, M., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R., ESCARIO, J.A. & GÓMEZ-BARRIO, A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitology Research*, 95: 296–298.
- WANNISSORN, B., JARIKASEM, S., SIRIWANGCHAI, T. & THUBTHIMTHED, S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233–236.
- YOUNG, G.D. & DUNCAN, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 1-881.

Tabela 1: Atividade antiepimastigota *T. cruzi*, atividade antipromastigota *L. brasiliensis* e citotoxicidade.

| Extracts | Concn<br>(µg/mL) | Cytotoxicity<br>(%C) | Antiparasitic activity       |                            |
|----------|------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|
|          |                  |                      | <i>Trypanossoma</i><br>(%AE) | <i>Leishmania</i><br>(%AP) |
| EEMA     | 500              | 75                   | 65                           | 47                         |
|          | 100              | 31                   | 25                           | 0                          |
| EETU     | 500              | 49                   | 29                           | 9                          |
|          | 100              | 0                    | 0                            | 0                          |

EEMA- Extrato Etanólico de *Mentha arvensis*, EETU- Extrato Etanólico de *Turnera ulmifolia*, %AE – porcentagem de inibição epimastigota, %AP – porcentagem de inibição promastigota.



# **CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Todos os extratos etanólicos foram testados quanto à atividade antiepipimastigota de *Trypanosoma cruzi*. O extrato etanólico de *Eugenia jambolana* demonstrou a maior porcentagem de inibição do parasita, sendo capaz de eliminar 100% da amostra em uma concentração de 100 µg/mL. Os extratos etanólicos de *Momordica charantia*, *Eugenia uniflora* e *Hyptis martiusii* apresentaram uma inibição de 81, 80 e 46 % respectivamente em uma concentração de 100 µg/mL. O extrato etanólico de *Mentha arvensis* exibiu 65% de inibição a uma concentração de 500 µg/mL, todos os resultados apresentaram %AE de relevância clínica, com exceção do extrato etanólico de *Turnera ulmifolia* que não foi capaz de inibir 50% da amostra a uma concentração de 500 µg/mL.

Na avaliação da citotoxicidade em macrófagos o extrato de etanólico de *E. uniflora* apresentou o menor efeito tóxico; os extratos etanólicos de *M. charantia*, *E. jambolana* e *H. martiusii* exibiram toxicidade moderada; os extratos etanólicos de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* demonstraram toxicidade elevada, essa alta citotoxicidade pode ser explicada pela possibilidade de seus fitoconstituintes estarem interagindo de modo a aumentar esse efeito tóxico.

Na avaliação da CIM dos extratos, apenas o extrato etanólico de *H. martiusii* demonstrou uma inibição de 256 µg/mL para a cepa *C. krusei* ATCC 40147, todos os outros extratos apresentaram uma CIM de 1024 µg/mL.

Nos testes de modulação da atividade dos antifúngicos, os extratos etanólicos de *H. martiusii*, *M. arvensis*, *T. ulmifolia*, *M. charantia*, *E. uniflora* quando associados a metronidazol reduziu 2 pontos da CIM da droga para a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803, já o extrato etanólico de *E. jambolana* diminuiu a CIM de metronidazol em 2 pontos para a cepa *C. albicans* ATCC 40277. Para todas as outras drogas a CIM não exibiu diferença quando associado aos extratos.

# **REFERÊNCIAS**

## 7 REFERÊNCIAS

ABDEL-SATTAR, E.; MAES, L.; SALAMA, M.M. *In vitro* Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1322-1328, 2010.

AGRA, M.F.; ROCHA, E.A.; FORMIGA, S.C.; LOCATELLI, E. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba. Parte I: subclasse Asteridae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 75, p. 61-64, 1994.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, R.C.; BEOHAR, T. Chemopreventive and Anticarcinogenic effects of *Momordica charantia* extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 371-375, 2010.

ALARCON-AGUILARA, F.J.; ROMAN-RAMOS, R.; PEREZ-GUTIERREZ, S.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; CONTRERAS-WEBER, C.C.; FLORES-SAENZ, J.L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p. 101-110, 1998.

AL-BAYATI, F.A. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p. 1-6, 2009.

ALBUQUERQUE, U.P. Introdução à etnobotânica. 2. ed. **Editora Interciência**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2005.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 343-353, 2002.

ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 192-196, 2006.

ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNON, S.C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 44-52, 2007.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 222-224, 2009.

