

ADOLFO HARUO KOGA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DE PLANTAS**

**FLORIANOPOLIS
2003**

ADOLFO HARUO KOGA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DE PLANTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Steindel
Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Pizzolatti

**FLORIANOPOLIS
2003**

Koga, Adolfo Haruo

Avaliação da atividade tripanocida de compostos obtidos de plantas/ Adolfo Haruo Koga – Florianópolis, 2003.

65p.

Dissertação (Mestrado – Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Compostos naturais. 2. Atividade tripanocida. I. Avaliação da atividade tripanocida de compostos obtidos de plantas.

*A minha esposa Cleide e a minha filha
Yume pela paciência, compreensão das
ausências e sobretudo pelo apoios em
todos o s momentos*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Mário Steindel, pela paciência, orientação, ensinamentos e principalmente pela sua amizade.

Ao Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, pela valiosa colaboração e co-orientação desta dissertação.

As colegas Ane, Letícia, Bibiana, Mônica, Leonardo, Juliana, Milene pela grande ajuda nos experimentos realizados para a conclusão desta dissertação.

Aos Professores Dr. Edmundo Grisard e Carlos Pinto do Laboratório de Protozoologia pelos ensinamentos e apoio durante a realização desta dissertação.

A minha amiga Priscilla e amigo Juliano pelos constantes estímulos, amizade e cooperação em todos os momentos.

A minha amiga especial Márcia Roberge do Laboratório Médico Santa Luzia pela grande ajuda e compreensão que foram fundamentais para concluir esta dissertação.

A todo o pessoal do Laboratório de Protozoologia pela amizade e cooperação em todos os momentos.

Ao pessoal da secretaria da Pós-Graduação, pela ajuda e por todos os serviços prestados.

À todas as pessoas que mesmo indiretamente colaboraram na realização desta dissertação.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	III
Lista de Tabelas.....	IV
Lista de Figuras.....	V
Resumo.....	VI
1. Introdução.....	1
2. Doença de Chagas.....	5
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. Materiais e Métodos.....	14
4.1 Extratos de plantas.....	14
4.2 Parasitas.....	17
4.1.1 Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	17
4.1.2 Formas tripomastigotas sangüíneos de <i>T. cruzi</i>	17
4.2.3 Formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	18
5. Bioensaios.....	18
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida de extratos brutos, compostos semipurificados e purificados de plantas contra formas epimastigotas e tripomastigotas sangüíneos de <i>T. cruzi</i>	18
5.2 Avaliação do efeito hemolítico dos compostos.....	20
5.3 Infectividade para camundongos de tripomastigotas tratados com diferentes compostos.....	21
5.4 Estudo da citotoxicidade dos compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT.....	21
5.5 Avaliação da atividade tripanocida de compostos contra formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	23
5.6 Inibição da tripanotiona redutase.....	25
6. Análise estatística.....	26
7. Resultados.....	27
7.1 Atividade tripanocida de extratos brutos obtidos de plantas contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	27
7.2 Atividade tripanocida de compostos semipurificados obtidos de plantas contra formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e percentagem de hemólise.....	28
7.3 Atividade tripanocida de compostos isolados contra formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e percentagem de hemólise.....	31
7.4 Comprovação <i>in vivo</i> da atividade tripanocida dos compostos.....	39
7.5 Avaliação da citotoxicidade para células Vero de compostos ativos contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	40
7.6 Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de compostos contra formas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	41
7.7 Atividade inibitória da tripanotiona redutase.....	41

8. Discussão.....	43
9. Conclusões.....	55
10.Referências bibliográficas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus centígrados

CI₅₀: concentração inibitória 50%

CI₉₀: concentração inibitória 90%

DEMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Etilenodiamino tetraacético

LIT: Liver tryptose infusion

FDA: Federal Drugs Administration

GR: Glutathiona redutase

IPCB: Programa Internacional de Cooperação da Biodiversidade

LIT: Liver infusion tryptose

ml: mililitro

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão salina fosfato

pH: potencial de hidrogênio

SBF: Soro bovino fetal

TR: Tripanotiona redutase

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

µg: micrograma

µl: microlitro

WHO: World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das plantas nativas da Mata Atlântica da qual foram obtidas os extratos para análise da atividade tripanocida.....	14
Tabela 2. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> de extratos brutos de plantas, de benznidazol contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Tabela 3. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> de frações semipurificados de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Tabela 4. Atividade tripanocida <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> de compostos puros isolados de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Tabela 5. Parasitemia sanguínea e hemocultura de camundongos inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de sangue infectado pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> incubado a 4 ^o C por 48 horas com diferentes concentrações dos compostos testados.....	39
Tabela 6. Taxa de infecção e número de parasitas intracelulares em células Vero e macrófagos peritoneais de camundongos infectadas pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> após 72 horas de tratamento com diferentes compostos.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos compostos avaliados.....	33
Figura 2. Atividade tripanocida de compostos contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> : A- Prenilcumarina, B- Stirilpirona2, C- Dihidroxi-Febalosina, D- Taxifolina-3-acetil, E- Flavolignana.....	35
Figura 3. Atividade tripanocida de compostos contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> : F- Stirilpirona-6, G- Febalosina, H- Miricitrina e I- Quer-3-glu.....	36
Figura 4. Atividade tripanocida de compostos contra formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes concentrações, após 48 horas de incubação a 4 ⁰ C: A- Taxifolina-3-acetil, B- Febalosina, C- Prenilcumarina, D- Stirilpirona-2, E- Stirilpirona-6.....	37
Figura 5. Atividade tripanocida de compostos contra formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes concentrações, após 48 horas de incubação a 4 ⁰ C: F- Flavolignana, G- Dihidroxi-Febalosina, H- Miricitrina e I- Quer-3-glu.....	38
Figura 6. Taxa de citotoxicidade de compostos obtidos de plantas para células Vero em diferentes concentrações.....	40

RESUMO

No presente trabalho avaliamos a atividade tripanocida *in vitro* de extratos brutos, frações semipurificados e compostos isolados de 13 espécies de plantas da Mata Atlântica. Os ensaios foram realizados contra formas epimastigotas, tripomastigotas sangüíneos e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Além disso, foi avaliadas a atividade hemolítica, citotoxicidade para células Vero, atividade tripanocida intracelular e a inibição da tripanotiona redutase para os produtos naturais. De 14 extratos brutos testados, 11 foram ativos contra epimastigotas $CI_{50} \leq 250 \mu\text{g/ml}$. O fracionamento de extratos de *T. catigua*, *P. cyparicias*, *P. paniculata*, *B. platypoda*, *P. sabulosa* e *E. jambolana* resultou em 17 frações. A avaliação da atividade das 17 frações mostrou que, 15 foram ativas contra epimastigotas $CI_{50} \leq 248,7 \mu\text{g/ml}$ e 13 contra tripomastigotas $CI_{50} \leq 1016,1 \mu\text{g/ml}$. O fracionamento das frações diclorometano e acetato de etila de *P. sabulosa*, acetato de etila e hexânica de *P. paniculata*, acetato de etila de *T. catigua*, *E. jambolana* e *Baccharis platypoda* resultou em 9 compostos (prenilcumarina, stirilpirona-2, stirilpirona-6, quercetina-3-glu, febalosina, dihidroxi-febalosina, miricitrina, flavolignana e taxifolina-3-acetil). Todos os 9 compostos foram ativos contra epimastigotas e tripomastigotas com $CI_{50} \leq 332,4$ e $CI_{50} \leq 1409,3 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. A taxa de hemólise variou de 2 a 6% e citotoxicidade contra células Vero foi dose dependente e variou de 27 a 58% na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. Nenhum dos compostos ativos inibiu significativamente a tripanotiona redutase. Dois compostos prenilcumarina e stirilpirona-2 obtidos da família Polygalaceae mostraram atividade contra formas intracelulares do *T. cruzi*. Estes resultados indicam que esta espécie pode ser uma nova classe de produtos naturais, e uma promissora fonte de compostos ativos contra *T. cruzi*.

ABSTRACT

In this present work, the trypanocidal activity of crude extracts, extracts fraction and compounds of 13 species of plants from Atlantic Forest were evaluated *in vitro* against epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes forms of *T. cruzi* Y strain. on the Vero cells and peritoneal macrophages cells of Swiss mouse. The hemolytic activity, cell cytotoxicity, intracellular activity against amastigotes and inhibition of trypanothione reductase were performed. Among the fourteen crude extracts tested, eleven were active against epimastigotes ($IC_{50} \leq 250 \mu\text{g/ml}$). Partitionation of crude extracts of *T. catigua*, *P. cyparicias*, *P. paniculata*, *B. platypoda*, *P. sabulosa* e *E. jambolana* resulted in 17 fractions that were tested against epimastigotes and blood trypomastigotes. Among the seventeen fractions, fifteen ones revealed to be active against epimastigotes ($IC_{50} \leq 248,7 \mu\text{g/ml}$) and thirteen were active against blood trypomastigotes ($IC_{50} \leq 1016,1 \mu\text{g/ml}$). Partitionation of dichloromethane and ethyl acetate fractions of *P. sabulosa*, ethyl acetate and hexanic fraction of *P. paniculata*, ethyl acetate of *T. catigua*, *E. jambolana* and *Baccharis platypoda* resulted in 9 compounds (prenylcoumarin, styrylpyrone-2, styrylpyrone-6, quercetin-3-glu, febalosine, dihidroxi-febalosine, miricitrine, flavolignan e taxifolin-3-acethyl). All compounds were active against epimastigotes and blood trypomastigotes ($IC_{50} \leq 332,4 \mu\text{g/ml}$ and ($IC_{50} \leq 1409,3 \mu\text{g/ml}$), respectively. The hemolytic activity varied from 2 to 6% and citotoxicity revealed to be dose-dependent and varied from 27% to 58% at the higher concentration (100 $\mu\text{g/ml}$). None of the compounds inhibited significantly the trypanothione reductase. Two compounds prenylcoumarin and styrylpyrone-2 obtained from Polygalaceae family presented activity against intracellular forms of *T. cruzi*. The result indicates that this species are new class of natural products, and a promising source for active compound against *T. cruzi*.

Introdução

Desde os tempos antigos as plantas vêm sendo utilizadas pelo homem em suas atividades terapêuticas e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas (De Pasquale, 1984). Com o decorrer do desenvolvimento da cultura humana, o uso de produtos naturais passou a ter uma conotação mágica religiosa em várias culturas (Rates, 2000). Na cultura ocidental o uso de produtos naturais como alternativa de tratamento terapêutico era considerada uma opção para a população de baixa renda e muitas vezes, uma simples superstição religiosa sem valores farmacológicos (Rates, 2000).

Com a revolução industrial, o grande desenvolvimento da síntese química de moléculas e o surgimento de indústrias farmacêuticas, teve início o tratamento farmacológico sistemático de várias doenças. Inúmeros compostos naturais isolados de plantas como: quinina e quinidina de *Cinchona* sp, a vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, a digoxina de *Digitalis* sp, a atropina de *Atropa belladonna*, a morfina de *Papaver somniferum* e a penicilina isolada do fungo *Penicillium caudatum*, tiveram e continuam tendo um grande impacto na sobrevida e no tratamento de várias enfermidades humanas (Rates, 2000).

Atualmente, cerca de 60% da população mundial faz uso de plantas como fonte alternativa para o tratamento de doenças (Harvey, 2000). Das 520 novas drogas que surgiram entre os anos de 1983 e 1994, 39% são isoladas de plantas ou derivadas de produtos naturais e, 60 a 80% dos compostos antibacterianos e anti-tumorais são derivados de produtos naturais (Cragg *et al.*, 1997). Aproximadamente 60% das drogas anti-tumorais antiparasitárias, antibacterianas

e antivirais disponíveis no mercado ou ainda em testes clínicos são de origem natural (Shu, 1998). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo de compostos sintéticos foi obtido de precursores naturais (WHO, 1992).

Além disso, ao longo do tempo as plantas tem sido reconhecida como uma importante fonte para o desenvolvimento de novas drogas. Dentre estes, podemos citar a muscarina, o canabinol, a iombina, a colchicina, a fisostigmina e a quinidina entre outros as quais são de grande importância no estudo de processos biológicos em nível farmacológico, fisiológico e bioquímico (Williamson *et al.*, 1996).

Recentemente, tem surgido um grande interesse na pesquisa de terapias alternativas como a fitoterapia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a fitoterapia como programa de saúde e sugere procedimentos básicos para a validação de novas drogas de origem vegetal (Goldfrank *et al.*, 1982; Vulto & Smet, 1988; Israelsen, 1997). Atualmente países orientais, como a China e a Índia, possuem importantes indústrias de fitomedicamentos. Nos países industrializados, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos e registrados contém fármacos ativos derivados de vegetais. Este interesse se deve em parte a ineficiência dos tratamentos medicamentosos convencionais, aos efeitos colaterais indesejáveis, uso incorreto e abusivo de medicamentos e a restrição de grande parte da população aos tratamentos farmacológicos convencionais disponíveis (Gruenwald, 1997).

Em países da Europa como a Alemanha e a França, 50% dos produtos fitomedicinais são vendidos com prescrição médica, e custeado por planos de saúde (Gruenwald, 1997). Nos países em desenvolvimento cerca de 75% da população depende da medicina alternativa para solucionar seus problemas de saúde, face ao alto custo da terapêutica convencional (Ahmad *et al.*, 1998). Entretanto, em muitas ocasiões a utilização de plantas sem nenhum embasamento científico, pode acarretar aos usuários quadros de intoxicações e envenenamentos. No Brasil esta realidade é agravada pela imensa diversidade e abundância de espécies vegetais desconhecidas tanto química como taxonomicamente. Na América do Norte os fitomedicamentos são enquadrados e vendidos como alimentos (de saúde) (Brevoort, (1997) e Calixto (2000) e os consumidores tem sido alertados para os aspectos da eficácia e segurança destes produtos, sendo atualmente necessário novas normas para o seu registro no FDA (Food Drugs Administration) (Israelsen, 1997)).

A partir de 1993 o Programa Internacional de Cooperação da Biodiversidade (IPCB), lançado nos países da América Latina, tem permitido o desenvolvimento de programas multidisciplinares entre universidades, indústrias e o governo no sentido de promover pesquisas com produtos naturais baseadas no desenvolvimento sustentado e na preservação do meio ambiente (Rouhi, 1997). Atualmente grandes indústrias farmacêuticas como a Merck, Ciba, Glaxo, Boehringer e Syntex, possuem departamentos específicos para o estudo de novos fármacos a partir fontes naturais (Reid *et al.*, 1993).

