

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AOS EXTRATOS DE *Moringa oleifera*, DE *Mandevilla velutina* E DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Monografia Apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Fevereiro-2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AOS EXTRATOS DE *Moringa oleifera*, DE *Mandevilla velutina* E DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Monografia Apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas

**Uberlândia-MG
Fevereiro-2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AOS EXTRATOS DE *Moringa oleifera*, DE *Mandevilla velutina* E DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Orientadora: Prof.^aDr.^a Amélia Hamaguchi

Monografia Apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas

**Uberlândia-MG
Fevereiro-2003**

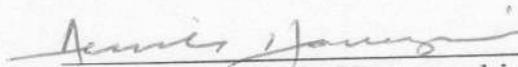
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

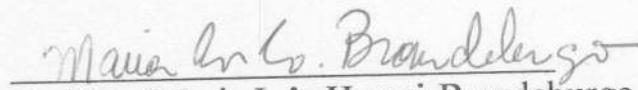
ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AOS EXTRATOS DE *Moringa oleifera*, DE *Mandevilla velutina* E DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

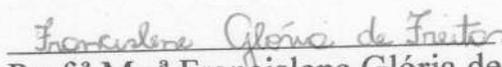
Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Aprovada pela Banca examinadora em 26/2/2003

Nota: 100


Prof.ª Dr.ª Amélia Hamaguchi


Prof.ª Dr.ª Maria Inês Homsí-Brandeburgo


Prof.ª Ms.ª Francislene Glória de Freitas

Uberlândia, ____ de ____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a José Maria e Umbelina. Por serem pessoas maravilhosas e imperfeitas.

Queridos pais,

A luta diária de vocês para proporcionarem os meus estudos e dos meus irmãos foi o motor para eu dar continuidade em qualquer coisa na minha vida.

Graças a vocês tenho como irmãos o Dinamérico, a Jaqueline e a Helena Maria.

Basta apenas me lembrar do casal-fortaleza para meus medos acabarem, para um sorriso eu exibir e a alegria me invadir.

Cada erro cometido por vocês é humildemente assumido e compartilhado.

É pelo empenho, amor e defeitos que vocês indicam um caminho cheio de oportunidade, honestidade e respeito para com os próximos.

Enfim, agradeço por darem sentido a minha existência a cada raiar do sol.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o presente da vida: os meus dons e a minha família.

À orientadora Amélia Hamaguchi pelo incentivo, oportunidade e palavras certas nos momentos de mudança. Graças às broncas e aos incentivos consegui focar e traçar planos não só na pesquisa como na área profissional. Fez me descobrir que ciência não se faz de grandes revelações e sim de um trabalho constante.

À professora Maria Inês Homs-Brandeburgo pela contribuição na minha formação profissional.

À Helen de Oliveira Silva pelos ensinamentos e pela mão-de-obra tão presente. Por confiar em mim e ser minha amiga. Sentirei falta da parceria e dos vários momentos que passamos juntas. Terei saudade dos erros, do choro, das gargalhadas, dos sustos, das nossas descobertas. Obrigado pela cumplicidade.

À Cynthia Barbosa Firmino Aguiar pela contribuição, pelo conhecimento e esforço depositados em mim. Pelo exemplo de luta em algo que acredita. Pelo companheirismo e pelo carisma que resplandece quando está perto. Obrigada por estar comigo, me ouvir e me aconselhar.

Aos amigos do laboratório sempre solícitos e divertidos: Luiz Fernando, Francislene, Cristiani, Tatiana, Fábio Moroni, Gilvan, Willian, Rodrigo, Luiz Carlos, Rone, Mirian, Renata, Elizangela, Veridiana, Leonardo, Alexandre, Fábio de Oliveira, Luis Henrique, Poliana.

À Júnia por me encaminhar ao Laboratório de Bioquímica e incentivar-me nos primeiros passos do meu crescimento científico. Jamais me esquecerei deste fato.

À Tianinha sempre atenta, carinhosa e disposta a nos ajudar.

Ao Cleuber pela paciência em nos ajudar e ensinar.

À Marlene e à Dona Nenzinha pelo apoio constante.

À FAPEMIG, ao CNPq e a UFU pelo apoio financeiro.

Às grandes amigas que contribuíram de outras formas para o meu desenvolvimento
Obrigada Priscila, Greice Ayra e Francielle por me animarem e estarem do meu lado nos
momentos difíceis e por serem grandes.