ANTONIO, M.A.; SOUZA BRITO, A.R. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 215-228, 1998.

APG II. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 339-436, 2003.

APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; SANCHEZ, G.; MUNDACA, K.; CORONADO, X.; RODRIGUEZ, J.; GIL, L.C.; OSUNA, A. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, p. 733-741, 2005.

ARANTES, A.A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 3, p. 111-127, 2002.

ARAÚJO, E.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; NETO, M.A.; DE ANDRADE, I.L.; LIMA, M.A.; SANTIAGO, G.M.; MESQUITA, A.L. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3760-3762, 2003.

ARAÚJO, E.C.; LIMA, M.A.; MONTENEGRO, R.C.; NOGUEIRA, M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 61, p. 177-183, 2006.

ARAYA, J.E.; NEIRA, I.; SILVA, S.; MORTARA, R.A.; MANQUE, P.; CORDERO, E.; SAGUA, H.; LOYOLA, A.; BÓRQUEZ, J.; MORALES, G.; GONZÁLEZ, J. Diterpenoids

from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 413-418, 2003.

ARBO, M.M. Turneraceae (*Turnera* Family). In: *N. Smith et al. (Eds.) Flowering Plants of Neotropics*. The New York Botanical Garden. Princeton University Press, 2004.

ARBO, M.M. Estudos sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III Series *Anomaliae y Turnera*. **Bonplandia**, v. 14, p. 115-318, 2005.

AUGUSTO, L.G.S.; GÓES, L. Compreensões integradas para vigilância da saúde em ambiente de floresta: O caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 23, sup. 4, p. 5549-5558, 2007.

AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Traditional knowledge of Kani tribals in Kouthalai of Tirunelveli hills, Tamil Nadi, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 246-255, 2005.

BACKES, P.; IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, p. 326, 2002.

BALIGA, M.S.; RAO, S. Radioprotective potential of mint: A brief review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 6, p. 255-262, 2010.

BANDONI, A. L.; MENDIONDO, M. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**, v. 35, p. 69-80, 1972.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BARROSO, G.M.; PERÓN, V. Myrtaceae. In *Reserva ecológica de Macaé de Cima*, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares. (M.P.M. Lima e R.R. Guedes-Bruni, Eds.). Jardim botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.1, p. 261-302, 1994.

BEGOSSI, A.; HANAZAKI, N.; TAMASHIRO, Y. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge, use and conservation. **Human Ecology**, v. 30, p. 281-299, 2002.

BENKO-ISEPPON, A.M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: State of art and perspectives. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, p. 189-194, 2010.

BENOIT-VICAL, F.; GRELLIER, P.; ABDOULAYE, A.; MOUSSA, I.; OUSMANE, A.; BERRY, A.; IKHIRI, K.; POUPAT, C. *In vitro* and *in vivo* Antiplasmodial Activity of *Momordica balsamina* Alone or in a Traditional Mixture. **Chemotherapy**, v. 52, p. 288-292, 2006.

BOAINAIN, E.; RASSI, A. Terapêutica etiológica da doença de Chagas. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 32, p. 395-399, 1979.

BOALINO, D.M.; CONNOLLY, J.D.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; TINTO, W.F. Alpha-pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1303-1307, 2003.

BOFF, E.; LOPES, P.G.M.; SPADER, T.; SCHEID, L.A.; LORETO, E.; FORNO, N.F.D.; AQUINO, V.; SEVERO, L.C.; SANTUARIO, J.M.; ALVES, S.H. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41, p. 36-40, 2008.

BRACA, A.; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANÒ, M.P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v. 79, p. 123-125, 2008.

BRAGA, R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 3th ed. Fortaleza:ESAM (Coleção Mossoroense), p. 187, 1976.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; DE O MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-404, 2007.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZILOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 195-202, 2006.

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

CARDOSO, A.I.I.. Seed yield and quality in response to pollen load of squash cv. **Piramoita Bragantia**, v.62, p. 47-52, 2003.

CARDOSO, C.M.V.; SAJO, M.G. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 47-54, 2004.

CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Structure and Function**, v. 14, p. 383-392, 1989.

CASTRO, D.P.; SEABRA, S.H.; GARCIA, E.S.; SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, v. 117, p. 201-207, 2007.

CAVALCANTI, B.C.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; MORAES, M.O.; ARAÚJO, E.C.; LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 388-392, 2008.