Considerando a vasta diversidade de espécies de plantas, estimada em torno de 250 mil espécies no mundo, a bioprospecção de novos fármacos de

origem vegetal encontra-se pouco desenvolvida. As limitações dos produtos naturais como fonte de desenvolvimento de novos fármacos são inúmeras. Destas podemos destacar a complexidade dos processos de avaliação e a presença de misturas biológicas de difícil caracterização. Em geral, produtos naturais oriundos de plantas são metabólitos secundários produzidos em resposta a estímulos externos tais como mudança nutricional, infecção bacteriana, fúngica, defesa contra insetos entre outros (Strohl, 2000). Alguns destes metabólitos podem apresentar efeitos terapêuticos notáveis. Tais substâncias, conhecidas como princípio ativo são óleos essenciais, resinas, alcalóides, flavonóides, taninos, terpenos entre outros e são produzidos em pequenas concentrações (Di Stasi, 1996).

Face a pequena quantidade destes metabólitos secundários, apenas um limitado número de compostos naturais tem sido investigados em suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas. Com o desenvolvimento de novas tecnologias como a recombinação genética, aplicação de modernas técnicas de biologia molecular e de biotecnologia, metabólitos secundários de plantas de interesse fitoterápico poderão ser obtidos em larga escala e com a garantia da preservação do meio ambiente (Harvey, 2000).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo e a estimativa do número de espécies vegetais catalogadas é de cerca de 55.000 (Dias, 1996). Acredita-se que mais da metade das espécies vegetais do planeta são encontradas nas florestas tropicais, numa área de apenas 7% da superfície da terra, sendo necessários projetos para conservação *in situ* do germoplasma

vegetal, pois na maioria das situações a exploração desta diversidade tem sido feita de forma extrativista (Soerjarto, 1996).

Por outro lado, as doenças parasitárias são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade humana nos países em desenvolvimento. Para a grande maioria destas enfermidades o arsenal quimioterápico disponível é limitado. Embora consideráveis investimentos na pesquisa e desenvolvimento de vacinas tenham sido implementados na última década, não existe atualmente disponível nenhuma vacina eficaz para uso em humanos contra protozoários parasitas . Desta forma, o uso de quimioterápicos é uma das únicas alternativas viáveis para o tratamento dos indivíduos infectados sendo os produtos naturais uma importante fonte alternativa de novas drogas antiparasitárias (Kondrachine & Trigg, 1997; Phillipson & Wright, 1991).

2. Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), é ainda um grande problema de saúde pública na maioria dos países latino-americanos afetando, cerca de 18 milhões de indivíduos e causando a morte de aproximadamente 45.000 pacientes por ano (Dias & Brener, 1984; WHO, 1997). No Brasil cerca de 5 a 6 milhões de pessoas são infectados, com cerca de 300.000 somente no Estado de São Paulo (Canesin & Barreto, 1997). A infecção pelo *T. cruzi* apresenta um caráter zoonótico envolvendo inúmeras espécies silvestres e domésticas de mamíferos hospedeiros

e de insetos transmissores da subfamília Triatominae popularmente conhecidos com barbeiros (Dias & Schofield, 1999).

A epidemiologia do *T. cruzi* envolve ciclos de transmissão silvestre, peridoméstico e doméstico, e em muitas situações pode ocorrer a sobreposição destes ciclos dependendo das espécies de hospedeiros reservatórios e insetos vetores envolvidos (Dias & Schofield, 1999). Além da transmissão vetorial que ainda responde por cerca de 80% dos casos de infecção, o parasita pode ser transmitido ao homem por vias alternativas como a transfusional, congênita, oral, transplante de órgãos e através de acidentes laboratoriais (Dias, 1979; 1993).

A biologia do parasita é complexa e envolve diferentes formas morfológicas (tripomastigota e amastigota) no hospedeiro vertebrado e (epimastigota e tripomastigota metacíclico) no invertebrado. No hospedeiro vertebrado o *T. cruzi* replica-se intracelularmente em uma ampla variedade de tipos celulares incluindo células do sistema fagocítico mononuclear, células epiteliais, nervosas, musculares e fibroblastos (Bertelli & Brener, 1980; Andrade, 1985; Toma, 1994).

O complexo ciclo de vida do *T. cruzi* inicia-se com a deposição de tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes e/ou urina do vetor sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. As formas tripomastigotas são fagocitadas ou penetram ativamente em células do sistema fagocitário mononuclear onde, após se evadirem do vacúolo fagocítico, diferenciam-se para a forma amastigota a qual se multiplica intracelularmente por divisão binária e, após um período de 96 a 120 horas aproximadamente, se diferenciam para formas tripomastigotas (Brener, 1984). Após o rompimento da membrana da célula hospedeira, os tripomastigotas são liberados e podem infectar células adjacentes ou ganhar a corrente sanguínea

e atingir outras células hospedeiras, ou serem ingeridos pelo triatomíneo e dar assim, continuidade ao ciclo de multiplicação no inseto vetor (Rey, 1992).

Face a domiciliação de algumas espécies de triatomíneos a transmissão do parasita ao homem passou a ocorrer no contexto do ambiente domiciliar. Desta forma, o rociamento das habitações humanas nas regiões rurais com inseticidas de ação residual, tem permitido uma acentuada redução e/ou interrupção da transmissão vetorial em algumas regiões (Dias & Schofield, 1999).

No homem a doença de Chagas apresenta um curso clínico bastante variado sendo caracterizada por uma fase aguda, que em geral dura poucas semanas, e que pode ou não estar acompanhada de um quadro febril passageiro e inespecífico (Brener, 1987). O tratamento específico com benznidazol (Rochagan®) na fase aguda da infecção pode resultar em elevadas taxas de cura (Rassi & Luquetti, 1992). A maioria dos casos não são detectados e, portanto, não tratados, evoluindo para a forma crônica indeterminada que consiste na presença da infecção comprovada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos, porém sem apresentar sintomatologia e sinais clínicos como as alterações cardíacas e digestivas (Dias, 1992).

Embora raro, em alguns casos, principalmente quando há alterações cardíacas na fase aguda, pode ocorrer uma evolução direta para a fase crônica determinada, passando por uma fase conhecida como subaguda, em que, de forma súbita em adultos jovens, manifesta-se uma gravíssima cardiopatia com insuficiência cardíaca congestiva refratária causando a morte na maioria dos casos (Rassi & Luquetti, 1992).

Do ponto de vista clínico-epidemiológico as formas mais graves são as formas crônicas determinadas face aos grandes impactos médico-sociais que causam. Estas se caracterizam por manifestações mórbidas, como a cardiopatia chagásica crônica, alterações do sistema de condução elétrica do coração e as megasíndromes (megaesófago, megacólon e cardiomegalia) (Brener, 1987). Embora os mecanismos envolvidos na patogenia da doença de Chagas serem pouco conhecidos, existem fortes evidências da participação da resposta imune no estabelecimento das lesões (Dias, 1992).

Outro fato relevante no contexto da doença de Chagas é sua transmissão por via transfusional (Silveira & Rezende, 1994). Esta via de transmissão está diretamente relacionada com a prevalência da infecção entre os candidatos a doadores e a qualidade do sangue e hemoderivados transfundidos. A única substância usada para prevenir a infecção por esta via é a violeta de genciana (Nussenzweig *et al.*, 1953). Entretanto, seu uso é limitado devido à toxicidade para os componentes do sangue e principalmente aos efeitos indesejáveis (coloração das mucosas) para o paciente.

O arsenal de drogas disponíveis para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi* é extremamente limitado. Isto se deve em parte aos escassos investimentos na área, a dificuldade em se obter novos quimioterápicos e problemas de mercado consumidor (Rassi & Luquetti, 1992). Atualmente existem dois derivados nitroheterocíclicos usados no tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox (Lampit), introduzido para uso clínico em 1965, mas que não está disponível no mercado atualmente e o benznidazol introduzido em 1971, sendo o único disponível atualmente. No Brasil este derivado nitroimidazólico é comercializado

pela Roche com o nome de Rochagan[®] (Rezende & Rassi, 1995). Este quimioterápico atua contra as formas tripomastigotas sanguíneas inibindo a síntese de proteínas e de RNA do parasita e aumentando a degradação destas macromoléculas (Gonzalez & Cazzulo, 1989). Entretanto, seu uso causa efeitos colaterais como anorexia, vômitos, neuropatia periférica e reações alérgicas (De Castro, 1993). Além disso, existem na literatura evidências de carcinogenicidade induzida pelo benznidazol em modelos experimentais (Teixeira *et al*, 1985, 1990a, 1990b).

Embora o benznidazol apresente considerável atividade na fase aguda da doença, há relatos de completa falha terapêutica (Andrade *et al*, 1985; 1992). Estas falhas, possivelmente, podem ser atribuídas em parte a populações de *T. cruzi* naturalmente resistentes ao quimioterápico como demonstrado experimentalmente (Filardi & Brener, 1987). Contrariamente, na fase crônica, o benznidazol apresenta reduzida eficácia no tratamento da doença (De Castro, 1993; Andrade & Zicker, 1997). O predomínio de cepas de *T. cruzi* com diferente susceptibilidade ao benznidazol em áreas geográficas particulares, pode explicar os resultados contraditórios reportados na literatura em relação ao tratamento específico da doença de Chagas.

Estudos recentes utilizando derivados triazólicos (D0870) e (SCH56592) mostraram que estes compostos promoveram cura parasitológica da ordem de 70 a 100% em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção (Urbina *et al.*, 1996; Urbina, 1999).

Estes resultados foram também confirmados utilizando-se cepas naturalmente resistentes ao benznidazol (Molina *et al.*, 1997).

Um dos alvos para desenvolvimento de novos agentes tripanocidas e leishmanicidas tem sido o metabolismo de síntese de poliaminas destes parasitas (Hamilton *et al.*, 2002). Na maioria dos organismos, a glutatona é um importante agente antioxidante e níveis de glutatona em sua forma reduzida são mantidos pela enzima glutatona redutase (GR). A família Trypanosomatidae não possui glutatona redutase, sendo a tripanotona redutase (TR) a única enzima presente com esta função. O mecanismo de ação da TR é essencialmente idêntico aquele da GR. Embora a glutatona redutase e a tripanotona redutase apresentem similaridade estrutural, suas especificidades aos substratos são distintas.

A TR é uma flavoenzima NADPH dependente que catalisa a redução de disulfide para um conjugado glutatona-espermidina denominado tripanotona (N^1 , N^2 – bis (glutatona) espermidina). A enzima é responsável pela manutenção do balanço reduzido intracelular do parasita para proteção contra o estresse oxidativo produzida por radicais livres liberada pela célula hospedeira (Bonnet *et al*, 2000). Estudos tem indicado que TR é fundamental para sobrevivência de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. e desta forma inibidores da TR constituem-se em moléculas de grande interesse para o desenvolvimento de drogas contra estes parasitas. (Bond *et al*, 1999; Bonnet *et al*, 2000; Li *et al*, 2001).

Um dos problemas enfrentados no estudo e na detecção de produtos naturais ativos, refere-se aos seus efeitos de citotoxicidade. O 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) é um ensaio amplamente usado para avaliar a viabilidade metabólica *in vitro* de culturas

celulares. O MTT é um composto hidrossolúvel que apresenta coloração amarelo pálido e é rapidamente incorporado por células viáveis que reduzem o composto em suas mitocôndrias pela ação das desidrogenases, formando um composto formazan de coloração azul escuro, não solúvel em água e que fica armazenado no citoplasma celular (Slater *et al*, 1963). Desta forma, a quantidade de formazan medido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Slater *et al*, 1963). Este ensaio que pode ser lido em leitor de microplacas apresenta-se vantajoso na avaliação da citotoxicidade, proliferação ou ativação das células, uma vez que o mesmo pode ser executado de forma semi-automatizada.

A técnica foi descrita por Mosmann (1983), primeiramente para avaliar compostos com atividade anti-tumoral. Posteriormente, Pauwels *et al* (1988), usaram a técnica com algumas modificações para avaliar atividade antiviral contra o vírus HIV e citotoxicidade de vários compostos. Desde então, a técnica tem sido largamente utilizada na avaliação da atividade de compostos, proliferação celular e citotoxicidade (Loosdrecht *et al*, 1991; Takeuchi *et al*, 1991; Sieuwerts *et al*, 1995).

Face a importância da doença de Chagas como problema de saúde pública acrescida ao limitado número de drogas disponíveis para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi* e seus efeitos colaterais, a busca de novos agentes tripanocidas a partir de plantas é uma importante estratégia (Croft *et al.*, 1998). Inúmeros estudos de atividade antiparasitária de compostos obtidos de plantas têm sido realizados utilizando diferentes modelos experimentais (Rasonaivo *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1998; Schmeda-Hirschmann, *et al.*, 1996; Mukherjee, 1991). Devido a facilidade de manutenção e produção, formas sangüíneas e de cultura de *T. cruzi* e formas

de cultura de *Leishmania* spp. tem sido muito utilizadas na triagem de compostos (Rojas de Arias *et al.*, 1994; Lunardi *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1996; Chiari *et al.*, 1991;1996; Silva *et al.*,1997). Alguns desses compostos tem apresentado expressiva atividade antiparasitária e podem ser considerados como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para o *T. cruzi*.

Embora a bioprospecção de compostos ativos a partir de produtos naturais seja um processo longo e requer uma abordagem multidisciplinar, vários medicamentos hoje disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais. Desde a década de 80 a Universidade Federal de Santa Catarina desenvolve pesquisa multidisciplinar em fitomedicina, possuindo atualmente, um grupo atuante de pesquisadores na área de química e farmacologia de produtos naturais. Aliado a esta experiência, a disponibilidade de extratos e compostos isolados, possibilita o desenvolvimento de estudos multidisciplinares sobre a atividade tripanocida de compostos obtidos de plantas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade tripanocida de extratos, frações e compostos puros obtidos de plantas, bem como o mecanismo de ação de alguns compostos ativos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade tripanocida de extratos brutos, frações semipurificados e compostos isolados obtidos de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* "in vitro".
- Avaliar o efeito hemolítico de compostos ativos frente a hemácias de camundongos.
- Avaliar a atividade tripanocida contra formas intracelulares de *T. cruzi* em cultura de células VERO e em macrófagos murinos.
- Avaliar a citotoxicidade celular de compostos ativos.
- Avaliar alguns mecanismos de ação de compostos ativos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Extratos de plantas

Os extratos brutos, frações semipurificadas e compostos isolados foram obtidos a partir das plantas descritas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Lista das plantas nativas da Mata Atlântica das quais foram obtidos os extratos para análise da atividade tripanocida.