A todos os alunos da 50ª turma de Ciências Biológicas da UFU por tornarem meus dias
ensolarados ou chuvosos em dias agradáveis.

Por último, à minha irmã Helena Maria pela presença essencial na minha vida. Por pensar,
ler, corrigir e me incentivar no trabalho. Brigar e me amparar em todos os momentos.
Obrigada por sempre exigir o melhor de mim.

SUMÁRIO

01- INTRODUÇÃO.....	01
02- OBJETIVOS.....	07
03- MATERIAL E MÉTODOS.....	08
A – Material.....	08
3.1- Biológico.....	08
3.1.1- Animais.....	08
3.1.2- <i>Mandevilla velutina</i> (Apocinaceae).....	08
3.1.3- Própolis de <i>Apis mellifera</i>	08
3.1.4- <i>Moringa oleifera</i> (Moringaceae).....	08
3.1.5- <i>Trypanosoma cruzi</i>	09
3.2- Químico.....	09
3.2.1- Aspirina ^R (AAS, Bayer)	09
B- Métodos.....	09
3.3- Extrato Bruto Liofilizado (EBL) do rizoma de <i>Mandevilla velutina</i>	09
3.4- Extrato Bruto Liofilizado (EBL) das folhas de <i>Moringa oleifera</i>	09
3.5- Preparação da solução Aquosa Liofilizada de Própolis de <i>Apis mellifera</i>	10
3.6- Determinação da parasitemia.....	10
3.6.1- Curva Parasitêmica.....	10
3.7- Mortalidade.....	10
3.8- Produção da infecção Chagásica.....	11
3.9- Estudo do efeito do ácido acetilsalicílico <i>in vitro</i> em sangue contaminado com <i>T. cruzi</i>	11
3.10- Atuação do ácido acetilsalicílico, v.o. e v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
3.11- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de <i>Moringa oleifera</i> , de <i>M. velutina</i> e de própolis de <i>A. mellifera</i> em sangue contaminado com <i>T. cruzi</i>	12
3.12- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de <i>M. oleifera</i> , de <i>M. velutina</i> e de própolis de <i>A. mellifera</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	12

3.13- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de <i>M. velutina</i> , v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	12
3.14- Atuação do pré-tratamento da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de <i>M. oleifera</i> e de <i>M. velutina</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	13
3.15- Análise estatística.....	13
04- RESULTADOS.....	14
4.1- Efeito do AAS <i>in vitro</i> em sangue contaminado com <i>T. cruzi</i>	14
4.2- Efeito do AAS, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
4.3- Efeito do AAS, v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
4.4- Efeito da associação do AAS ao EBL de <i>Moringa oleifera</i> em sangue contaminado com tripomastigotas.....	17
4.5- Efeito da associação do AAS ao EBL de <i>Moringa oleifera</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
4.6- Efeito da associação do AAS ao EBL de <i>Mandevilla velutina</i> em sangue contaminado com tripomastigotas.....	19
4.7- Efeito da associação do AAS ao EBL de <i>Mandevilla velutina</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
4.8- Efeito da associação do AAS ao EBL de própolis de <i>A. mellifera</i> em sangue contaminado com tripomastigotas.....	21
4.9- Efeito da associação do AAS ao EBL de própolis de <i>A. mellifera</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	22
4.10- Efeito da associação do AAS ao EBL de <i>Mandevilla velutina</i> , v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
4.11- Efeito do pré-tratamento da associação do AAS ao EBL de <i>M. oleifera</i> e de <i>M. velutina</i> , v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	24
05- DISCUSSÃO	25
06- CONCLUSÃO.....	31
07- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

ABREVIATURAS

- ▶ EBL: Extrato Bruto Liofilizado
- ▶ NO: Óxido Nítrico
- ▶ OMS: Organização Mundial da Saúde
- ▶ PBS: Tampão Fosfato 0,01M + salina 0,09%
- ▶ v.o.: via oral
- ▶ v.ip.: via intraperitoneal
- ▶ COX: Cicloxigenase
- ▶ AINE: Antiinflamatório Não-Esteroidal
- ▶ PG: Prostaglandina
- ▶ AAS: Ácido acetilsalicílico
- ▶ INF- γ : Interferon - γ
- ▶ TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α
- ▶ IL-12: Intereucina-12
- ▶ IL-1 β : Interrelucina-1 β
- ▶ NOSi: Óxido Nítrico Sintase induzida
- ▶ FCI: Forma Crônica Indeterminada
- ▶ FUNASA: Fundação Nacional da Saúde