CHATURVEDI, A.; KUMAR, M.M.; BHAWANI, G.; CHATURVEDI, H.; KUMAR, M.; GOEL, R.K. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, p. 131-140, 2007.

CHEN, C.R.; LIAO, Y.W.; WANG, L.; KUO, Y.H.; LIU, H.J.; SHIH, W.L.; CHENG, H.L.; CHANG, C.I. Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* and their cytoprotective activity in *ter*-Butyl Hydroperoxide-Induced Hepatotoxicity of HepG2 cells. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 1639-1642, 2010.

CHUETHONG, J.; ODA, K.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; LEELAMANIT, W. Cochinin B, a Novel Ribosome-Inactivating Protein from the Seeds of *Momordica cochinchinensis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 428-432, 2007.

COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAISSIE, E.J.; LI, A.; SULLIVAN, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, p. 156-165, 1998.



COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57-63, 2002.

CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Vol. 5, Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, RJ, pág. 687, 1974.

COSTA, I.R.; ARAÚJO, F.S. Organização comunitária de um enclave de cerrado *sensu stricto* no bioma Caatinga, chapada do Araripe, Barbalha, Ceará. **Acta Botânica Brasílica**, v. 21, p. 281-291, 2007.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAUJO, E.C.; LIMA, M.A.; MORAES, M.E.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Die Pharmazie**, v. 59, p.78-79, 2004.

COURA, J.R. Chagas disease: What is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COUTINHO, H.D.M. Avaliação da atividade antibacteriana e fotossensibilizante de produtos naturais da Região do Cariri Cearense. Tese de Doutorado, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 670-675, 2008a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008b.

COUTINHO, H.D.M. Factors Influencing the Virulence of *Candida Spp*. **The West Indian Medical Journal**, v. 58, p. 160-163, 2009.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 96, p. 63-65, 2009a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and Chlorpromazine in the resistance to

aminoglycosides of methicillin – resistente *Staphylococcus aureus*. **In Vivo**, v. 23, p. 287-290, 2009b.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Anti-staphylococcal activity of *Eugenia jambolana* l. Against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 1405-1410, 2010a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1024-1026, 2010b.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 8, p. 299-301, 2010c.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA-JR, J.P. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medinal Research**, v. 131, p. 106-108, 2010d.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* additive effects of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1002-1006, 2010e.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Effects of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.33, p. 467-471, 2010f.

DENG, Y.; BALUNAS, M.J.; KIM, J.; LANTVIT, D.D.; CHIN, Y.; CHAI, H.; SUGIARSO, S.; KARDONO, L.B.S.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M.; SWANSON, S.M.; BLANCO, E.J.C.; KINGHORN, A.D. Bioactive 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrone Derivatives from *Hyptis brevipes*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1165-1169, 2009.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. Medical Mycology. Churchill Livingstone, Filadélfia; 2003.

ELISABETSKY, E.; FIGUEIREDO, W.; OLIVERIA, G. Traditional Amazonian nerve tonics as antidepressant agents: *Chaunochiton Kappleri*: a case study. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 1, p. 125-162, 1992.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p. 110-120, 1996.

ESTRADA-SOTO, S.; GONZÁLEZ-MALDONADO, D.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; AGUIRRE-CRESPO, F.; SÁNCHEZ-SALGADO, J.C. Spasmolytic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, p. 107-117, 2010.

FACEY, P.C.; PORTER, R.B.; REESE, P.B.; WILLIAMS, L.A. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, P. 4774-4777, 2005.

FALCÃO, D.Q.; FERNANDES, S.B.O.; MENEZES, F.S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 81-83, 2003.

FARIA, F.A.; BUENO, C.J.; PAPA, M.F.S. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 383-389, 2009.

FERNANDES, N.P.C.; LAGISHETTY, C.V.; PANDA, V.S.; NAIK, S.R. Na experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized *Momordica charantia* fruit extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 1-8, 2007.

FERRAZA, M.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BATISTA, M.R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, p. 58-63, 2005.

FRAGOSO-SERRANO, M.; Gonzalez-Chimeo, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera* L. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 45-50, 1999.

FREITAS, J.M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 411-417, 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005.

FUNDETEC - Fundação de Desenvolvimento Tecnológico do Cariri. **Plano de gestão da APA – Área de Proteção Ambiental da Chapada do Araripe**. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, 1998.