Família	Espécie	Nome popular	Origem
Euphorbiaceae	<i>Croton celtidifolius</i>	Sangue de Adave	SC
Anacardiaceae	<i>Schinus molle</i>	Aroeira mansa	SC
Guttiferae	<i>Rheedia gardneriana</i>	Bacopari	SC
Compositae	<i>Spilantes oleraceae</i>	Agrião do Pará	SC
Polygalaceae	<i>Polygala sabulosa</i>	Tmitu-pinheirinho	SC
	<i>P. paniculata</i>	Barba de São Pedro	SC
	<i>P. cyparicias</i>	Pinheirinho da praia	SC
Asteraceae	<i>Baccharis pseudotenuifolia</i>	Carqueja	SC
	<i>B. platypoda</i>	Carqueja	MG
Leguminosae	<i>Bauhinia forficata</i>	Pata de vaca	SC
Myrtaceae	<i>Eugenia jambolana</i>	Jambolão	SC
	<i>E. uniflora</i>	Pitanga	SC
Meliaceae	<i>Trichilia catigua</i>	Catuaba, catiguá	SC

As plantas foram obtidas de seu habitat natural na mata atlântica catarinense e o material botânico enviado para identificação específica. As espécies *Croton celtidifolius*, *Schinus molle* e *Eugenia uniflora* foram identificadas pelo prof. Dr. Ademir Reis do departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); *Bauhinia forficata* foi identificada pelo prof. Daniel Falkenberg do departamento de botânica da UFSC e *Rheedia gardneriana*, *Spilantes oleraceae*, *Polygala sabulosa*, *P. paniculata*, *Baccharis pseudotenuifolia* pelo prof. Olavo Guimarães do departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os extratos brutos de *Croton celtidifolius* (folhas e casca), *Schinus molle* (partes aéreas), *Rheedia gardneriana* (folhas), *Spilantes oleraceae* (toda planta), *Polygala sabulosa* (toda planta), *Polygala paniculata* (toda planta), *Baccharis pseudotenuifolia* (partes aéreas), *Bauhinia forficata* (folhas) e *Eugenia uniflora* (folhas) foram obtidas de exemplares coletados em seu habitat natural. O extrato bruto de *Baccharis platypoda* (partes aéreas) foi fornecido pelo Professor Anselmo A. de Moraes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a amostra de *Trichilia catigua* (casca) foi gentilmente fornecida pelo Laboratório Catarinense de Joinville.

Para a preparação dos extratos brutos, amostras de cada planta foram secas, trituradas e submetidas a maceração com solução hidroalcoólica (etanol/água 4:1) durante 14 dias. Os extratos assim obtidos foram filtrados em papel filtro comum, e o solvente completamente removido por evaporação à vácuo (45°C) resultando na obtenção dos respectivos extratos brutos secos, os quais foram avaliados quanto a sua atividade tripanocida contra formas de cultura de *T.*

cruzi. Os extratos brutos que apresentaram promissora atividade tripanomicida foram submetidos a um pré-fracionamento por extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila). Com este fracionamento, a partir dos extratos brutos de *T. catigua*, *P. sabulosa*, *P. paniculata*, *P. cyparicias* e *B. platypoda*, obteve-se as respectivas frações Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e Aquosa, que também foram submetidos aos ensaios de atividade tripanocida.

Seguindo os procedimentos de isolamento biomonitorado para a caracterização dos princípios ativos, as frações acima que mostraram atividade contra as formas de cultura de *T. cruzi*, foram submetidos a sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna de Sílica Gel e eluídas num sistema de diferentes gradientes de polaridade. As frações contendo os princípios ativos foram purificadas por recristalizações no solvente apropriado ou por recromatografia em coluna Flasch. A caracterização estrutural dos princípios ativos isolados foi realizada através da avaliação de suas propriedades físicas e espectroscópicas incluindo aí as análises por Infra-Vermelho, Espectrometria de Massas, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), de Carbono 13 (RMN ^{13}C) e demais técnicas de ressonância uni e bi dimensionais tais como APT, HMBC, HMQC, NOEDIF e INEPT Seletivo. Os procedimentos de extração, fracionamento, isolamento dos princípios ativos e a identificação química dos compostos isolados foram realizados no laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC sob a orientação do Professor Moacir Geraldo Pizzolatti.

Extratos brutos, frações semipurificadas e compostos isolados foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/ml, filtrados em membrana de 0,45 μm e mantidos a 4°C até o uso nos bioensaios.

Como drogas controle foram utilizados o cristal violeta na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ solubilizado em tampão salina fosfato (PBS pH 7,2) e o benznidazol (Rochagan®) na concentração de 50 mg/ml solubilizado em DMSO.

4.2 Parasitas

Neste estudo foram utilizadas formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas sangüíneas e amastigotas de cultivo celular da cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenweig, 1953) mantidos no Laboratório de Protozoologia da UFSC.

4.2.1 – Formas epimastigotas.

Formas epimastigotas obtidos na fase exponencial de crescimento em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) foram lavados 3 vezes em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a 1.500 x g/10 minutos a temperatura ambiente e suspensos em meio LIT suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). O número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2×10^6 células/ml e os parasitas mantidos a 4°C até o seu uso.

4.2.2 – Formas tripomastigotas.

Formas tripomastigotas sangüíneas foram obtidas de camundongos Swiss primoinfectados no 7° dia de infecção. Para tanto, animais infectados foram

anestesiados com éter e sangrados pelo plexo retroorbital com auxílio de uma pipeta Pasteur contendo citrato de sódio 3,8% como anticoagulante. O sangue de 3 a 5 animais foi coletado em tubo plástico contendo 1 ml da mesma solução anticoagulante. O número de parasitas foi determinado pela técnica de Brener (1962), e a concentração ajustada para 1×10^6 tripomastigotas/ml pela adição de meio LIT acrescido de 10% de SBF. Os parasitas foram mantidos a 4°C até o seu uso.

4.2.3 – Formas amastigotas.

Formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram produzidas em monocamadas de células Vero cultivadas sobre lamínulas circulares de vidro de 12 mm em placas de cultura Costar® de 24 orifícios contendo meio DMEM suplementado com 5% de SBF e mantidas a 37°C e 5% de CO₂.

5. Bioensaios

5.1 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de extratos brutos, compostos semi-purificados e compostos isolados de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*.

Para a triagem inicial dos extratos brutos, os ensaios de atividade foram realizados em placas de culturas de 96 orifícios Nunc®, contendo concentrações em ordem decrescente: 500, 250, 100, 50, 10 e 5µg/ml dos extratos brutos

solubilizados em DMSO num volume final de 200 μ l contendo 2×10^6 epimastigotas/ml. Como controle, os parasitas foram incubados na ausência de drogas, na presença de 5% de DMSO e 200, 100, 50 e 25 μ g/ml de benznidazol. Após adição dos extratos as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 28°C por 72 horas e a seguir as placas foram avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitas. Após homogeneização com auxílio de micropipetador, o número de parasitas viáveis foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer.

As diferentes frações obtidas a partir de extratos ativos foram avaliadas como descrito anteriormente nas mesmas concentrações para determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), em relação as drogas controle. Compostos isolados obtidos das frações ativas foram avaliados como descrito anteriormente em concentrações seriadas decrescentes de: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 μ g/ml para determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), em relação ao benznidazol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes com o objetivo de avaliar a estabilidade dos compostos.

Para avaliar a atividade dos compostos semipurificados contra formas tripomastigotas sangüíneos, os ensaios foram realizados em placas de culturas de 96 orifícios Nunc[®], contendo concentrações em ordem decrescente: 2000, 1000, 500, 250, 100 μ g/ml dos compostos solubilizados em DMSO num volume final de 200 μ l contendo 1×10^6 tripomastigotas/ml. Como controle os parasitas foram incubados na ausência de drogas, na presença de 250 μ g/ml de cristal violeta e 5% de DMSO. As placas foram incubadas a 4°C por 72 horas e a atividade tripanocida

avaliada após 48 e 72 horas de exposição aos compostos. Para tanto, o volume de sangue foi cuidadosamente homogeneizado com auxílio de micropipeta e o número de parasitas determinado pelo método de Brener (1962) em uma amostra de 5 μ l de sangue. Compostos isolados foram avaliados como descrito anteriormente nas concentrações de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μ g/ml para determinação da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), em relação ao cristal violeta. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes com o objetivo de avaliar a estabilidade dos compostos.

5.2 Avaliação do efeito hemolítico dos compostos.

Os efeitos hemolíticos das frações e compostos isolados em diferentes concentrações foram avaliados através da dosagem da hemoglobina do sangue total de camundongos e a dosagem da hemoglobina plasmática nas amostras após incubação de 72 horas com os compostos.

O teste baseia-se no método da cianometahemoglobina onde, uma amostra de 10 μ l de sangue total ou plasma é diluída em 990 μ l de uma solução isotônica (Solução de Drabkins). Na presença 25 μ l de um agente oxidante (Cianeto de potássio), a hemoglobina liberada é convertida em um composto estável (cianometahemoglobina), cuja concentração é diretamente proporcional a concentração de hemoglobina em G/dl, na leitura espectrofotométrica a 540 nm. A concentração de hemoglobina foi calculada no sangue total e no plasma do sangue centrifugado das diferentes concentrações das amostras ensaiadas contra formas tripomastigotas sangüíneos e o resultado foi expresso em % de hemólise.

5.3 Infectividade para camundongos de formas tripomastigotas tratados com diferentes compostos.

O volume restante de sangue tratado com compostos (0,1 ml) onde não foram observados parasitas na contagem, foi inoculado por via intraperitoneal em grupos de 2 camundongos Swiss jovens. Os animais foram mantidos no infectório em condições controladas e a parasitemia avaliada através de exame a fresco do sangue obtido da cauda do animal em intervalos de 2 dias a partir do 7º dia após inoculação. No 30º dia pós-inoculação os animais negativos foram anestesiados com éter e 0,5 ml de sangue obtido pelo plexo retrorbital em condições assépticas foi utilizado para realização de hemocultura em meio LIT. As culturas foram incubadas a 28°C e examinadas em intervalos de 15 dias até o 90º dia (Luz, 1999).

5.4 Estudo da citotoxicidade de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT.

Neste trabalho a atividade mitocondrial foi avaliada através da técnica do MTT conforme descrito por Loosdrecht *et al.* (1991) e modificada por Sieuwerts *et al.* (1995). O composto 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)(Sigma) foi dissolvido em PBS na concentração de 2 mg/ml e mantido a -20°C até o uso.

A linhagem de células epiteliais de rim de macaco (*Cercopithecus aethiops*) - Vero (ATCC-CCL81) depositada no Criobanco do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, foi cultivada em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 5ml de meio DMEM pH 7,4 suplementado

com 5% de SBF, 2mM de L glutamina, acrescido de 100 µg/ml de estreptomicina e 100 UI/ml de penicilina, mantida em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ e repicadas semanalmente.

Para a montagem dos experimentos, as monocamadas foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina 0,25% + EDTA 0,1% por 5 minutos a 37°C, transferidas imediatamente para tubos plásticos estéreis de 15 ml contendo meio DMEM + 5% de SBF e centrifugadas a 250xg/5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, as células suspensas em 1 ml de meio DMEM, o número de células determinado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2x10⁴ células/ml. A viabilidade celular foi avaliada pela adição do corante vital (azul de tripan 0,02%). Cem microlitros da suspensão celular foi cultivada em placas de culturas de 96 orifícios Nunc[®] em volume final de 200 µl de meio DMEM a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. A seguir foram adicionados os compostos isolados em concentrações decrescentes (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12µg/ml) e as células mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 72 horas. Como controle as monocamadas foram incubadas com as mesmas concentrações de benznidazol e com DMSO 1%. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado, adicionado 100µl de uma solução de MTT a 2 mg/ml em PBS e a placa novamente incubada a 37°C por 4 horas. A seguir o sobrenadante foi retirado, adicionado 100µl de DMSO puro a cada orifício da placa e com auxílio de micropipetador as células foram rompidas para solubilização do formazan. A densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek, Elx800) a 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de citotoxicidade.

5.5 Avaliação da atividade tripanocida de compostos isolados contra formas amastigotas de *T. cruzi*.

A avaliação da atividade tripanocida contra amastigotas, foi ensaiada em duas linhagens celulares distintas: Vero e macrófagos peritoneais de camundongos. Para tanto, 100 μ l de uma suspensão de células Vero contendo 5×10^4 células/ml foi cultivada sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro em placas de 24 orifícios na presença de um volume final 0,5 ml de meio DMEM em cada orifício e as placas mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas.

Macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem Swiss foram obtidos através da inoculação intraperitoneal de 5 ml de PBS estéril, acrescida de 10 unidades de heparina/ml e 100 μ g/ml de ampicilina sódica. Após massagem abdominal, as células foram aspiradas assepticamente com seringa, depositadas em tubo Falcon de 15ml e mantidas em banho de gelo. A suspensão celular foi centrifugada a 250g/5min a temperatura ambiente e ressuspendida em meio de cultura DMEM pH 7,4 + 10% de SBF. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, testadas pelo Trypan blue 0,02% e a concentração ajustada para 5×10^6 células/ml. A seguir 100 μ l de uma suspensão celular foi cultivada sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro em placas de 24 orifícios na presença de um volume final 0,5 ml de meio DMEM em cada orifício e as placas mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 12 horas.

A seguir as monocamadas foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* derivados de cultura celular obedecendo uma razão parasita/célula de

(5:1) e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 4 horas. Após a infecção as monocamadas foram lavadas para remoção dos parasitas não aderidos, adicionado 0,5 ml de meio e a células mantidas como descrito anteriormente. Vinte quatro horas após a infecção, diferentes concentrações dos compostos prenilcumarina e stirilpirona 6 (50 e 25 µg/ml), stirilpirona 2 e taxifolina (100 e 50 µg/ml) foram adicionados e as células cultivadas por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Como controle, monocamadas infectadas foram tratadas com benznidazol na concentração de 100 e 50µg/ml e/ou cultivadas na ausência de drogas. Diariamente foram realizadas observações em microscópio invertido para avaliação da integridade do tapete celular. Após 72 horas de cultivo, o meio de um poço para cada concentração foi retirado e adicionado uma solução de azul de trypan 0,02% para avaliação da viabilidade celular. A seguir as lamínulas foram retiradas, lavadas em PBS, fixadas pelo Bouin por 15 minutos, lavadas em água destilada e coradas pela técnica do Giemsa lento por 24 horas. Após a coloração, as células foram lavadas em água destilada, descoradas em álcool 70%, diferenciadas em acetona-xilol 7:3 e 3:7 durante 1 minuto e, em seguida montadas em bálsamo sintético. Para determinação da taxa de infecção 300 células foram contadas randomicamente e o número de parasitas intracelulares nas diferentes concentrações dos compostos foi determinado em microscópio óptico em objetiva de 100X. Adicionalmente, monocamadas tratadas e não tratadas foram acompanhadas por 120 h para avaliação do ciclo intracelular do parasita.