RESUMO

ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AOS EXTRATOS DE *Moringa oleifera*, DE *Mandevilla velutina* E DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

A doença de Chagas é uma das mais importantes infecções de algumas regiões de países da América Central e Sul, em virtude de sua alta incidência e repercussão sócioeconômica. Apesar dos esforços ainda não foram descobertas vacinas ou drogas eficazes contra esta doença. É sabido que grande parte da população de países em desenvolvimento faz uso de plantas e derivados de vegetais para o tratamento de diversas moléstias. A *Mandevilla velutina*, a *Moringa oleifera* e a própolis de *Apis mellifera* demonstraram eficácia no tratamento de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Recentemente foi observado que a Aspirina[®] (Bayer) tem aplicação terapêutica no controle da Doença de Chagas. O trabalho investiga o efeito da associação do AAS aos extratos destes produtos naturais, *in vitro*, no tratamento e pré-tratamento, via oral e intraperitoneal, de camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* (cepa Y). O Extrato Bruto Liofilizado (EBL) dos produtos naturais obtidos em Uberlândia/MG e o AAS foram ressuspendidos em PBS (Tampão Fosfato-salina). Para cada extrato organizou-se experimentos com camundongos machos da raça Swiss, infectados com 50.000 tripomastigotas, os quais receberam tratamento por 10 dias de AAS, EBL, AAS + EBL e salina, em intervalos regulares de 24 horas. O pré-tratamento iniciou-se 7 dias antes da infecção e continuou por 10 dias. A parasitemia foi determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção. Nos experimentos *in vitro*, todos os lotes com associações demonstraram atividade tripanomicida. A dose de 50mg/kg de AAS e dos extratos reduziram a parasitemia em torno de 50%. No tratamento via oral a melhor dose foi de 10mg/kg de AAS e 77mg/kg de EBL da própolis com 73% de redução parasitêmica e sobrevida de 80% dos animais experimentais. Todas as associações do AAS ao EBL de *M. velutina* v.ip. promoveram redução da parasitemia ($p < 0,05$) em relação ao controle e aumentaram a sobrevida dos animais. Os ensaios de pré-tratamento v.o. indicaram que a Aspirina^R não é eficiente em tratamentos longos, acarretando a mortalidade de 100% dos animais infectados. Nesse teste, a mistura de AAS mais *M. oleifera* obteve 84% de redução parasitêmica e sobrevida de 40% dos camundongos tratados, já associação de *M. velutina* ao AAS reduziu a parasitemia 53% em relação ao controle que recebeu somente AAS e resultou em 80% de sobrevivência dos animais infectados. Com base nos resultados encontrados, sugere-se que algumas associações de AAS aos extratos dos produtos naturais em baixas doses individuais potencializaram o tratamento e aumentaram a sobrevivência dos camundongos infectados quando comparados aos respectivos controles.

Palavras chaves: Doença de Chagas, Ácido acetilsalicílico, Produtos naturais.

01- INTRODUÇÃO

A doença de Chagas persiste como importante problema de saúde pública em grande parte da América Latina. Esta moléstia se alastrou nas áreas rurais após a conquista européia do continente, em particular, a partir do século XIX, alcançando seus picos de prevalência e expansão em meados do século XX. Atualmente, mostra-se bastante urbanizada devida às migrações rurais - urbanas em todo o Continente (Dias *et al*, 1997).

O agente causal da tripanossomíase americana é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hematófagos, comumente chamados "barbeiros", dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pertencentes à família Reduviidae (Coura, 2002).

Na transmissão vetorial, as formas infectantes do *T. cruzi* (tripomastigota metacíclica) são eliminadas pelo vetor em suas fezes, durante o processo de hematofagia. No entanto, a infecção do hospedeiro ocorre quando este coça o local, propiciando assim, a entrada da forma infectante na pele, em membranas de mucosa ou conjuntiva, onde atingirá a corrente sangüínea. Após penetrar nas células dos tecidos próximo, eles passam por uma fase intracelular obrigatória (Araújo-Jorge, 2000). Outras formas de transmissão podem ocorrer como: sangüínea, congênita, por transplante de órgãos e acidentes em laboratório onde se manipula material contaminado (Aguiar, 2002).