GALLO, M.B.C.; MARQUES, A.S.F.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.D.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M. Enzymatic Inhibitory activity and trypanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 371-382, 2008.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. **Fitoterápicos**. Campinas: André Tosello, 1996. 17p.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p.11-21, 2007.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: Novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Médica**, v. 66, p. 99-105, 2000.

GINSBURG, H.; DEHARO, E. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments-an introduction. **Malaria Journal**, v. 10, p. 1-7, 2011.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 52-61, 2005.

GRACIOSO, J.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on Mouse Gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drug. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 487-491, 2002.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JAQUEMIN, M. Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Créoles, Palikur, Wayãpi??. Ed. L'ORSTOM. Paris., pág. 559. 1987.

GROVER, J.K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 81-100, 2002.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1172-1177, 2003.

GUPTA, S.; RAYCHAUDHURI B.; BANERJEE, S.; DAS, B.; MUKHOPADHAYA, S.; DATTA, S.C. Momordicatin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. **Parasitology International**, v. 59, p. 192-197, 2010.

HOARE, C.A. The trypanosomes of mammals, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1972, p. 20.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGLIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 1065-1068, 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOSAMANI, K.M. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1363-1365, 1993.

HUSSAIN, A.L.; ANWAR, F.; NIGAM, P.S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 90, p. 1827-1836, 2010.

ISOBE, T.; DOE, M.; MORIMOTO, Y.; NAGATA, K.; OHSAKI, A. The Anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1039-1041, 2006.

JAGETIA, G.C. Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. **Recent Advances in Indian Herbal Drug Research**, v. 40, p. 74-81, 2007.

JAIN, D.; PATHAK, N.; KHAN, S.; RAGHURAM, G.V.; BHARGAVA, A.; SAMARTH, R.; MISHRA, P.K. Evaluation of Cytotoxicity and Anticarcinogenic Potential of *Mentha* leaf extracts. **International Journal of Toxicology**, v. 30, p. 225-236, 2010.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4076-4082, 2001.

KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 9ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 991, 2005.

KIRKPATRICK, C.H.; HILL, H.R. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 197-206, 2001.

KONG, D.X.; LI, X.J.; ZHANG, H.Y. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 115-119, 2009.

KUHNT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the Mexican Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 485-489, 1994.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1997.

LEITÃO-FILHO, H.F. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e sub-tropicais do Brasil. IPEF, n.35, p. 41-46, 1987.

LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; LOMBARDI, J.A.; FILHO, J.D.S.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2307-2309, 2006.

LE SENNE, A.; MUELAS-SERRANO, S.; FERNANDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1101-1105, 2002.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, p. 333-336, 1993.

LONDONKAR, R.L.; PODDAR, P.V. Studies on activity of various extracts of *Mentha arvensis* Linn against drug induced gastric ulcer in mammals. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 1, p. 82-88, 2009.

LOPES, A.C. Tratado de clínica médica. V. 3, São Paulo: Roca, p. 5366, 2006.

LÓPEZ, V.; AKERRETA, S.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J.P.; CAVERO, R.Y.; CALVO, M.I. *In vitro* antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 151-155, 2007.

LÓPEZ, V.; MARTÍN, S.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P.; CARRETERO, M.E.; JÄGER, A.K.; CALVO, M.I. Neuroprotective and Neurochemical properties of mint extracts. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 869-874, 2010.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p. v.1.

MABBERLEY, D.I. The Plant Book. 2a. ed. Cambridge: Cambridge University Pres, 1987.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 1-12, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MANOEL-CAETANO, F.S.; SILVA, A.E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis os Chagas disease. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, p. 2263-2274, 2007.

MAYA, J.D.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J.; CHAUVIERE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 999-1006, 2003.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2007.

MAYA, J.D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MORELLO, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, p. 323-331, 2010.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. Viçosa: UFV- Imprensa Universitária, 1994, 220 p.

MELENDO, M.; GIMENEZ, E.; CANO, E.; GOMEZ-MERCADO, F.; VALLE, F. The endemic flora in the South of the Iberian Peninsula: Taxonomic composition, biological spectrum, pollination, reproductive mode and dispersal. **Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 198, p. 260-276, 2003.

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.

MESIA, G.K.; TONA, G.L.; NANGA, T.H.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 409-415, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MIGLIATO, K.F.; BABY, A.R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M.V.R.; CORRÊA, M.A.; SACRAMENTO, L.V.S.; SALGADO, H.R.N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, p. 310-314, 2006.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. Ribeirão Preto: Tecmedd. 2004.