5.6 Inibição da tripanotiona redutase

Para analisar a possível ação dos compostos ativos sobre a tripanotiona redutase foi utilizado o método descrito por Borges *et al.* (1995). Para tanto, a tripanotiona redutase recombinante na concentração de 18,4 nM em tampão de reação contendo 20 mM de HEPES, 30 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA (pH 7,4), acrescido de 150 μ M de NADPH 500 μ l foi incubada a 27°C por 30 minutos com 100 μ g/ml dos diferentes compostos solubilizados em DMSO, antes da adição do substrato tripanotiona disulfida (50 μ M). A atividade enzimática foi determinada espectrofometricamente a 340 nm e o resultado expresso em porcentagem de redução da tripanotiona redutase em relação ao controle, DMSO 5% (Zani *et al.*, 1997).

6. Análise estatística

Os valores de CI_{50} dos extratos brutos, frações e compostos foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat[®]. Os resultados foram expressos como média das CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de pelo menos 3 experimentos independentes acompanhada de seus respectivos limites de confiança de 95%. O teste t de Student foi utilizado para comparação das médias das CI_{50} das frações e compostos em relação ao benznidazol. Foram considerados significantes os valores quando $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Atividade tripanocida de extratos brutos obtidos de plantas contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi*.

A atividade tripanocida de 14 extratos brutos obtidos de 13 espécies de plantas da Floresta da Mata Atlântica foram testados *in vitro* contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade tripanocida *in vitro* de extratos brutos de plantas, de benznidazol contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Espécie	Parte da planta	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Croton celtidifolius</i>	Folhas	250
<i>C. celtidifolius</i>	Casca	250
<i>Trichilia catigua</i>	Casca	10
<i>Schinus molle</i>	folhas	50
<i>Spilantes oleraceae</i>	Casca	Sem atividade
<i>Rheedia gardneriana</i>	Folhas	Sem atividade
<i>Polygala sabulosa</i>	planta toda	5
<i>P. cyparicias</i>	Planta toda	10
<i>P. paniculata</i>	Planta toda	50
<i>Baccharis pseudotenifolia</i>	Partes aéreas	50
<i>B. platypoda</i>	Partes aéreas	10
<i>Bauhinia forficata</i>	Folhas	Sem atividade
<i>Eugenia jambolana</i>	Folhas	5
<i>E. uniflora</i>	Folhas	50
Benznidazol		13

Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Dos 14 extratos 11 (78,6%), apresentaram atividade tripanocida sendo que destes, 5 apresentaram atividade tripanocida com $CI_{50} \leq 10\mu\text{g/ml}$ e, 3 (21,4%), não foram ativos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Dois extratos de *Croton celtidifolius* que mostraram uma CI_{50} de 250 $\mu\text{g/ml}$ no primeiro ensaio, perderam sua atividade tripanocida no segundo ensaio realizado 3 semanas após o primeiro. As demais amostras mostraram-se estáveis mesmo quando testadas 3 meses após a solubilização inicial. O benznidazol apresentou uma CI_{50} de 13,6 $\mu\text{g/ml}$ e a presença de 5% de DMSO não interferiu no crescimento dos parasitas.

7.2 Atividade tripanocida de compostos semipurificados obtidos de plantas contra formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* e percentagem de hemólise.

Os extratos brutos hidroalcoólico das plantas que apresentaram atividade tripanocida ($CI_{50} \leq 10\mu\text{g/ml}$) foram submetidos aos fracionamentos por partição em diferentes sistemas de solventes (hexano, diclorometano, butanol, acetato de etila e água) e as respectivas frações testadas contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Das 17 frações testadas, 13 (76%) apresentaram promissora atividade tripanocida ($CI_{50} \leq 10,8\mu\text{g/ml}$) e duas 11,8% não foram ativas (Tabela 3). Treze frações foram também ensaiadas contra tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* e contra hemáceas de camundongo para determinação da percentagem de hemólise (Tabela 3). A CI_{50} destas amostras variou de 1016,1 a 147,6 $\mu\text{g/mL}$ e a percentagem de hemólise variou 20 a 3%. Seis entre 13 frações mostraram uma $CI_{50} \leq 302,7 \mu\text{g/mL}$ para formas tripomastigotas sanguíneas. Considerando as duas

formas do parasita, as frações mais ativas foram a diclorometano (PSD) de *P. sabulosa*, aquosa (PCA), acetato de etila (PCAet) e diclorometano (PCD) de *P. cyparicias*, e diclorometano (TCD) de *T. catigua*. A fração hexânica de *P. sabulosa* e as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa de *B. platypoda* não foram testadas contra tripomastigotas sanguíneas. Ensaio de atividade repetidos em diferentes intervalos de dois meses mostraram resultados idênticos sugerindo uma boa estabilidade das amostras após a solubilização.

Tabela 3. Atividade tripanocida *in vitro* e *ex vivo* de frações semipurificadas de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Espécie	Fração	CI ₅₀ (µg/ml)		Hemólise (%)
		Epimastigota	Tripomastigota	
<i>Polygala sabulosa</i>	Aquosa	S/ atividade	748,2 (708,6 – 790,1)	9
	Acetato de etila	10,3 (5,8 - 18,4)	993,6 (845,2 – 1168,1)	3
	Diclorometano	10,4 (5,1 - 21,1)	147,6 (96,9 – 224,9)	3
	Hexano	1,1 (0,6 - 2,1)	NT	NT
<i>P. cyparicias</i>	Acetato de etila	5,1 (2,5 - 10,6)	302,0 (266,7 – 342,1)	10
	Diclorometano	5,3 (3,3 - 8,5)	256,4 (233,8 – 281,2)	10
	Hexano	248,7 (230,1 - 268,8)	300,7 (237,9 – 379,95)	10
	Aquosa	5,2 (3,1 - 8,7)	201,6 (154,5 – 263,2)	10
<i>P. paniculata</i>	Aquosa	10,3 (6,7 - 15,6)	602,9 (561,1 – 647,8)	3
	Butanol	10,5 (7,6 - 14,6)	605,3 (566,1 – 647,2)	3
	Hexano	5,4 (3,7 - 7,7)	499,4 (428,1 – 582,5)	20
<i>Trichilia catigua</i>	Diclorometano	10,1 (6,9 - 15,0)	299,2 (278,9 – 321,0)	6
	Aquosa	S/ atividade	630,3 (586,7 – 681,3)	14
	Acetato de etila	50,5 (41,7 - 61,2)	1016,1 (878,6 – 1175,1)	10
<i>Baccharis</i>	Diclorometano	10,3 (6,4 - 16,6)	NT	NT
<i>platypoda</i>	Acetato de etila	10,5 (7,6 - 14,6)	NT	NT
	Aquosa	10,8 (7,9 - 14,6)	NT	NT
	Benznidazol	13,6 (8,5 - 21,6)	-	-

Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata acompanhada do seu respectivo intervalo de confiança de 95%. NT: não testado

O benznidazol apresentou uma CI_{50} de 13,6 $\mu\text{g/ml}$ para formas epimastigotas e o cristal violeta na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ promoveu a morte de 100% dos tripomastigotas sangüíneos após 48 horas de incubação a 4°C. A presença de 5% de DMSO não interferiu no crescimento e/ou na morfologia e motilidade dos parasitas.

7.3 Atividade tripanocida de compostos isolados contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de *T. cruzi* e percentagem de hemólise.

A Figura 1 mostra os compostos obtidos através do fracionamento cromatográfico das frações ativas e a Tabela 4 e as Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados de atividade dos diferentes compostos frente a formas epimastigotas e tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Quatro de nove compostos testados (44%) apresentaram importante atividade ($CI_{50} \leq 43,3\mu\text{g/mL}$) contra formas epimastigotas sendo os compostos prenilcumarina e stirilpirona-2 os mais ativos (CI_{50} de 10,5 e 13,7 $\mu\text{g/mL}$). Três compostos (33,3%) mostraram significativa atividade ($CI_{50} \leq 636,4\mu\text{g/mL}$) contra tripomastigotas sangüíneas, sendo o composto prenilcumarina o mais ativo (CI_{50} de 88,2 $\mu\text{g/mL}$). A percentagem de hemólise causada pelos compostos variou de 2 a 6%. Em todas as amostras de sangue infectado tratadas com compostos nas concentrações \geq a 500 mg/ml, não foram observados parasitas na contagem e no exame a fresco do material.

O fracionamento cromatográfico da fração Diclorometano de *P. sabulosa* resultou no isolamento de 6-preniloxi-7-metoxi cumarina (prenilcumarina) (1) e 4-metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-14-metoxidihidrostiril)-2-pirona (stirilpirona 2) (2). O

fracionamento cromatográfico da fração Acetato de Etila de *P. sabulosa* resultou no isolamento de 4-metoxi-6-(11,12-dimetilstiril)-2-pirona (stirilpirona 6) (3) e Quercetina-3-O-Glucosideo (Quer-3-Glu) (4). O fracionamento cromatográfico da fração Acetato de Etila de *B. platypoda* resultou no isolamento do flavonóide taxifolina-3-acetil (5) e o da fração Acetato de Etila de *T. catigua* na flavolignana (6). O fracionamento cromatográfico da fração Hexano e Acetato de Etila de *P. paniculata* resultou no isolamento da prenilcumarina, febalosina (7) e do derivado di-hidroxi da febalosina (8) e da fração Acetato de Etila de *E. jambolana* do flavonóide glicosilado miricitrina (9) (Figura 1).

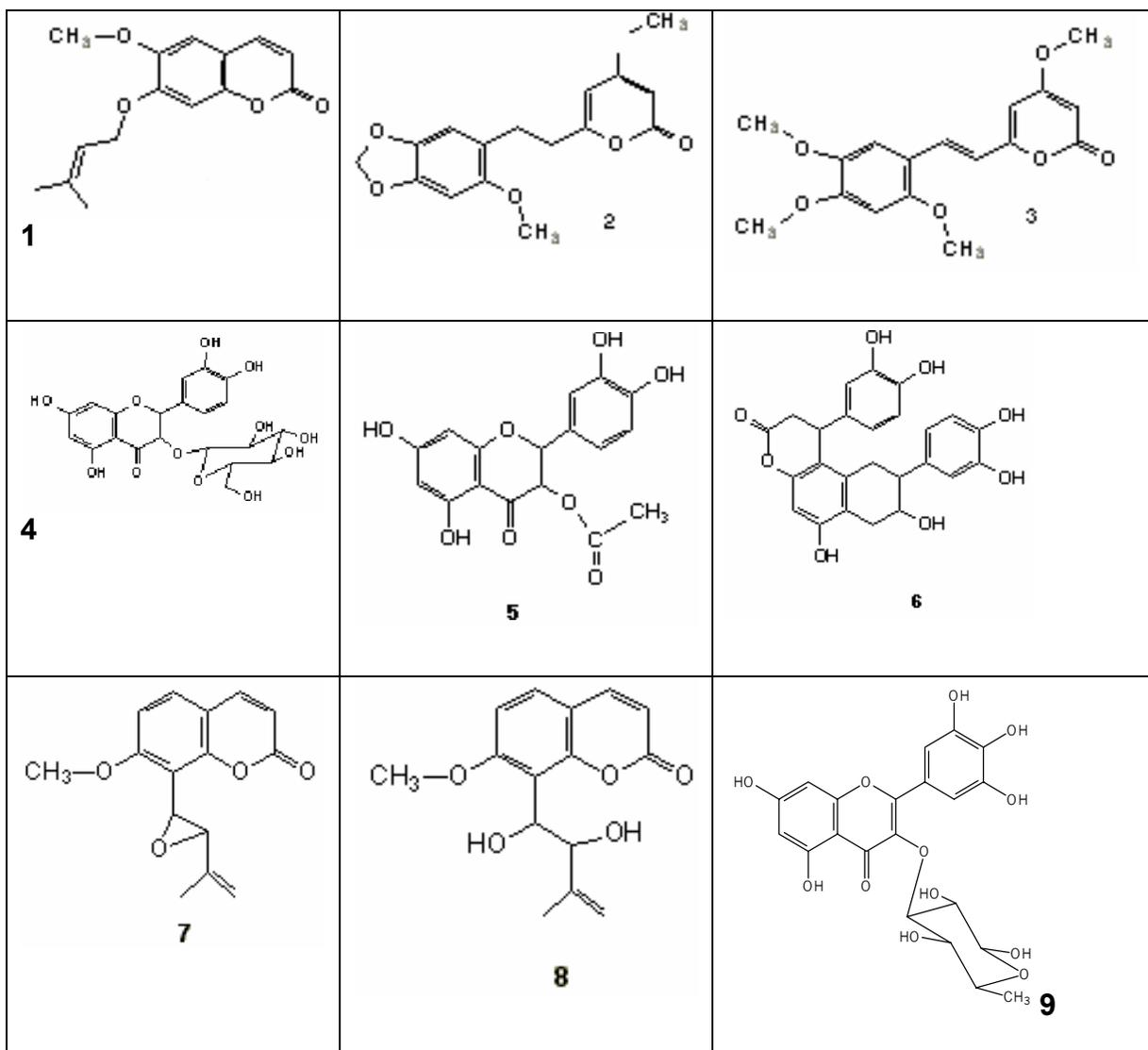


Figura 1. Estrutura química dos compostos avaliados. 1= 6-Preniloxi-7-metoxi cumarina (prenilcumarina), 2= 4-Metoxi-6-(11,12-metilenedioxi-14-metoxidihidrostiril)-2-pirona (stirilpirona 2), 3= 4-Metoxi-6-(11,12-dimetilstiril)-2-pirona (stirilpirona 6), 4= Quercetina-3-O-Glucosideo; 5= Taxifolina-3-acetil; 6= Flavolignana; 7= Febalosina; 8= Derivado di-hidroxi da febalosina e 9= Miricitrina.