De modo geral, reconhece-se a presença de três estágios na doença de Chagas: agudo, crônico indeterminado e crônico determinado. Após período de incubação de

cerca de sete a dez dias, inicia-se a fase aguda, geralmente oligossintomática, reconhecida em cerca de 1 a 2% dos casos. A doença aguda é mais grave nas crianças menores de dois anos, nas quais, na ausência de tratamento, a letalidade pode chegar a 10%. Na maioria dos casos, após quatro a dez semanas inicia-se o estágio crônico indeterminado, caracterizado pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas. Enquanto alguns pacientes permanecem nessa forma indefinidamente, outros, geralmente após intervalo de 10 a 20 anos, evoluem para alguma das formas crônicas determinadas da doença, com aparecimento de evidências de comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico. Estima-se que cerca de 50% dos indivíduos infectados se encontrem no estágio indeterminado, ou forma crônica indeterminada da doença (FCI), descrita inicialmente por Carlos Chagas como a ausência das síndromes clínicas predominantes da moléstia (Pinho, 1998).

Atualmente, teme-se a reemergência do *Triatoma infestans* e da Doença de Chagas como um todo, devido aos focos residuais do inseto em alguns estados brasileiros, entre eles Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Nos últimos anos, o programa de erradicação do “barbeiro” tem sido negligenciado, particularmente com a descentralização dos serviços da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) para estados e municípios que não têm a capacidade técnica e a motivação política para o controle da doença (Coura, 2002).

Estima-se a existência de 17 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi* e de 80 milhões sob o risco de contaminação. Essa moléstia representa uma das principais causas de morte súbita, que pode ocorrer com freqüência na fase mais produtiva do homem. No Brasil há cerca de 6000 óbitos por ano (Lanni e Mady, 1998).

Os estudos terapêuticos da Doença de Chagas têm sido realizados pela utilização de modelos experimentais, como ratos e camundongos. Dentre estes, os camundongos destacam-se por apresentarem maior nitidez no desenvolvimento das fases características da doença. Na fase aguda, sua parasitemia descreve uma curva típica semelhante ao humano e, na fase crônica, as lesões cardiovasculares são intensas e também semelhantes às que ocorrem no homem quando desenvolve a cardiopatia grave (Sherlock, 1984; Shlemper Jr. et al, 1983 *apud* Moroni, 2001).

Vários tipos de cepas de *Trypanosoma cruzi* podem ser utilizadas na elaboração de um experimento, tais como: tipo I, inclui cepas de rápida multiplicação (ex. cepa Y), com picos parasitêmicos entre o 7^o e 12^o dia da infecção; tipo II, cepas com multiplicação relativamente lenta, com picos parasitêmicos entre o 12^o e 20^o dia de infecção (ex. São Filipe); tipo III cepas com multiplicação lenta (ex. cepa Colombiana), com picos parasitêmicos entre o 20^o e 30^o dia após a infecção (Andrade, 1974 *apud* Moroni, 2001).

A quimioterapia da tripanossomíase americana é uma área de pesquisa muito intensa. A busca de medicamentos que possam combater eficazmente o *Trypanosoma cruzi* na fase aguda bem como na fase crônica é o objetivo de inúmeros pesquisadores desde a descoberta da moléstia. Na verdade, a pretensão é erradicar o protozoário e, conseqüentemente, levar à cura caracterizada por resultados sorológicos e parasitológicos negativos. Para tanto, vários compostos foram testados e em sua maioria foi observado efeito apenas sobre uma das formas do parasita, dificultando assim, a eficácia dos remédios estudados (Siqueira Batista *et al*, 1996).

Segundo Brener (2000), nenhuma classe de compostos foi adicionado na quimioterapia da doença de Chagas desde 1968 após o desenvolvimento das duas únicas drogas específicas. Uma foi o Nifurtimox (Lampit^R), lançado pela Bayer, que depois de amplamente utilizado no Brasil e em outros países latino-americanos foi retirado do mercado farmacêutico. O outro composto é o Benzonidazol (Rochagan^R) produzido pela Roche. Ambos causam várias reações colaterais como dermatite por hipersensibilidade (erupção cutânea e edemas generalizados, febre, dores articulares e musculares) e depressão da medula óssea. Além disso, as drogas permitem apenas efeitos superativos, não necessariamente levando a cura. Os efeitos colaterais causados por estas drogas muitas vezes podem levar os pacientes a abandonarem o tratamento (Silva, 1999a).