MONTES-HERNANDEZ, S.; EGUIARTE, L.E. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western Mexico. **American Journal of Botany**, v.89, p. 1156-1163, 2002.

MWAMBETE, K.D. The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: A Tanzania medicinal plant. **African Health Sciences**, v. 9, p. 34-39, 2009.

NARASIMHAN, S.; KANNAN, S.; ILANGO, K.; MAHARAJAN, G. Antifeedant activity of *Momordica dioica* fruit pulp extracts on *Spodoptera litura*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 715-717, 2005.



NASCIMENTO, M.A.; SILVA, A.K.; FRANCA, L.C.; QUIGNARD, E.L.; LOPEZ, J.A.; ALMEIDA, M.G. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v.97, p.1387-1391, 2006.

NCCLS (2003) National committee for clinical laboratory standards. In: Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. USA, Atlanta, pp 2-8.

NERURKAR, P.V.; LEE, Y.K.; NERURKAR, V.R. *Momordica charantia* (bitter melon) inhibits primary human adipocyte differentiation by modulating adipogenic genes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 1-10, 2010.

NOGUEIRA, N.F.S.; GONZALEZ, M.S.; GOMES, J.E.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; NOHARA, L.L.; ALMEIDA, I.C.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 120-128, 2007.

NOVELO, M.; CRUZ, J.G.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; CHAI, H.; MAR, W.; PEZZUTO, J.M. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1728–1736, 1993.

OHSAKI, A.; KISHIMOTO, Y.; ISOBE, T.; FUKUYAMA, Y. New labdane diterpenoids from *Hyptis fasciculata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 53, p. 1577-1579, 2005.

OLIVEIRA, G.L.; OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADE, L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 571-577, 2010.

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 691-696, 2005.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 274-278, 2008.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 50-52, 2005.

PEARSON, W.; FLETCHER, R.S.; KOTT, L.S.; HURTIG, M.B. Protection against LPS-induced cartilage inflammation and degradation provided by a biological extract of *Mentha spicata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, 1-11, 2010.

PEREDA-MIRANDA, R.; DELGADO, G. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 182-185, 1990.

PEREDA-MIRANDA, R.; HERNANDEZ, L.; VILLAVICENCIO, M.J.; NOVELO, M.; IBARRA, P.; CHAI, H.; PEZZUTO, J.M. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 583–593, 1993.

PIO CORREA, M. Dicionário da Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Vol. IV, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.

RAJA, R.R.; DEVI, B.P. Phytochemical and antimicrobial screening of *Gymnema sylvestre*, *Mentha arvensis*, *Solanum surratense*, extracts in dental caries. **Journal of Pharmacy Research**, v.3, p.21-23, 2010.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v. 2, p. 349-362, 1996.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 152-158, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A. Predicting prognosis in patients with Chagas disease: Why are the results of various studies so different? **International Journal of Cardiology**, v. 145, p. 64-65, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RAY, R.B.; RAYCHOUDHURI, A.; STEELE, R.; NERURKAR, P. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Research**, v. 70, p. 1925-1931, 2010.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, [doi:10.1016/j.jep.2011.01.027], 2011.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; VEJA-AVILA, E.; ABE, F.; KINJO, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 431-436, 2008.

ROCHA, M.O.C.; TEIXEIRA, M.M.; RIBEIRO, A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, p. 727-743, 2007.

RODRIGUES, R.R.; NAVE, A.G. Heterogeneidade florística das matas ciliares. Pp. 45-71. In: R.R. Rodrigues, H.F. Leitão Filho (eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo, Edusp/Fapesp. 2000.

ROJAS, J.; SÓLIS, H.; PALACIOS, O. Evaluación *in vitro* de La actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 71, p. 161-165, 2007.

ROLÓN, M.; SECO, E.; VEGA, C.; NOGAL, J.J.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 104–109, 2006.

ROMAGNOLO, M.B.; SOUZA, M.C. Ogênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 529-548, 2006.

ROOPASHREE, T.S.; RAMAN, D.; SHOBHA, R.R.H.; NARENDRA, C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 1, p. 20-28, 2008.

ROSAS, L.V.; CORDEIRO, M.S.C.; CAMPOS, F.R.; NASCIMENTO, S.K.R.; JANUÁRIO, A.H.; FRANÇA, S.C. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 663-670, 2007.