Tabela 4. Atividade tripanocida *in vitro* e *ex vivo* de compostos puros isolados de plantas contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Espécie	Composto	CI ₅₀ (µg/ml)		Hemólise (%)
		Epimastigota	Tripomastigota	
	Prenilcumarina	10,5 (4,9 - 22,0)	88,2 (57,3 - 135,7)	3
<i>Polygala</i>	Stirilpirona-2	13,7 (6,3 - 29,9)	636,3 (601,9 - 672,9)	2
<i>sabulosa</i>	Stirilpirona-6	25,9 (17,8 - 37,5)	1008,6 (919,7 - 1106,0)	6
	Quer-3-glu	326,3 (244,5 - 435,5)	945,6 (845,6 - 1057,2)	5
<i>Polygala</i>	Febalosina	247,5 (211,1 - 290,5)	502,3 (457,2 - 551,7)	5
<i>paniculata</i>	Dihidroxi-febalosina	289,6 (249,6 - 335,9)	1185,8 (1179,8 - 1191,8)	4
<i>Trichilia</i>	Flavolignana	332,4 (294,4 - 375,2)	1038,7 (898,6 - 1200,7)	5
<i>catigua</i>				
<i>Baccharis</i>	Taxifolina-3-acetil	43,3 (30,2 - 61,9)	698,3 (632,7 - 770,6)	4
<i>platypoda</i>				
<i>Eugenia</i>	Miricitrina	249,9 (221,1 - 282,4)	1409,3 (1314,5 - 1510,9)	5
<i>jambolana</i>				
	Benznidazol	13,6 (8,5 - 21,6)		

Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata com seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

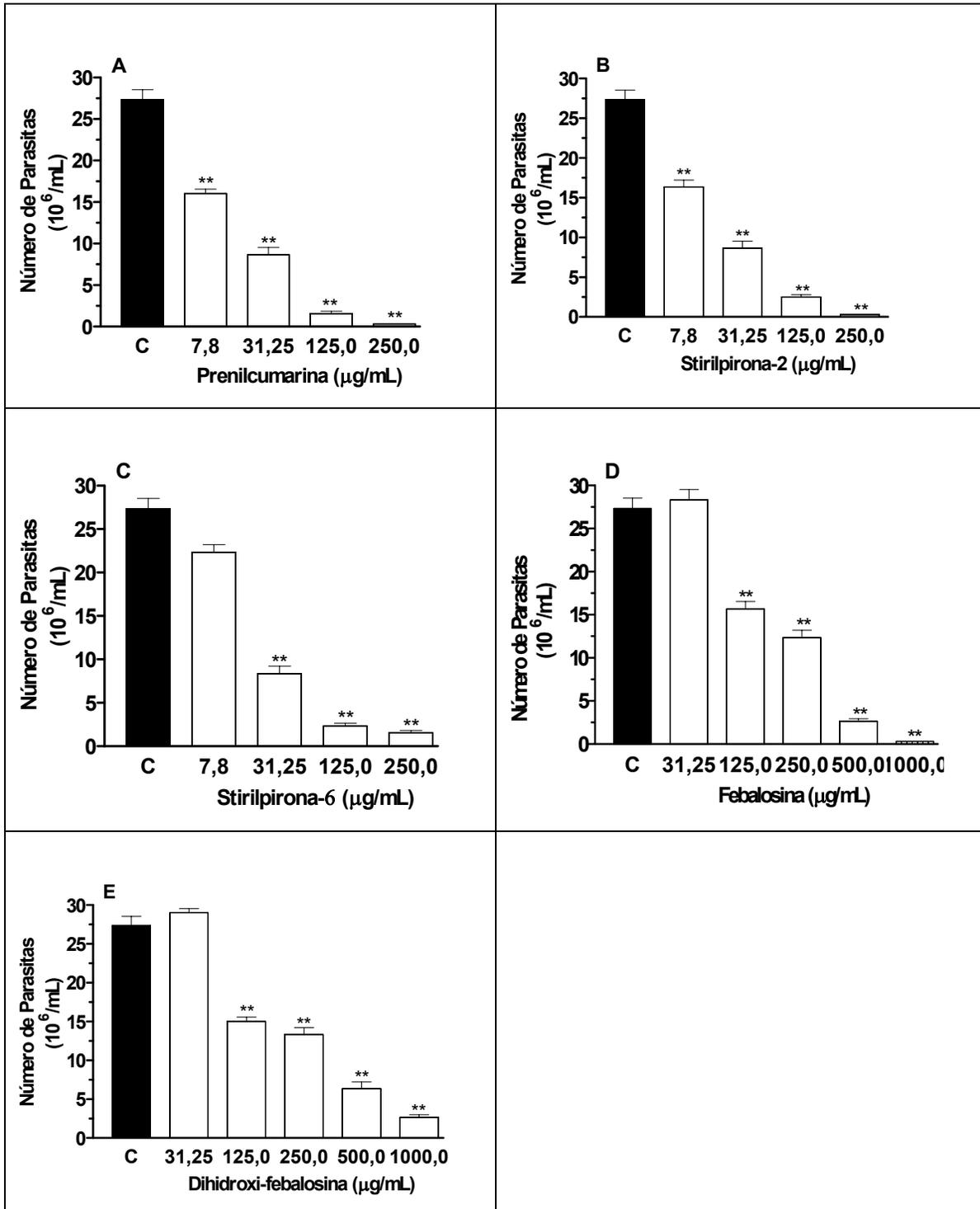


Figura 2 Efeito dose-dependente de compostos contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*: A- Prenilcumarina, B- Stirilpirona-2, C- Stirilpirona-6, D- Febalosina, E- Dihidroxi-febalosina. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ** Resultado foi significativamente diferente quando comparado ao valor do Controle (P < 0,01).

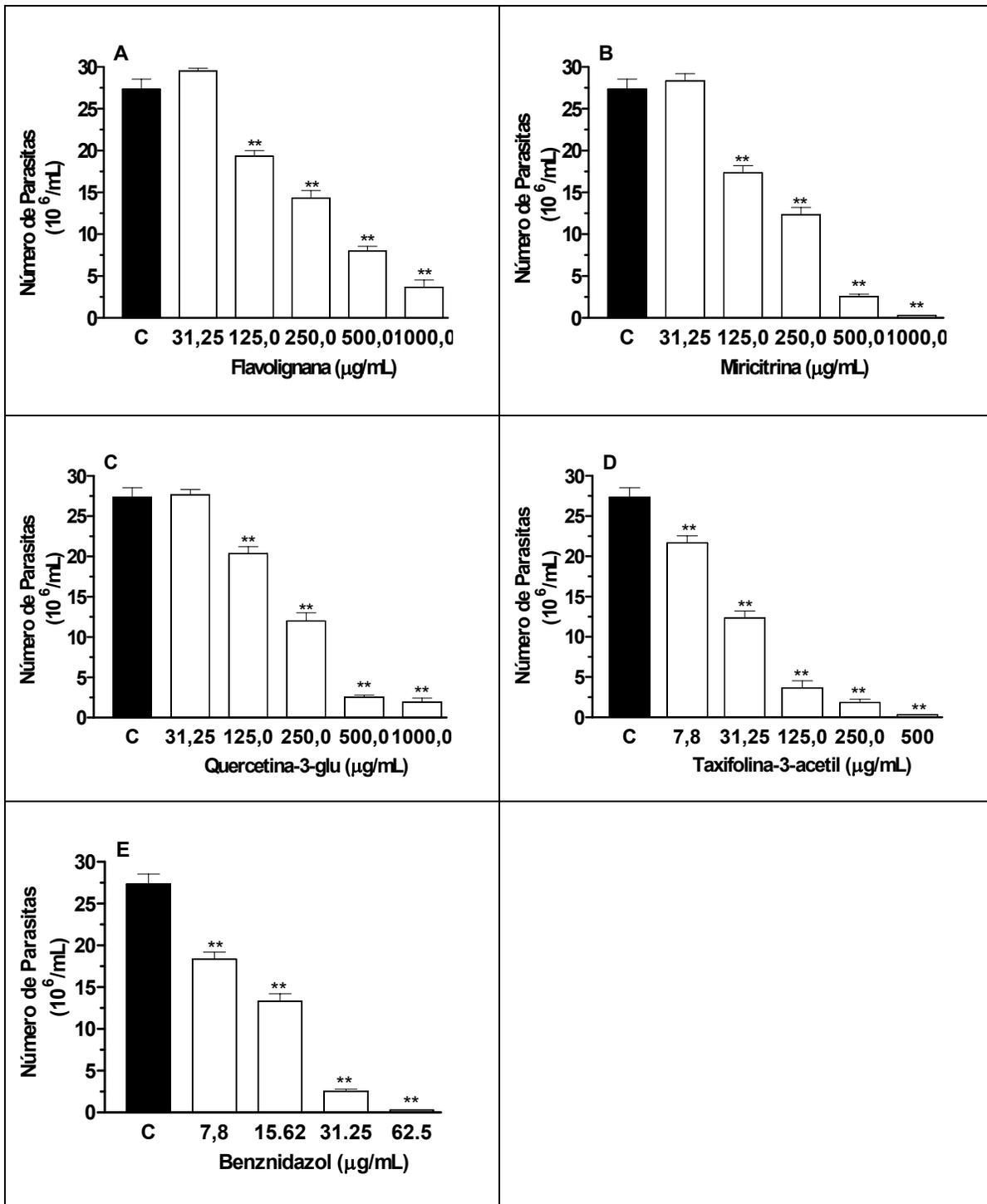


Figura 3 Efeito dose-dependente de compostos contra formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*: A- Flavolignana, B- Miricitrina, C- Quercetina-3-glu, D-Taxifolina-3-acetil, E- Benznidazol. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

** Resultado foi significativamente diferente quando comparado ao valor do Controle ($P < 0,01$).

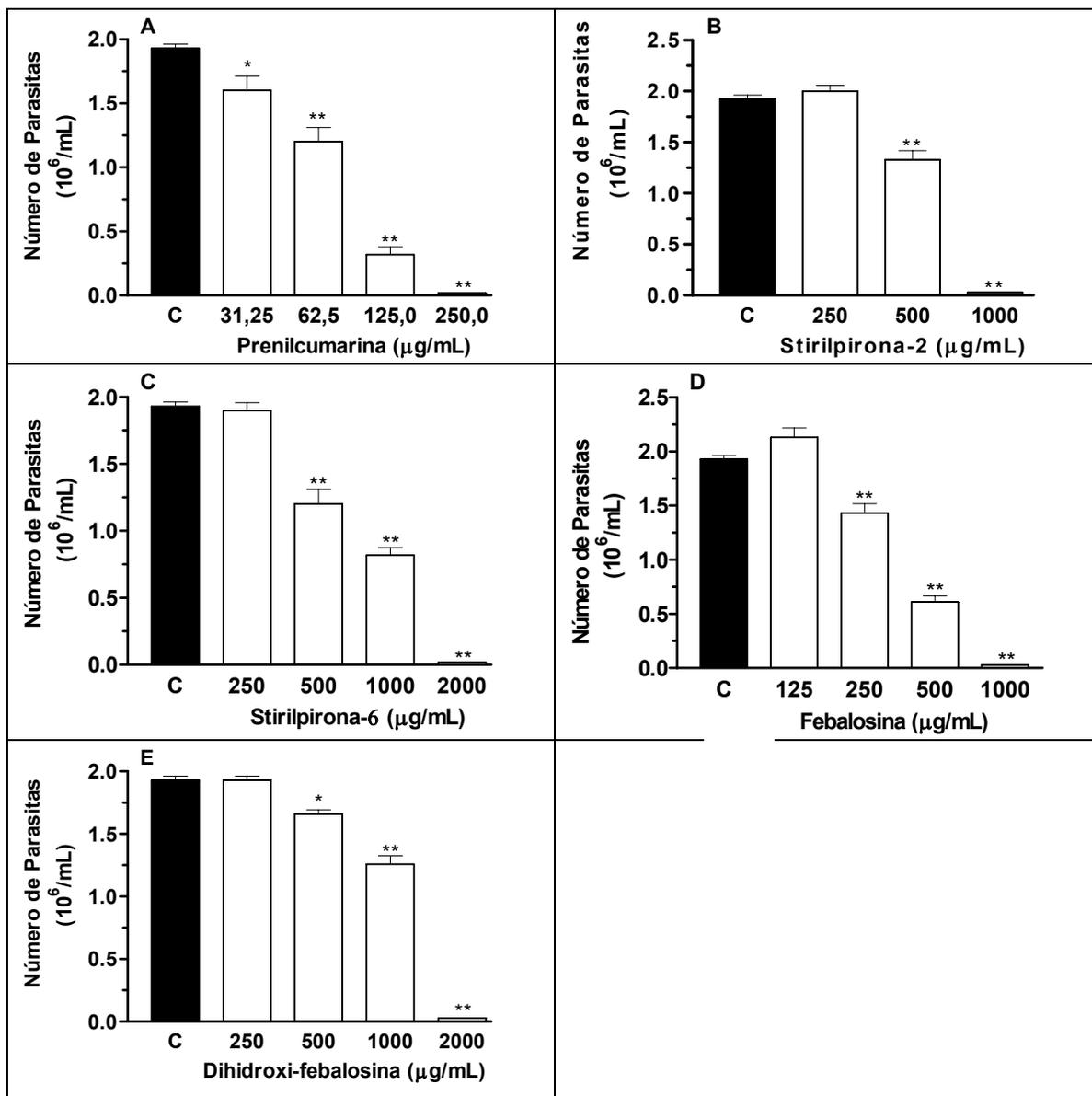


Figura 4 Efeito dose-dependente de compostos contra formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações, após 48 horas de incubação a 4⁰C: A- Prenilcumarina, B- Stilipirona-2, C –Stilipirona-6, D- Febalosina, E- Dihidroxi-febalosina. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ** Resultado foi significativamente diferente quando comparado ao valor do Controle (P< 0,01).

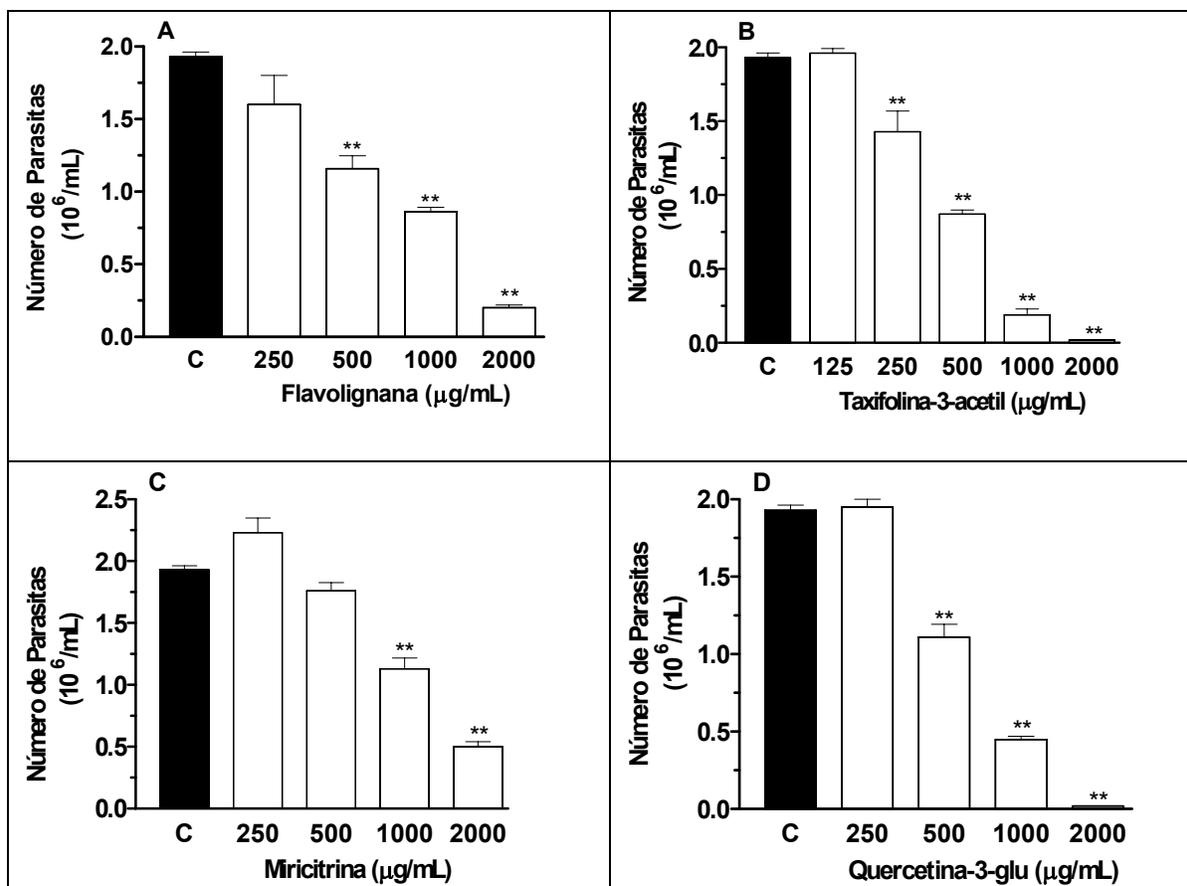


Figura 5. Efeito dose-dependente de compostos contra formas tripomastigotas sangüneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações, após 48 horas de incubação a 4^oC: A- Flavolignana, B- Taxifolina-3-acetil, C- Miricitrina e D- Quercetina-3-glu. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ** Resultado foi significativamente diferente quando comparado ao valor do Controle (P< 0,01).