Neste caso, percebe-se a importância do estudo e desenvolvimento de medicamentos resolutivos. É sabido que aproximadamente 25% dos produtos farmacêuticos modernos são derivados de partes de vegetais, e destes, 74% começaram a ser estudados com base na medicina popular. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial utilizam principalmente as plantas medicinais para solucionar as necessidades primárias de assistência médica, incitando a

um investimento mundial de 22 bilhões de dólares anuais em torno da produção de fitoterápicos (Yunes, 2001).

A Fitoterapia é uma forma de medicina que começou a ser praticada há cinco mil anos e veio para o Ocidente junto a antigos ensinamentos orientais com os remédios populares e as tradições indígenas. Calcula-se que o Brasil disponha de algo entre 60 mil e 250 mil espécies vegetais e, provavelmente, 40% delas devem conter propriedades terapêuticas. Mas, apesar da extensa e diversificada flora, o Brasil não tem uma atuação significativa no mercado fitoterapêutico (*ibid*, 2001).

No contexto dos esforços correntes para o desenvolvimento da quimioterapia da Doença de Chagas, produtos naturais, com atividades triponomicidas são pesquisados freqüentemente, com o objetivo de desenvolver novas drogas com alta atividade e baixa toxicidade (De castro *et al.*, 2000).

O laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do INGEB/UFU tem estudado algumas espécies vegetais que possuem efeito anti-*Trypanosoma cruzi* tais como a *Mandevilla velutina* (Silva, 1996 e 1999a), *Moringa oleifera* (Oliveira, 1999 e 2002) e, também a propólis de *Apis mellifera* (Moroni, 1998 e 2001).

A *Mandevilla velutina* é uma planta encontrada em todas as regiões do Brasil e se destaca na medicina folclórica pelo seu emprego para várias finalidades, como de antiparasitária, de estimulante cardíaco e de antidiarréica. É popularmente conhecida como Jalapa, sendo constituída por um arbusto de pequeno porte que possui um rizoma junto a suas raízes; sua parte vegetativa é composta por folhas simples e as flores são tubulares, de coloração que pode variar de vermelho para rosa claro (Apezato, 1988).

Silva (1996 e 1999a) testou o Extrato Bruto Liofilizado (EBL) de *Mandevilla velutina* em camundongos inoculados com tripomastigotas e observou resultados satisfatórios no que diz respeito à redução da parasitemia e à mortalidade destas cobaias, sugerindo que esta redução pode estar correlacionada com o Sistema Óxido Nítrico.

Já Moroni (1998 e 2001), em experimentos com derivados aquosos de própolis de *Apis mellifera*, obteve 50% a mais de sobrevivência dos animais tratados quando comparados àqueles sem tratamento algum. Estudos feitos *in vitro* com soluções de própolis por HIGASHI (1994) mostraram que as preparações possuem alta atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, inibindo a proliferação do parasita dentro da célula hospedeira.

A *Moringa oleifera* é uma planta rica em carboidratos, proteínas e gorduras. Apresenta também cálcio e ferro e uma boa fonte de fósforo, metionina e cerca de 23.000 UI em vitamina A. Ela está sendo empregada com grande sucesso em doenças de pele, no sistema respiratório, no digestório, em reumatismo, edemas e resfriados, e, em alguns casos de malária, causados pelo *Plasmodium vivax* (Kerr & Silva, 1999). Oliveira (2002) em testes em camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* concluiu que a *Moringa oleifera* reduziu a parasitemia e aumentou o tempo de sobrevivência desses animais.

Embora os resultados sejam promissores, as plantas medicinais ainda não constituem um tratamento suficiente para a cura de pessoas portadoras de *Trypanosoma cruzi*. Com o propósito de aumentar a eficiência no tratamento contra a moléstia, os estudos e aprimoramentos devem ser contínuos. Há, além da fitoterapia, estudos de medicamentos de síntese química, como o ácido acetilsalicílico.

A Aspirina^R, nome comercial do ácido acetilsalicílico (AAS) patenteado pela Bayer em 1899, é um antiinflamatório não-esteróidal (AINEs) de grande conhecimento popular devido ao seu baixo custo financeiro. Sua síntese é realizada com base na estrutura química de uma substância natural extraída do salgueiro branco, *Salix alba*. Os AINEs incluem uma diversidade de agentes com diferentes classes químicas. Muitas dessas drogas possuem efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos, cujos efeitos estão relacionados com a inibição da araquidonato cicloxigenase (COX) (Rang *et al.*, 1999).