SAEIDNIA, S.; GOHARI, A.R.; UCHIYAMA, N.; ITO, M.; HONDA, G.; KIUCHI, F. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1249-1250, 2004.

SANTOS, A.K.L.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; CANSANÇÃO, I.F.; SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; COUTINHO, H.D.M. Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 335-338, 2010.

SEQUEIRA, B.J.; VITAL, M.J.S.; POHLIT, A.M.; PARAROLS, I.C.; CAÚPER, G.S.B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree

*Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 659-661, 2009.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Guanabara Koogan, p. 388, 2004.

SISODIA, S.S.; BHATNAGAR, M. Hepato protective activity of *E. jambolana* Lam. In carbon tetrachloride treated rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 23-27, 2009.

SOUSA GRACIOSO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R.M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 487-491, 2002.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.G.; SOUZA JÚNIOR, A.H.; FERNANDES, O.F.L.; SILVA, M.R.R. Antimicrobial Activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 963-965, 2003.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**. doi:10.1155/2010/295394. 2010.

STEFANELLO, M.E.A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, p. 73-94, 2011.

SUNDARAM, E.N.; REDDY, P.U.M.; SINGH, K.P. Effect of alcoholic extracts of Indian Medicinal plants on the altered enzymatic of Diabetic Rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 594-598, 2009.

THENMOZHI, A.J.; SUBRAMANIAN, P. Antioxidant potential of *Momordica charantia* in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine - eCAM**, 2010.

TIEN, P.G.; KAYAMA, F.; KONISHI, F.; TAMEMOTO, H.; KASONO, K.; HUNG, N.T.; KUROKI, M.; ISHIKAWA, S.E.; VAN, C.N.; KAWAKAMI, M. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by water extract of Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). **International Journal of Oncology**, v. 26, p. 881-889, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8ª edição, Porto Alegre: Artmed, p.894, 2005.

TRIPATHI, U.N.; CHANDRA, D. The plant extracts of *Momordica charantia* and *Trigonella foenum graecum* have antioxidant and anti-hyperglycemic properties for cardiac tissue during diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2, p. 290-296, 2009.

TSOI, A.Y.; NG, T.B.; FONG, W.P. Antioxidative effect of a chymotrypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) seeds in a primary rat hepatocyte culture. **Journal of Peptide Science**, v.11, p. 665-668, 2005.

TSOI, A.Y.; NG, T.B.; FONG, W.P. Immunomodulatory activity of a chymotrypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Journal of Peptide Science**, v.12, p. 605-11, 2006.

UMUKORO, S.; ASHOROBI, R.B. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 119-124, 2006.

URBINA, J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 311-318, 2009a.

URBINA, J.A. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2009b.

VEGA, C.; ROLÓN, M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296–298, 2005.

VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH, D.E.; BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2003.

WAZLAWIK, E.; DA SILVA, M. A.; PETERS, R. R.; CORREIA, J. F.; FARIAS, M. R.; CALIXTO, J. B. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 433–437, 1997.

WALLER, D.P. Methods in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 189-195, 1993.

WHO - World Health Organization. Police perspectives on medicines. Geneva: World Health Organization. 2002.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed set 2010).

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2013-2025, 2001.

WINKELMAN, M. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. **Medical Anthropology**, v. 11, p. 255-268, 1989.

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

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; SILVA, C.N.L. *Erysiphe biocellata*, um Novo Patógeno de *Mentha arvensis* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.449, 2003.

# **ANEXOS**

## 8 CURRÍCULO LATTES

### Karla Katiúcia Alves dos Santos

Possui graduação em ciências biológicas pela Universidade Regional do Cariri (2009) e mestrado em Bioprospecção Molecular pela Universidade Regional do Cariri (2011).  
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 20/09/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/2265623770754288>


#### Dados pessoais

**Nome** Karla Katiúcia Alves dos Santos 

**Nome em citações bibliográficas** SANTOS, K. K. A.; Santos, Karla K.A.; Karla K. A. Santos;

**Sexo** Feminino

#### Formação acadêmica/Titulação

- 2009 - 2011** Mestrado em Bioprospecção Molecular (Conceito CAPES 4) .  
Universidade Regional do Cariri, URCA, Brasil.  
*Título:* Atividade antiepimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais da Região do Cariri., *Ano de Obtenção:* 2011.  
*Orientador:*  Henrique Douglas Melo Coutinho.  
*Bolsista do(a):* Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico .  
*Palavras-chave:* Trypanosoma cruzi; epimastigota; Candida albicans; Candida tropicalis; Candida krusei; citotóxica.  
*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia.  
*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Parasitologia.