7.4 Comprovação *in vivo* da atividade tripanocida dos compostos.

Para comprovar a efetividade dos compostos, o sangue infectado tratado por 48 horas a 4°C foi inoculado intraperitonealmente em grupos de 2 camundongos Swiss jovens. O exame a fresco do sangue mostrou-se positivo em todos animais inoculados a exceção daqueles inoculados com sangue tratado com cristal violeta (250 µg/ml) ou com o composto prenilcumarina a (500 µg/ml) (Tabela 5). A hemocultura dos animais negativos para *T. cruzi* no exame a fresco realizada 30 dias após a inoculação também foi negativa.

Tabela 5. Parasitemia sangüínea e hemocultura de camundongos inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de sangue infectado pelo *Trypanosoma cruzi* incubado a 4°C por 48 horas com diferentes concentrações dos compostos testados.

Composto	Concentração (µg/ml)	Parasitemia	Hemocultura
Cristal violeta	250	-	Negativa
Prenilcumarina	500	-	Negativa
	250	+	NR
Stirilpirona 6	2000	+	NR
Stirilpirona 2	2000	+	NR
	1000	+	NR
Dihidroxi-febalosina	2000	+	NR
Taxifolina-3-acetil	2000	+	NR
Quer-3-glu	2000	+	NR
Febalosina	1000	+	NR
	500	+	NR

Os resultados representam a média de parasitemia realizadas em 2 camundongos.

7.5 Avaliação da citotoxicidade para células Vero de compostos ativos contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sangüíneos da cepa Y de *T. cruzi*.

A incubação das células com diferentes concentrações dos compostos ativos mostrou distintos graus de citotoxicidade. Os resultados da citotoxicidade celular estão apresentados na Figura 6. Os compostos induziram citotoxicidade de forma dose dependente para todos os compostos, sendo que a prenilcumarina que foi o mais ativo contra tripomastigotas sangüíneos foi também o mais citotóxico para células Vero.

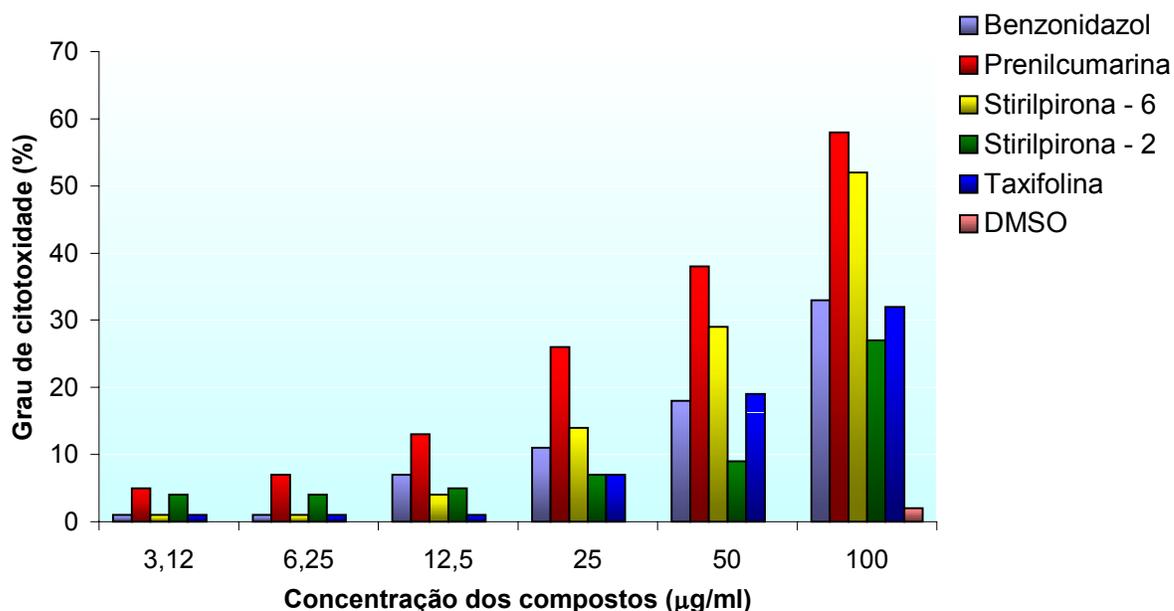


Figura 6. Taxa de citotoxicidade dose-dependente de compostos obtidos de plantas para as células Vero em diferentes concentrações. Os resultados representam a média de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. 52

7.6 Atividade tripanocida *in vitro* de compostos contra formas intracelulares de *T. cruzi*.

Monocamadas de células Vero e macrófagos peritoneais de camundongos infectadas pelo *T. cruzi* foram tratadas por 72 e 120 horas com duas concentrações dos compostos mais ativos (prenilcumarina, stirilpirona-2, stirilpirona-6 e taxifolina) contra tripomastigotas sanguíneos. A taxa de infecção celular e o número de parasitas por célula estão demonstradas na tabela 6.

7.7 Atividade inibitória da tripanotiona redutase

Os compostos prenilcumarina, taxifolina-3-acetil e stirilpirona 2, e stirilpirona 6 solubilizado em DMSO na concentração de 100 µg/ml foram testados quanto a sua atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase de acordo com a técnica descrita por Borges *et al.*, (1995). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto René Rachou em Belo Horizonte. As percentagens de inibição da tripanotiona redutase confirmadas em dois ensaios independentes foram de 13% para a prenilcumarina; 26% para stirilpirona 2; 30% para sitirilpirona 6 e 21% para taxifolina-3-acetil.

Tabela 6. Taxa de infecção e número de parasitas intracelulares em células Vero e macrófagos peritoneais de camundongos infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após 72 horas de tratamento com diferentes compostos.

Composto	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Linhagem celular Vero		Macrófago	
		% média de células infectadas	Número de parasitas/célula	% média de células infectadas	Número de parasitas/célula
Benznidazol	100	0	0	0	0
	50	-	-	4	$2,7 \pm 1,5$
Prenilcumarina	50	4	$4 \pm 1,5$	7	$4,5 \pm 1,9$
	25	-	-	9	$5,3 \pm 1,8$
Stirilpirona 6	50	14	$8 \pm 1,9$	16	$5,4 \pm 2,4$
	25	-	-	18	$6,1 \pm 2,1$
Stirilpirona 2	100	5	$4,2 \pm 1,8$	10	$5,1 \pm 2,7$
	50	-	-	13	$6,6 \pm 2,5$
Taxifolina-3-acetil	100	16	6	13	$4,4 \pm 2,4$
	50	-	-	17	$7,5 \pm 2,6$
Controle		16	$8,0 \pm 3,1$	18	$7,9 \pm 3,1$

8. DISCUSSÃO

As plantas constituem-se em uma importante fonte de novas drogas e apresentam-se como alternativa viável para o tratamento de várias enfermidades no contexto da medicina moderna. Embora um considerável número de drogas atualmente disponível para o tratamento de várias enfermidades sejam derivadas de produtos naturais, apenas uma pequena percentagem das cerca de 250 mil espécies de plantas tem sido investigadas em suas propriedades, biológicas, químicas e farmacológicas (Soerjato, 1996).

Dentre as várias doenças que acometem o homem, as parasitoses e notadamente as protozooses, são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Neste contexto, a doença de Chagas representa um grande impacto social e econômico nos países da América Latina, onde aproximadamente 18 milhões de indivíduos encontram-se infectados pelo parasita (WHO, 1993). As alternativas para o tratamento específico da infecção pelo *T. cruzi* atualmente disponíveis, resumem-se a uma droga, o benznidazol (Rochagam) que além de possuir baixa eficácia no tratamento da infecção crônica, apresenta consideráveis efeitos colaterais (Brener, 1984; De Castro, 1993).

No presente trabalho a atividade tripanocida de extratos brutos, frações semipurificadas e compostos puros de 13 espécies de plantas da mata atlântica (pertencentes a nove famílias) foram ensaiadas contra diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. Os bioensaios de extratos brutos mostraram que 11/14

(78,5%) dos extratos testados foram ativos contra formas epimastigotas de cultura de *T. cruzi* em concentrações inferiores a 250 µg/ml e, 3 (21,5%), não mostraram atividade. Dois extratos brutos (folhas e casca) de *Croton celtidifolius* ativos no primeiro ensaio contra formas epimastigotas (CI₅₀ de 250 µg/ml), perderam sua atividade tripanocida no segundo ensaio realizado 3 semanas após a solubilização inicial, demonstrando a instabilidade destes compostos. Resultados de perda de atividade foram observados anteriormente com extratos de plantas da família Rutaceae, Mafezoli et al. (2000) que foram testados contra formas tripomastigotas e com o composto cinabarina obtido do fungo *Pycnoporus sanguineus* (Marques, 2001) que foram testados contra formas epimastigotas. Os demais extratos mantiveram inalterada sua atividade tripanocida até 3 meses após a solubilização inicial quando foram realizados os últimos ensaios.

A atividade tripanocida em extratos brutos e compostos obtidos de plantas tem sido pesquisada por diferentes autores (Zani et al., 1995; Da Costa et al., 1996; Chiari et al., 1996; Sepúlveda-Boza & Cassels, 1996; Cáceres et al., 1998; Berger et al., 1998; Croft et al., 1998; Muelas-Serrano et al., 1999; Mafezoli et al., 2000; Duarte et al., 2002; Schinella et al., 2002).

Estudos *in vitro* utilizando extratos etanólicos de 52 espécies de plantas da família Asteraceae, mostraram que 10% dos extratos testados reduziram em 70% o número de tripomastigotas sangüíneos na concentração de 250µg/ml (Zani et al., 1995). Contrariamente, Chiari et al. (1996), avaliando extratos etanólicos de outras 47 espécies da família Asteraceae verificaram que 23% dos extratos foram ativos contra tripomastigotas sangüíneos de *T. cruzi* na concentração de 12

mg/ml. Mafezoli *et al.* (2000), estudando a atividade de extratos brutos de 9 espécies de plantas da família Rutaceae contra tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* verificaram que 8 de 32 extratos ocasionaram a mortalidade de 75% dos parasitas na concentração de 4 mg/ml. De 25 frações obtidas a partir dos extratos ativos, 6 ocasionaram uma redução $\geq 80\%$ no número de parasitas na concentração de 2mg/ml.

Berger *et al.* (1998), avaliando a atividade tripanocida de 5 espécies de plantas da Guatemala, utilizadas em medicina popular mostraram que as frações etanólica, hexânica e aquosa de *Neurolaena lobata* (Asteraceae) apresentaram IC₉₀ de 290,6; 152,4 e 551,8 µg/ml para epimastigotas de *T. cruzi*. Schinella *et al.* (2002), estudando a atividade de extratos brutos obtidos de 18 plantas e 2 fungos usados na medicina tradicional Chinesa e Mediterrânea, verificaram que 10 (50%) dos extratos inibiram o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* na concentração de 250µg/ml.

Em nossos experimentos extratos brutos de duas espécies da família Asteraceae (*B. pseudotenifolia* e *B. platypoda*) inibiram o crescimento de 50% das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* nas concentrações de 50 e 10µg/ml respectivamente. Extrato hidroalcolólico de casca de *T. catigua* (Meliaceae), e da planta inteira de *P. sabulosa* e de *P. cyparicias* (Polygalaceae), folhas de *E. jambolana* (Myrtaceae) ocasionaram a inibição do crescimento de 50% de formas epimastigotas em concentrações $\leq 10\mu\text{g/ml}$ e extratos de folhas de *S. molle* (Anacardiaceae), planta inteira de *P. paniculata* e folhas de *E. uniflora*

ocasionaram a inibição do crescimento de 50% dos parasitas na concentração de 50µg/ml. Estes resultados mostram que os extratos brutos das plantas aqui testadas apresentaram atividade tripanocida igual ou superior aquela descrita na literatura por outros autores. Extratos de partes aéreas de *Spilantes oleraceae* (Compositae), folhas de *Rheedia gardneriana* (Guttiferae) e folhas de *Bauhinia forficata* (Leguminosae) não foram ativas contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 2).

O fracionamento de 5 extratos mais ativos utilizando diferentes sistemas de solventes permitiu a obtenção de 17 frações. A atividade biológica ensaiada contra formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* mostrou que 15 (88,3%) das frações foram ativas contra epimastigotas (CI₅₀ de 248,7 a 1,1µg/ml), e das 13 frações testadas contra tripomastigotas as CI₅₀ variaram de (1016,1 a 147,6 µg/ml). As frações aquosas de *P. sabulosa* e *Trichilia catigua* não apresentaram atividade. De maneira geral não houve correlação positiva entre a atividade das frações contra epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos (Tabela 3). Este fato reflete que estas duas formas evolutivas do parasita apresentam metabolismo e características biológicas e bioquímicas distintas. A ausência de correlação entre atividade antiparasitária *in vitro* nestas duas formas evolutivas tem sido demonstradas anteriormente por outros autores (Croft, 1988; Chiari *et al.*, 1996).