A cicloxigenase, enzima responsável pela geração de prostaglandinas (PG) a partir do ácido araquidônico se apresenta sob uma forma induzida (COX-2) e uma isoforma diferente, constitutiva (COX-1). A COX-2 é indetectável nos tecidos em condições fisiológicas, mas aumenta sua expressão em até 80 vezes durante inflamação ou estímulo mitogênico. O estímulo a COX-1 regula processos fisiológicos normais e é responsável pela síntese de PG (Rosário, 2000).

Chaves e col. (1986) estudaram a miocardite chagásica de camundongos infectados com *T. cruzi*, tratados com o AAS durante a fase aguda e observaram uma ativação maior do Sistema Complemento no grupo tratado. Eles sugeriram a influência do Complemento no desenvolvimento quantitativo e qualitativo da resposta celular observada e que o acúmulo de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no coração das

cobaias estaria regulando a liberação dos metabólitos do ácido araquidônico e/ou do oxigênio.

Estudos mais recentes indicaram que o AAS bloqueia a produção de uma substância naturalmente produzida pelo organismo do hospedeiro que alimenta o parasita causador da doença de Chagas, interrompendo o processo infeccioso (Freire-de-Lima *et al*, 2000).

Uma série de citocinas como IL-12, IL-1 β e TNF- α , são responsáveis pela ativação das funções exercidas pelos macrófagos durante os estágios iniciais da infecção, havendo assim a síntese de Óxido Nítrico. Este é um composto produzido pela conversão da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase induzida (NOSi) no ciclo denominado citrulina/NO ou ciclo arginina/citrulina que ocorre nos macrófagos (Roitt, 1997).

Freire-de-Lima *et al* (2000) mostraram que linfócitos T apoptóticos aumentaram o crescimento de *T. cruzi* em cultura de macrófagos e em camundongos infectados experimentalmente. A interação linfócitos T apoptóticos e macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* inverte a situação normal das células de defesa, ou seja, ao invés dos macrófagos usarem a arginina para sintetizar óxido nítrico e matar o protozoário, passam a fabricar uma substância chamada putrescina, devido à síntese das prostaglandinas (PGs). Neste caso, há um favorecimento da proliferação e infecção de outras células pelo parasita, pois a putrescina é o fator de desenvolvimento do mesmo (ASSIS, 2000).

A AAS ao inibir a COX interrompe, entre outros processos, a biossíntese das prostaglandinas. Embora não elimine o agente etiológico da Doença de Chagas obstrui o seu ciclo de alimentação (Freire de Lima *et al*, 2000).

02- OBJETIVOS

02.1- Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo determinar a atuação dos extratos das plantas medicinais *Moringa oleifera* e *Mandevilla vellutina*, e do extrato aquoso da própolis de *Apis mellifera*, associados ao ácido acetilsalicílico na sobrevivência e parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*.

02.2- Objetivos Específicos

Testar a ação tripanomicida *in vitro* do AAS e das suas associações aos extratos dos produtos naturais em sangue de camundongos;

Estudar a parasitemia e a mortalidade de camundongos infectados com *T.cruzi* e tratados com o AAS e as suas associações, administradas por via oral e intraperitoneal;

Verificar a atuação do AAS e das suas associações em pré-tratamento de camundongos infectados experimentalmente com *T.cruzi*.

03- MATERIAL E MÉTODOS

A – Material

3.1- Biológico

3.1.1- Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com aproximadamente 5 semanas de idade e com massas entre 25 e 35g, gentilmente fornecidos pela Pentapharm do Brasil e mantidos no biotério do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais, do Instituto de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB) com ração e água filtrada fornecidos *ad libitum*, à temperatura ambiente

3.1.2- *Mandevilla velutina* (Apocinaceae)

A coleta do rizoma de *Mandevilla velutina* foi realizada na região de cerrado de Uberlândia-MG, sendo armazenado à -20°C, conforme descrito por CALIXTO e *col.* (1985).

3.1.3- Própolis de *Apis mellifera*

Foi utilizada a própolis bruta de *Apis mellifera*, fornecida pelo Apiário Girassol, Uberlândia/MG.

3.1.4- Folhas de *Moringa oleifera* (Moringaceae)

As folhas foram coletadas na Área Experimental do Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, no período da manhã, nos meses de março e dezembro/2000 e maio/2001.