- 2005 - 2009** Graduação em ciências biológicas .  
Universidade Regional do Cariri, URCA, Brasil.

#### Formação complementar

- 2008 - 2009** ciencias biológicas.  
Universidade Regional do Cariri, URCA, Brasil.
- 2008 - 2008** ciências biológicas. (Carga horária: 60h).  
Universidade Regional do Cariri, URCA, Brasil.
- 2005 - 2005** ciências biológicas. (Carga horária: 40h).  
Universidade Regional do Cariri, URCA, Brasil.
- 2003 - 2003** pró-técnico. (Carga horária: 150h).  
Instituto Centro de Ensino Tecnológico.

#### Atuação profissional

**Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.**

#### Vínculo institucional

- 2007 - 2008** Vínculo: Outro (especifique), Enquadramento Funcional: Estudante, colaborador, Carga horária: 4

#### Atividades



**01/2007 - 12/2008** Atividades de Participação em Projeto, faculdade de medicina - cariri, .

Projetos de pesquisa

[Xô Parasita](#)

### Projetos de Pesquisa

**2007 - 2008** Xô Parasita

*Descrição:* Projeto realizado no Assentamento 10 de Abril, que visa a promoção da saúde e a prevenção de parasitoses..

*Situação:* Concluído; *Natureza:* Extensão.

*Integrantes:* karla katiene alves dos santos - Coordenador / Karla Katiúcia Alves dos Santos - Integrante.

### Áreas de atuação

#### Produção em C,T & A

#### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** ; Almeida T.S. . Phytochemical Prospection and Modulation of Aminoglycoside Antibiotic Activity by *Croton campestris* A.. Chemotherapy (Basel) <sup>JCR</sup>, v. 57, p. 305-309, 2011.
2. **doi>**Matias, Edinardo F.F. ; Santos, Karla K.A. ; Almeida, Thiago S. ; Costa, José G.M. ; Coutinho, Henrique D.M. . Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L.. Biomedicine & Preventive Nutrition <sup>JCR</sup>, v. 1, p. 57-60, 2011.
3. **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** ; **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. . Light-enhanced antibiotic activity of natural products of *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. and *Cordia verbenaceae* DC.. Asian Biomedicine <sup>JCR</sup>, v. 4, p. 183-186, 2010.
4. SANTOS, K. K. A. ; **MATIAS, E. F. F.** ; Almeida T.S. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS E ANIMAIS DE REGIÃO DO CARIRI CEARENSE.. Cadernos de cultura e ciência (URCA) <sup>JCR</sup>, v. 1, p. 53-65, 2010.
5. **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . Screening for in vitro phototoxic activity of methanol extracts of *croton campestris* A., *Ocimum gravissimum* L. and *Cordia verhenaceae* DC.. Indian Journal of Medical Research <sup>JCR</sup>, v. 132, p. 520-522, 2010.
6. **doi>**Coutinho, HenriqueD. M. ; Santos, AllanaK.L. ; Costa, JoséG. M. ; Menezes, IrwinR. A. ; Cansação, IsaacF ; Santos, KarlaK. A. ; Matias, EdinardoF. F. . Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. Pharmacognosy Magazine <sup>JCR</sup>, v. 6, p. 335-338, 2010.
7. **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenaceae* DC.. Acta Farmaceutica Bonaerense <sup>JCR</sup>, v. 29, p. 1049-1059, 2010.
8. **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenaceae* DC.. Revista Brasileira de Biociências (Impresso) <sup>JCR</sup>, v. 8, p. 294-298, 2010.
9. **doi>**Coutinho, H.D.M. ; Matias, E.F.F. ; Santos, K.K.A. ; Tintino, SR ; Souza, C.E.S. ; Guedes, G.M.M. ; Santos, F.A.D. ; **Costa, J.G.M.** ; Falcão-Silva, VS ; Siqueira-Júnior, JP . Enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by gaseous Contact with the essential oil of *Croton zehntneri*. Journal of Young Pharmacists <sup>JCR</sup>, v. 2, p. 362-364, 2010.