As frações diclorometano, acetato de etila e aquosa de *B. platypoda* que apresentaram boa eficácia (inibição de 50% do crescimento de epimastigotas na concentração ≤ 10,8 µg/ml) não puderam ser ensaiadas contra formas

tripomastigotas devido a baixa quantidade de material disponível. As frações acetato de etila de *P. sabulosa* e *P. cyparicias*, as frações diclorometano de *P. sabulosa*, *P. cyparicias* e *T. catigua*, as frações aquosa e butanólica de *P. paniculata* apresentaram boa eficácia inibindo o crescimento de 50% das formas epimastigota em concentrações $\leq 10,5$ $\mu\text{g/ml}$. Entretanto, quando testadas contra tripomastigota as CI_{50} destas mesmas frações foram $\geq 147,6$ $\mu\text{g/ml}$. A fração hexânica de *P. cyparicias* e *P. paniculata* inibiu o crescimento de 50% das formas epimastigotas em concentrações de 248,7 e 5,4 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 3). Quando testadas contra tripomastigotas as CI_{50} foram de 300,7 e 499,4 $\mu\text{g/ml}$ para *P. cyparicias* e *P. paniculata* respectivamente. As frações diclorometano e acetato de etila de *T. catigua* exibiram CI_{50} de 10,1 e 50,5 $\mu\text{g/ml}$ para formas epimastigotas e quando testadas contra tripomastigotas as CI_{50} foram 299,2 e 1016,1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 3). Devido a pequena quantidade disponível a fração hexânica de *P. sabulosa* que inibiu o crescimento de 50% das formas epimastigotas na concentração de 1,1 $\mu\text{g/ml}$ e as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa de *B. platypoda* que apresentaram a CI_{50} de 10,3; 10,5 e 10,8 respectivamente não puderam ser ensaiada contra tripomastigotas. O estudo comparativo com os dados presente na literatura atual mostra uma acentuada atividade tripanocida das frações ensaiadas no presente trabalho. Os nossos resultados registram pela primeira vez a atividade tripanocida de extratos, frações e compostos obtidos de plantas da família Poligalaceae.

Na busca de novos quimioterápicos de relevância para o tratamento da doença de Chagas, vários compostos obtidos de plantas tem sido identificados e testados contra formas de cultura, tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, ou células de mamíferos infectadas com o parasita (Chiari *et al.*, 1991; Sepúlveda-Boza & Cassels, 1995; Da Costa *et al.*, 1996; Zani *et al.*, 1997). Entretanto, muitas vezes o uso destes compostos tem sido limitadas, devido à necessidade de altas concentrações para os testes biológicos, condições fármaco-cinéticos desfavoráveis e principalmente a baixa solubilidade (Sepúlveda-Boza & Cassels, 1995). Em nossos experimentos verificamos que alguns extratos e frações apresentaram baixa solubilidade nos solventes testados (DMSO e Tween 80) mesmo quando submetidos a sonicação. Marques (2001), estudando dois esteróis obtidos do fungo *Pycnopus sanguineus* verificou que o composto denominado Ga1 foi insolúvel em 5 diferentes sistemas de solvente testados.

Estudos fitoquímicos realizados pelo grupo multidisciplinar da UFSC tem demonstrado a presença de xantonas polihidroxiladas na fração acetato de etila de *P. cyparicias* (Pinheiro *et al.*, 1998), prenilcumarina e stirilpironas na fração diclorometano de *P. sabulosa* (Pizzolatti *et al.*, 2000) e flavolignananas em fração acetato de etila de *T. catigua* (Pizzolatti *et al.*, 2002). Estudos preliminares revelaram a presença de xantonas e flavonóides glicosilados na fração aquosa de *P. cyparicias*, esteróis e cumarinas na fração hexânica de *P. sabulosa*, fenill- γ -lactonas e esteróis na fração diclorometano de *T. catigua* (Pizzolatti *et al.*, 2002).

A atividade biológica de nove compostos ensaiada contra formas epimastigotas e tripomastigotas sangüíneos de *T. cruzi* mostrou que todas foram ativas contra epimastigotas com CI_{50} variando de 332,4 a 10,5 $\mu\text{g/ml}$ e contra tripomastigotas sanguineos com CI_{50} variando de 1409,3 a 88,2 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 4). Entretanto, se compararmos os resultados de atividade dos compostos com aqueles obtidos nas frações percebe-se uma perda de atividade de mais de 6 vezes. Este fato pode ser atribuído ao efeito sinérgico de diferentes componentes presentes nas frações e que foram perdidos durante o processo de purificação. Resultados semelhantes de perda de atividade foram anteriormente reportados por Mafezoli *et al.* (2000) avaliando extratos brutos e frações de plantas da família Rutaceae.

De maneira geral, não houve correlação entre a atividade dos compostos frente a epimastigotas e tripomastigotas. Os compostos prenilcumarina, stirilpirona-2, stirilpirona-6, e taxifolina-3-acetil foram os mais ativos contra formas epimastigotas com CI_{50} variando de 10,5 a 43,3 $\mu\text{g/ml}$. Os demais compostos só inibiram o crescimento de epimastigotas em 50% em concentrações 8 a 16 vezes maiores. Contrariamente, para tripomastigotas a variação nas concentrações dos compostos foi muito menor cerca de 5 vezes. Dentre os 9 compostos avaliados, 4 reduziram 50% o número de tripomastigotas sangüíneos em concentrações iguais ou menos que 698,3 $\mu\text{g/ml}$ sendo que a prenilcumarina revelou pronunciada atividade, reduzindo 50% o número de parasitas na concentração de 88,2 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 4).

A atividade antiparasitária observada em extratos brutos, frações e compostos, muitas vezes podem ser devida a lise inespecífica decorrente dos constituintes presentes. Embora não relatada na literatura consultada, a determinação de atividade hemolítica de extratos ativos é um parâmetro importante a ser avaliado. Em nossos experimentos a atividade hemolítica de frações e compostos ativos contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* variou de 20 a 3% para as frações e de 6 a 2% para os compostos. Estes resultados sugerem que estes compostos atuam de forma seletiva e aparentemente apresentam uma baixa toxicidade contra as hemácias de camundongos. A atividade hemolítica do cristal violeta não foi avaliada devido a interferência da coloração na dosagem da hemoglobina.

Para avaliar a efetividade dos compostos contra tripomastigotas sangüíneos, amostras de sangue infectado que foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e que apresentaram negativas ao exame a fresco, foram inoculadas em camundongos jovens com objetivo de avaliar a infectividade *in vivo*. Somente os camundongos inoculados com sangue tratado com prenilcumarina (500 µg/ml) e cristal violeta (250 µg/ml) não apresentaram parasitemia sangüínea. Da mesma forma as hemoculturas destes animais foram negativas mostrando a eficácia da prenilcumarina e do cristal violeta nestas concentrações. Todos os animais inoculados com sangue tratado com os demais compostos, negativas no exame a fresco, incluindo-se aqui os camundongos que receberam o sangue tratado com 250 µg/ml de prenilcumarina apresentaram parasitemia sangüínea no 7º dia de infecção (Tabela 5). Estes resultados mostram

que dos compostos testados apenas a prenilcumarina na concentração de 500 µg/ml foi capaz de promover a eliminação dos parasitas do sangue. A taxa de hemólise nesta concentração (13%) sugere que a atividade tripanocida da prenilcumarina é bastante específica e que este composto possa se constituir em uma fonte promissora para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade contra o *T. cruzi*.

Grupos químicos diversos presentes em plantas, podem atuar através de vários mecanismos, entre esses a inibição de enzimas ou sistemas enzimáticos, a diminuição da replicação de ácidos nucleicos, desestabilização de membranas, etc,. Várias drogas (vinblastina, vincristina e taxol) com atividade anti-neoplásica pronunciada utilizadas na prática clínica apresentam considerável grau de toxicidade sendo portanto, menos atrativas para uso em doenças parasitárias (Sepúlveda-Boza & Cassels, 1995). Desta forma, avaliar o efeito citotóxico dos compostos em células hospedeiras de mamíferos é um importante critério na busca de novos compostos com perspectivas de uso terapêutico (Weniger *et al.*, 2001; Schinella *et al.*, 2002).

Diferentes metodologias têm sido empregadas no estudo dos efeitos citotóxicos de compostos. Dentre estas, o ensaio de MTT é um teste clássico largamente utilizado na avaliação de citotoxicidade e atividade de compostos. Schinella *et al.* (2002) utilizando o ensaio de MTT e da LDH (desidrogenase láctica) avaliaram a citotoxicidade de 4 frações ativas contra o *T. cruzi* verificaram ausência de citotoxicidade das frações para macrófagos peritoneais de ratos na concentração de 200 µg/ml. No presente trabalho as taxas de citotoxicidade para

células Vero dos compostos mais ativos contra o *T. cruzi* foram dose dependente. (Figura 4). A prenilcumarina que foi o composto mais ativo contra tripomastigotas sangüíneos foi também o mais citotóxico (58% de inibição do crescimento celular na concentração de 100 µg/ml). A citotoxicidade do benznidazol foi aproximadamente a metade daquele exibida pela prenilcumarina. Weniger *et al.* (2001) utilizando o ensaio do MTT em linhagem de promonócito humano U-937 avaliaram a citotoxicidade de 21 extratos de plantas ativos contra *T. cruzi* e leishmania e verificaram que apenas 2 entre 21 extratos testados apresentaram taxa de citotoxicidade aceitável, mostrando que, em muitos casos, compostos ativos presentes nestes extratos não podem ser utilizados na prática devido a sua elevada toxicidade para a célula hospedeira.

A avaliação da atividade tripanocida de compostos contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* é um importante parâmetro, uma vez que, os resultados destes ensaios podem se aproximar da atividade esperada no modelo vivo. No presente estudo avaliamos a atividade dos compostos em duas linhagens celulares distintas: macrófagos peritoneais de camundongos e células Vero. Embora o tratamento das monocamadas iniciado após 24 horas de infecção tenha mostrado que os compostos prenilcumarina e stirilpirona-2 nas concentrações de 50 e 100 µg/ml respectivamente, reduziram as taxas de infecção em 2 a 4 vezes o número de parasitas intracelulares em 2 vezes em relação ao controle nas duas linhagens celulares, nenhum dos compostos apresentou eficácia semelhante ao benznidazol. Considerando-se a percentagem de infecção, os compostos stirilpirona-6, taxifolina-3-acetil nas concentrações de 50 e 100 µg/ml,

respectivamente, não foram efetivos neste modelo experimental, embora tenham ocasionado a redução no número de parasitas intracelulares. O benznidazol que apresentou efetividade de 100% na concentração de 100 µg/ml para as duas linhagens celulares, teve efetividade parcial para macrófagos tratados com 50 µg/ml da droga. Embora o tratamento concomitante das monocamadas no momento da infecção pudesse mostrar resultados diferentes, esses ensaios não foram realizados.

Paralelamente quando as monocamadas tratadas e não tratadas nas condições anteriores foram acompanhadas por um período de 120 horas verificamos que nas células tratadas com prenilcumarina (50µg/ml) e benznidazol (100 µg/ml) o ciclo intracelular não se completou e as tratadas com stirilpirona-2 (100 µg/ml) houve um retardo no ciclo intracelular. Para as demais monocamadas tratadas com os demais compostos o ciclo intracelular foi completo a partir de 96 horas de infecção, incluindo-se aqui macrófagos tratados com 50 µg/ml de benznidazol.

O mecanismo de ação do benznidazol é através do bloqueio da síntese de ácido nucléico e de proteínas (Van Voorhis, 1990). Esta droga usada na clínica, reduz a duração e a severidade clínica da doença de Chagas na fase aguda e congênita mas resulta no “clearance” total do parasita somente em 50% dos pacientes tratados (Kirchoff, 1993). Além disso, variação de sua eficácia de acordo com as cepas do parasita e a região geográfica tem sido reportadas (Andrade *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1997).

Diferentes moléculas (allopurinol, gosypol, megazol, fexemidazol, e cetoconazol) de uso clínico tem sido testada contra o *T. cruzi* nos últimos anos (Brenner, 1987; Maldonado *et al.*, 1993; Urbina *et al.*, 1993). Entretanto, nenhum destes compostos mostrou efetividade comparável ao benznidazol. Estudos recentes tem demonstrado que dois derivados triazólicos o (D0870) e (SCH56592), que inibem especificamente a síntese do ergosterol, mostraram eficácia igual ou superior ao benznidazol no tratamento da doença de Chagas experimental aguda e crônica (Molina *et al.*, 1997; Urbina *et al.*, 1996 Urbina, 1999). Devido a pequena quantidade disponível dos compostos não pudemos avaliar a atividade dos mesmos *in vivo*.

A existência de enzimas específicas em tripanosomatídeos como as transsialidases, cisteino-proteases e a tripanotiona redutases constituem-se em importantes alvos para quimioterapia e desenvolvimento de novas drogas (Schenkman *et al.*, 1991; Sepúlveda-Boza & Cassels, 1996; Bonnet *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2002). O mecanismo de ação dos compostos ativos em estudo neste trabalho não é conhecido e foi apenas parcialmente estudado.

A avaliação da inibição da tripanotiona redutase que é uma enzima chave responsável pelo equilíbrio intracelular protegendo o parasita do stress oxidativo mostrou que nenhum dos 4 compostos ativos (prenilcumarina, stirilpirona 2 e 6 e taxifolina-3-acetil) foram capazes de inibir a atividade da tripanotiona redutase em taxas maiores que 30%. Estes resultados demonstram que a atividade tripanocida desses compostos ocorre por um outro mecanismo que necessita ser melhor investigado.

9. CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

De 14 extratos brutos testados, 11 apresentaram atividade tripanocida contra epimastigotas de *T. cruzi* e 3 não mostraram atividade;

As espécies do gênero *Polygala* apresentaram os maiores níveis de atividade e este é o primeiro relato de atividade tripanocida de plantas deste gênero.