3.1.5- *Trypanosoma cruzi*

Utilizou-se a cepa "Y" do *Trypanosoma cruzi* proveniente da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, que foi mantida no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais (INGEB-UFU) por repiques semanais, utilizando-se camundongos para infecção.

3.2- Químico

3.2.1- Aspirina^R (AAS, Bayer)

Foi utilizado o produto comercialmente disponível. Cada comprimido, contendo 500mg de ácido acetilsalicílico, foi triturado, pesado e ressuspendido em PBS (Tampão - fosfato salina) nas doses desejadas para os experimentos.

B- Métodos

3.3- Extrato Bruto Liofilizado (EBL) do rizoma de *Mandevilla velutina* (Apocinaceae)

O rizoma (100gr) de *Mandevilla velutina* foi lavado em água destilada por 20min. e, posteriormente, imerso durante duas horas em solução etanol 70% e novamente lavado. Depois de ralado e macerado em água, à temperatura ambiente, o extrato foi separado dos fragmentos do rizoma por filtração em papel, acondicionado em frascos plásticos e liofilizado (Silva, 1996 e 1999a). O material liofilizado foi pesado e ressuspendido em PBS nas concentrações desejadas e armazenado à 4°C.

3.4- Extrato Bruto Liofilizado (EBL) das folhas de *Moringa oleifera* (Moringaceae)

As folhas foram selecionadas, lavadas em água destilada e imersas em água sanitária a 5% durante 20 minutos para desinfecção e novamente lavadas, retirando-se o

hipoclorito. Posteriormente, distribuídas em papel pardo e levadas à estufa (35°C) para secagem. Secas, as folhas foram pesadas e trituradas no liquidificador com água desionizada, numa quantidade suficiente para triturá-las. A solução obtida foi filtrada em gaze e algodão e centrifugada a 6000rpm por 20 minutos, o sobrenadante obtido foi liofilizado e armazenado a 20°C (Oliveira, 2002). Ao início de cada experimento, ressuspendeu-se o EBL em PBS nas concentrações desejadas.

3.5- Preparação da solução Aquosa Liofilizada de Própolis de *Apis mellifera*.

Cerca de 20 g de própolis bruta e 100 mL de água desionizada foram aquecidos por duas horas a 80°C e homogeneizados por 10 minutos no liquidificador. A solução resultante foi filtrada em um papel de filtro qualitativo. Este filtrado foi congelado e, posteriormente, liofilizado durante 48 horas (Moroni, 1998 e 2000). O extrato da própolis obtido foi pesado e depois ressuspendido em PBS nas concentrações desejadas.

3.6- Determinação da parasitemia

A parasitemia foi determinada pela contagem dos parasitas do sangue removido por uma secção na extremidade distal da cauda dos camundongos, de acordo com a técnica de Brener (1979), do 6º ao 9º dia pós-infecção. Colheu-se 5µL, o qual foi distribuído entre lâmina e lamínula (22x22mm), contando-se ao microscópio óptico, em objetiva de 40x e ocular de 10x. O resultado foi multiplicado pelo fator de correção (20.000), obtendo-se o número aproximado de parasitas/mL de sangue circulante (Brener, 1979 *apud* Silva, 1999b).

3.6.1- Curva Parasitêmica

Após a determinação das parasitemias individuais, para cada grupo calculou-se as médias parasitêmicas diárias. Posteriormente, traçou-se com esses valores médios as curvas das parasitemias em função dos dias nos quais foram determinadas.

3.7- Mortalidade

A mortalidade dos camundongos de cada grupo foi acompanhada durante um período de 30 dias após a infecção com *T. cruzi*.

3.8- Produção da infecção Chagásica

A partir da determinação da parasitemia de um animal contaminado com *Trypanosoma cruzi*, realizou-se punção cardíaca com seringa contendo 0,1mL de EDTA anticoagulante. O sangue retirado foi diluído em PBS (solução tampão fosfato 0,01M e pH 7,2) e 10% de soro fetal bovino, para obter aproximadamente 50.000 formas tripomastigotas em 0,2mL para a infecção dos camundongos, por injeção intraperitoneal. Os animais foram separados para formar os grupos controles e experimentais (n=5 em cada).