#### Resumos publicados em anais de congressos

1. SANTOS, K. K. A. ; **MATIAS, E. F. F.** ; Rolón M. ; Vega C. ; Rojas de Arias A. ; **COSTA, J. G. M.** ; MENEZES, I. R. A. ; **COUTINHO, H. D. M.** . Antiepipimastigote and citotoxic activity of *Eugenia uniflora* L.

and Eugenia jambolana. In: XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2010, João Pessoa. Farmacologia / Toxicologia (estudos pré-clínicos e pesquisa clínica), 2010.

2. **MATIAS, E. F. F.** ; SOUZA, C. E. S. ; SANTOS, K. K. A. ; Almeida, Thiago S. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . SCREENING OF IN VITRO PHOTOTOXIC ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT CROTON CAMPESTRIS A., OCIMUM GRATISSIMUM L. AND CORDIA VERBENACEA DC. In: XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil,, 2010, João Pessoa. Química de Produtos Naturais, 2010.
3. **MATIAS, E. F. F.** ; SOUZA, C. E. S. ; SANTOS, K. K. A. ; Almeida T.S. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . MODULATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE ON MULTIRESTANT BACTERIAL STRAINS BY CROTON CAMPESTRIS A... In: XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2010, João Pessoa. Química de Produtos Naturais, 2010.
4. **COUTINHO, H. D. M.** ; MENEZES, I. R. A. ; **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. . ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA E EFEITO TOXICOLÓGICO AGUDO DE *Murraya paniculata* (RUTACEAE)(L.) JACK.. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMEDICINA, 2010, Recife. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA E EFEITO TOXICOLÓGICO AGUDO DE *Murraya paniculata* (RUTACEAE)(L.) JACK., 2010.

#### Artigos aceitos para publicação

1. ARARUNA, M. K. A. ; Morais Braga, M. F. ; Souza, T. M. ; Brito, S. A. ; SANTOS, K. K. A. ; Leite, T. R. ; **COSTA, J. G. M.** ; **COUTINHO, H. D. M.** . Evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of pilocarpine and rutin. Indian Journal of Medical Research. Indian Journal of Medical Research **JCR**, 2011.
2. ★ Santos, Karla K.A. ; Matias, Edinardo F.F. ; Sobral-Souza, Celestina E. ; Tintino, Saulo R. ; Morais-Braga, Maria F. B. ; Guedes, Glaucia M. M. ; Rolón M. ; Vega C. ; Rojas de Arias A. ; Costa, José G.M. ; Menezes, Irwin R. A. ; Coutinho, Henrique D.M. . Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. Pharmaceutical Biology **JCR**, 2011.
3. Coutinho, Henrique D.M. ; Santos, Karla K.A. ; Morais Braga, M. F. ; Souza, T. M. ; Costa, José G.M. ; MENEZES, I. R. A. ; Matias, Edinardo F.F. . Evaluation of the antimicrobial Activity of the Decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus Semitaeniatus* (Spix, 1825) used by the traditional medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print) **JCR**, 2011.
4. ★ SANTOS, K. K. A. ; **MATIAS, E. F. F.** ; Tintino, Saulo R. ; SOUZA, C. E. S. ; Morais Braga, M. F. ; Guedes, Glaucia M. M. ; Rolón M. ; Vega C. ; Rojas de Arias A. ; **COSTA, J. G. M.** ; MENEZES, I. R. A. ; **COUTINHO, H. D. M.** . Cytotoxic, tripanocide and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L.. Journal of Medicinal Food **JCR**, 2011.
5. **COUTINHO, H. D. M.** ; **MATIAS, E. F. F.** ; SANTOS, K. K. A. ; Santos, F.A.D. ; Morais Braga, M. F. ; Souza, T. M. ; ANDRADE, J. C. ; SOUZA, C. E. S. ; Tintino, SR ; Guedes, G.M.M. ; Falcão-Silva, V. S. ; Siqueira-Júnior, J.P. ; **COSTA, J. G. M.** . Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. Biomédica (Bogotá) **JCR**, 2011.
6. ★ SANTOS, K. K. A. ; **MATIAS, E. F. F.** ; SOUZA, C. E. S. ; Tintino, SR ; Morais Braga, M. F. ; Guedes, G.M.M. ; NOGUEIRA, L. F. ; MORAIS, E.C. ; **COSTA, J. G. M.** ; MENEZES, I. R. A. ; **COUTINHO, H. D. M.** . Anti-Candida activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. Journal of Medicinal Food **JCR**, 2011.