De 17 frações estudadas 15 foram ativas contra epimastigotas e 13 foram ativas contra tripomastigotas sangüíneos;

Embora os 9 compostos puros tenham apresentado atividade contra epimastigotas e tripomastigotas, as CI_{50} foram mais baixas que as observadas para as respectivas frações;

A CI_{50} dos compostos prenilcumarina e stirilpirona 2 contra epimastigotas foram semelhantes a do benznidazol e a prenilcumarina foi o composto mais ativo contra tripomastigotas sangüíneos, ocasionando a esterilização do sangue na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$;

As taxas de hemólise dos compostos foram inferiores a 6% sugerindo uma baixa toxicidade contra os componentes sangüíneos;

A citotoxicidade dos compostos ativos foi dose-dependente. O composto mais ativo, a prenilcumarina, foi também a mais citotóxica contra células Vero;

A atividade intracelular dos compostos prenilcumarina (50 $\mu\text{g/ml}$) e stirilpirona 2 (100 $\mu\text{g/ml}$) contra amastigotas foi semelhante a do benznidazol;

Nenhum dos 4 compostos ativos mostrou atividade inibitória da tripanotiona redutase.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MEHAMMAD, F. - Screening of some Indian plants for antibacterial properties. **J. Ethnopharmacol.**, **62**: 173-182, 1998.
- ANDRADE, A.L.S. & ZICKER, F. - Should benznidazole be used in chronic Chagas disease?. **Lancet**, **349**: 653, 1997.
- ANDRADE, S.G. - Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains, **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, **18**: 39-46, 1985.
- ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. - Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull World Health Org.**, **63**: 721-726, 1985.
- ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J.B.; FILHO, F.F.; LUQUETTI, A.O. - Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patient and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **86**: 624-626, 1992.
- BERGER, I., BARRIENTOS, A.C.; CÁCERES, A.; HERNÁNDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C.M.; KUBELKA, W. - Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, **62**: 107-115, 1998.
- BERTELLI, M.S.M. & BRENER, Z. - Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, **66**: 992-997, 1980.
- BOND, C.S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; HUNTER, W.N. - Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural products inhibitors. **Research article**, **7**: 81-89, 1999.
- BONNET, B.; SOULLEZ, D.; GIRALT, S.; MAES, L.; LANDRY, V.; CHARVET, E.D.; SERGHERAERT, C. - Trypanothione reductase inhibition/trippanocidal

- activity relationship in a 1,4-Bis(3-aminopropyl) piperazine series. **Biorganic and Medical Chemistry**, **8**: 95-103, 2000.
- BORGES, A.; CUNNINGHAM, M.L.; TOVAR, J.; FAIRLAMB, A.H. - Site-directed mutagenesis of the redox-active cysteines of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. **Eur. J. Biochem.**, **228**: 745-752, 1995.
- BRENER, Z. - Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas'disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 205-212, 1987.
- BRENER, Z. - Recent advances in the chemotherapy of Chagas'disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**: 149-155, 1984.
- BRENER, Z. - Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **4**: 389-396, 1962.
- BREVOORT, P. - The current status of the US botanical market. In: **World congress on medicinal and aromatic plants for human welfare. Abstracts**. Mendoza: ICMIPA/ISHS/ SAIPOA, p. L-42, 1997.
- BURLEGH, B.A. & ANDREWS, N.W. - The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**: 175-200, 1995.
- CÁCERES, A.; LÓPES, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. - Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **J.Ethnopharmacol.**, **62**: 195-202, 1998.
- CALIXTO, J.B. - Efficacy, safety, quality control and regulatory guidelines for herbal medicine (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**: 179 - 190, 2000.
- CANESIN, M.F.; BARRETO, A.C.P. - Tratamento etiológico da doença de Chagas: mito ou realidade? **Rev. Soc. Card. São Paulo**, **7(2)**: 233-239, 1997.
- CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MESQUITA, A.A.L.; TAVARES, K.G. - Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 372-374, 1991.

- CHIARI, E.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; OLIVEIRA, A.B. - *In vitro* screening of *Asteraceae* plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytother. Res.** **10**: 636-638, 1996.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. - Natural products in drug discovery and development, **J. Nat. Prod.**, **60**: 52-60, 1997.
- CROFT, S.L.; WALKER, J.J.; GUTTERIDGE, W.E. - Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in vitro. **Trop Med. Parasitol.**, **39**, 145, 1998.
- DA COSTA, F.B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. – Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanocidal activity. **Planta Medica.**, **62**: 557-559, 1996.
- DE CASTRO, S.L. - The challenge of Chagas` disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*.. **Acta Tropica**, **53**: 83-98, 1993.
- DE PASQUALE, A. - Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, **11**: 1-16, 1984.
- DI STASI, L.C. (org.). - Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: **UNESP**, p.230, 1996.
- DIAS, J.C.P. - Transfusional Chagas disease in Brazil. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, **88** (suppl I.): 63-65, 1993.
- DIAS, B.F.S. - A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. **Campinas: André Tosello**, p.10,1996.
- DIAS, J.C.P. - Epidemiology of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. (eds). **Chagas`disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. ISBT Brazil`92 São Paulo Brazil. 1992, p. 49-80.
- DIAS, J.C.P. & BRENER , S. - Chagas disease and blood transfusion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**: 139-147, 1984.
- DIAS, J.C.P. & SCHOFIELD, C.J. - The Southern Cone initiative against Chagas disease. **Adv. Parasitol.**, **42**: 1-27, 1999.

- DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão. In: BRENER,Z. & ANDRADE, Z. (eds) ***Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.152-174, 1979.
- DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A.; SILVA, G.D.F.; SOUSA,J.R.; PINTO, A.S. – Anti-trypanosomal activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Rev. Inst. Med.Trop. S. Paulo**, **44**(2): 109-112, 2002.
- FILARDI, L. & BRENER, Z. - Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81**: 755-759, 1987.
- GOLDFRANK, L. et al. - The Pernicious Panacea : Herbal Medicine. **Hospital Physician**, **10**: 64-86, 1982.
- GONZALEZ, N.S. & CAZZULO, J.J. – Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis *in vitro* and *in vivo* by *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Pharmacol.**, **39**: 2873-2877, 1989.
- GRUENWALD, J. - The market situation and marketing of herbal medicinal products (HMP) in Europe. In: **World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 2, Abstracts**. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPOA, p. L-33, 1997.
- HAMILTON, C.J.; SARAVANAMUTHU, A.; EGGLESTON, I.M.; FAIRLAMB, A. – Ellman's reagent-mediated regeneration of trypanothione *in situ* : substrate economic microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **Biochem. J.**, 1-17,2002.
- HARVEY, A. - Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, **Drugs Discov. Today**, **5 (7)**: 294-300, 2000.
- ISRAELSEN, L.D. - United States regulatory status of botanical preparation. In: **World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 2, Abstracts**. Mendoza: ICMIPA/ISHS/SAIPOA, p. L-44, 1997.
- KIRCHOLF, L.V. - Chagas disease: American trypanosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, **7**: 487-502, 1993.

- KONDRACHINE, A.V.; TRIGG, P.I. – Global overview of malaria. **Indian J.Med. Res.**, **106**: 39-52, 1997.
- LI, Z.; FENNIE, M.W.; GANEM, B.; HANCOCK, M.T.; KOBASLIJA, M.; RATTEND, D.; BACCHI, C.J.; SULLIVAN, M.C.O. – Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents, **Biorg. Medicinal Chemistry**, **11**: 251-254, 2001.
- LOOSDRECHT, A.A.; NENNEL, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGESNHUIJSEN, M.M.A.C. - Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. a methodological study. **J. Immunol. Methods**, **141**: 15-22, 1991.
- LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORRÊA, R.; CECHINEL-FILHO, V.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; SANTOS, A.R.S. - Atividade tripanocida in vitro de chalconas sintética. **XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Resumo 21.008**, p.138, 1998.
- LUZ, Z.M.P. - Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, **94** (Suppl. I): 295-298, 1999.
- MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. – *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, **J. Ethnopharmacol.**, **73**: 335-340, 2000.
- MALDONADO, R.A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J.A. – Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas` disease. **Antimicrob. Agents Chemother**, **37**: 1353-1359, 1993.
- MARQUES, J.S.C. – Atividade antiparasitária e antiviral de *Pycnopus sanguineus* (L.:Fr.) Murr. Dissertação (Mestrado – Biotecnologia), UFSC, 2001.
- MOLINA, J.; ARAUJO, M.S.S.; PEREIRA, M.E.S.; BRENER, Z.; URBINA, J. A. - Activity of the bis-triazole D0870 against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. ICAAC. **Abstracts 37**: B41b, 1997.

- MOSMANN, T. – Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol.Methods**, **65**:55-63,1983.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J.J.; MARTÍNEZ-DIAS, R.A.; ESCARIO, J.A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; GÓMES-BARRIO, A. – *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J.Ethnopharmacol.**, **72**: 101-107, 2000.
- MUKHERJEE, T. - Antimalarial herbal drugs. A review. **Fitoterapia**, **1**: 197-204, 1991.
- NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; FREITAS, J.P.L.P.; AMATO NETO, V.; BIANCALANA, A. ; KLOETZEL, J. - Ação da violeta de genciana sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro: sua importância na esterilização do sangue destinado a transfusão. **Rev. Paul. Med.**, **42**: 85-86, 1953.
- OLIVEIRA, A.B. ; CHIARI, E.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DÂMARIS, S.D.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D. - Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytother. Res.**, **10** : 292-295, 1996.
- PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M. SNOECK, R.; SCHOLS, D.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. - Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. **J. Virol. Methods**, **20**: 309-321, 1988.
- PHILLIPSON, J.A., WRIGHT, C.W. – Medicinal plants against protozoal diseases. **Trans.Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 155-165, 1991.
- PINHEIRO, T.R.; CECHINEL, F.V.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A. – Three xanthenes from *Polygalla cyparicias*. **Phytochemistry**, **48**: 725-728, 1998.
- PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA JUNIOR, A; SMÂNIA, E.F.; BRAZ-FILHO, R. – Two epimeric flavolignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Z. Naturforsch.C.**, *in press*, 2002.
- RASONAIVO, P.; RATSIMAMANGA-URVERG, S.; MILIJAONA, R.; RAFATRO, H.; RAKOTO-HATSIMAMANGA, A.; GALEFFI, C. - *In vitro* and *in vivo*

- chloroquine-potentiating action of *Strychnos myrtoides* alkaloids against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium* malaria. **Planta Medica**, **60**: 13-16, 1993.
- RASSI, A. & LUQUETTI, A.O. - Therapy of Chagas' disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. (eds). **Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. ISBT Brazil'92 São Paulo Brazil. p. 237-247, 1992.
- RATES, S.M.K. - Review: Plants as source of drugs. **Toxicon**, **39**: 603-613, 2000.
- REID, W.V.; LAIRD, S.A.; MEYER, C.A.; GAMEZ, R.; SITTENFELD, A.; JANZEN, D.H.; GOLLIN, M.A.; JUMA, C. - Biodiversity Prospecting: Using Genetic Resources for Sustainable Development, **World Resources Institute (USA)**. 10p, 1993.
- REY, L. "Tripanosomíase devida ao *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas". **Bases da Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1992. p.25-37.
- REZENDE, J.M. & RASSI, A. Doença de Chagas (Capítulo 3), In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.M. e col. **Protozooses humanas**, 2º tiragem, BYK: São Paulo., 1995, p. 237-247.
- RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. - Effects of some *B*-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol.**, **122**: 27-31, 1998.
- ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUES, E.; FOURNET, A. - *In vitro* activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Phytoth. Res.**, **8**: 141-144, 1994.
- ROUHI, A.M. - Seeking drugs in natural products . **C and EN** **7**, 14-29, 1997.
- SCHENKMAN, S.; JIANG, M.S.; HART, G.W.; Nussenzweig, V. - A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, **6**: 1117-1125, 1991.

- SCHINELLA, G.R.; TOURNIER, H.A.; PRIETO, J.M.; RÍOS, J.L.; BUSCHIAZZO, H.; ZAIDENBERG, A. – Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. **Fitoterapia**, **73**: 569-575, 2002.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, E.; BALANZA, E.; FOURNET, A. - Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabellii*. **Phytoth. Res.**, **10**: 375-378, 1996.
- SEPULVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B.K. – Pant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, **62**: 98-105, 1996.
- SHU, Y. Z. - Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective, **J. Nat. Prod.**, **61**: 1053-1071, 1998.
- SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. – The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀- values and cell survival, **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, **33**: 813-823, 1995.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, **20**: 201-210, 1953.
- SILVA, R.M.G.; FREITAS, F.G.; HAMAGUCHI, A. - Efeito do tratamento e pré tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* por extrato de *Mandevilla velutina*. **XII Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, Resumo 12.126**, p. 353, 1997.
- SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. - Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Bras. Med. Trop.**, **27**: 11-22, 1994.
- SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRAULI, U.D. **Biochim. Biophys. Acta**, **77**, 383, 1963.
- SOEJARTO, D.D. - Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.** **51**: 1-15, 1996.

- STROHL, W.R. – The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drugs Discov. Today**, **5(2)**: 39-41, 2000.
- TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. – An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simples virus compounds., **J. Virol. Methods**, **33**: 61-71, 1991.
- TEIXEIRA, A.R.L.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J.M.; RIZZO, LV. – Malignant non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes, **J. Comp. Pathol.**, **103**: 37-48, 1990b.
- TEIXEIRA, A.R.L.; CALIXTO, M.A.; RIZZO, L.V.; CORDOBA, J.C.; TEIXEIRA, M.L. – Cancerigênese em camundongos tratados com compostos nitroderivados. **Programa e Resumos do XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.**, p.48-49, 1985.
- TEIXEIRA, A.R.L.; CORDOBA, J.C.; SOUTO MAIOR, I.C.; SOLORZANO, E. – Chagas' disease: lymphomas growth in rabbits treated with benznidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **43**: 146-158, 1990a.
- TOMA, H.K. – Interação *in vitro* de cepas de *Trypanosoma cruzi* de parasitemia alta e subpatente *in vivo* com diferentes linhagens celulares. (Dissertação de Mestrado), Belo Horizonte, UFMG, 75p, 1994.
- URBINA, J.A.; LAZARDI, K.; MARCHAN, E.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.,; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; MALDONADO, R.A.; PAYARES, G.; DE SOUZA, W. – Mevinolin (lovastatin) potentiates the anti-proliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* e *in vivo* studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **37**: 580-591, 1993.
- URBINA, J.A. - Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94** (Suppl. I): 349-355, 1999.
- URBINA, J.A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J.F. - Cure of short and long-term experimental Chagas disease using D0870. **Science**, **273**: 969-971, 1996.

- VAN VOORHIS, W.C. – Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. **Drugs**, **40**: 176-202, 1990.
- VULTO, A.G.; SMET, P.A.G.M. - In: DUKES, M.M.G. (Ed.). **Meyler`s Side Effects of Drugs**, 1th Ed., Elsevier, Amsterdam, p. 999-1005, 1988.
- WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. – Antiprotozoal activities of Colombian plants. , **J. Ethnopharmacol.**, **78**: 193-200, 2001.
- WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Quality control methods for medicinal plant materials**, Geneva, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Tropical Disease Research**. Geneva, p.134, 1993.
- WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION – Chagas disease Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR, Geneva, pp. 112-123, 1997.
- WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.J. - Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. **Wiley Sons**, Chichester, p. 25-45, 1996.
- ZANI, C.L.; CANVES, P.P.G.; QUEIROZ, R. – Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, **2**(1): 47-50, 1995.
- ZANI, C.L.; CHIARI, E.; KRETTLI, A.U.; MURTA, S.M.F.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; ROMANHA, A.J. - Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtha[2,3-b] thiophen-4,9-quinones. **Bioorg. & Med. Chem.**, **5**: 2185-2192, 1997.