3.9- Estudo do efeito do ácido acetilsalicílico *in vitro* em sangue infectado com *T. cruzi*

O ensaio tripanomicida *in vitro* baseou-se na metodologia de Cover & Gutteridge (*apud* Moroni, 2001). Utilizaram-se 6 tubos tipo "Eppendorf", separados em lotes (n=2). Em todos os lotes foi adicionado 0,9mL de sangue normal heparinizado. Nos lotes T1 e T2 foram colocados 0,1mL do ácido acetilsalicílico nas doses 2,5mg/mL, e 10mg/mL, respectivamente; e no T3 (controle positivo) foi adicionado 0,1mL de salina. Os lotes foram homogeneizados por 1 hora em temperatura ambiente, seguido da adição de 0,1mL de sangue contaminado com tripomastigotas, posteriormente, estes foram homogeneizados por 10 minutos e armazenados à 4°C. Após 24 e 48 horas de incubação, a quantificação de tripomastigotas presentes no sangue foi realizada ao microscópio óptico, seguindo a metodologia descrita no item 3.6.

3.10- Atuação do ácido acetilsalicílico, v.o. e v.ip., na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*.

Dois experimentos distintos foram organizados com 20 camundongos cada, divididos em 4 grupos, de tal forma que no primeiro, GA, GB e GC receberam 0,5mL de tratamento via oral por meio de gavagem, utilizando sonda orogástrica de polietileno, com AAS nas doses de 25, 50 e 100mg/kg de massa do animal, respectivamente. No segundo, GA, GB e GC receberam tratamento com AAS, 0,2mL por via intraperitoneal, nas mesmas doses. Em ambos, o GD (grupo controle) recebeu água filtrada para ser submetido às mesmas condições de stress que os demais animais. O tratamento foi iniciado imediatamente após a infecção até o 9º dia da determinação da parasitemia

(item 3.6), em intervalos de 24 horas e o monitoramento da mortalidade até o 30^o dia posterior.

3.11- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de *Moringa oleifera*, de *Mandevilla velutina* e de própolis de *A. mellifera* em sangue contaminado com *Trypanosoma cruzi*.

Para cada ensaio foram utilizados tubos tipo "Eppendorf", separados em lotes (n=2). Em todos os lotes foi adicionado 0,9mL de sangue normal heparinizado e 0,1mL de AAS, extrato e da associação de ambos, conforme a divisão dos tubos. Os lotes foram homogeneizados por 1 hora em temperatura ambiente, seguido da adição de 0,1mL de sangue infectado com aproximadamente 50.000 tripomastigotas. Posteriormente, estes foram mais uma vez homogeneizados por 10 minutos e armazenados à 4°C. Após 24 e 48 horas, a quantificação de tripomastigotas presentes no sangue foi realizada conforme descrito no item 3.6.

3.12- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de *M. oleifera*, de *M. velutina* e de própolis de *A. mellifera*, v.o., na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Para cada extrato realizou-se um experimento diferente, utilizando animais em grupos de 5, separados da seguinte forma: GA - controle (água filtrada), GB- AAS, GC- EBL e GD- AAS +EBL (em diferentes doses). Os animais, logo após a contaminação com *T. cruzi*, foram tratados via oral durante 10 dias em intervalos de 24 horas. A determinação da parasitemia e o acompanhamento da mortalidade realizaram-se conforme os itens 3.6 e 3.7, respectivamente.

3.13- Atuação da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de *M. velutina*, v.ip., na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Neste teste formou-se grupos (n=5) de animais, separados da seguinte forma: GA - controle (salina), GB - AAS, GC- extrato e GD - AAS + extrato (em diferentes doses). Após a contaminação, as cobaias foram tratadas em intervalos de 24hs., via intraperitoneal, até o 10^o dia pós-infecção. O acompanhamento do seguimento evolutivo da doença foi de acordo com os itens 3.6 e 3.7, respectivamente.

3.14- Atuação do pré-tratamento da associação do ácido acetilsalicílico ao EBL de *M. oleifera* e de *M. velutina*, v.o., na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Todos os animais, nos dois experimentos, foram divididos em grupos (n=5) de tal forma que: GA – controle (salina), GB - AAS, GC – extrato e GD – AAS + extrato, receberam pré-tratamento, via oral, durante 7 dias em intervalos de 24hs antes de serem infectados até o 9º dia pós-infecção. Posteriormente, seguiu-se a metodologia descrita nos itens 3.6. e 3.7.

3.16- Análise estatística

Os números obtidos por meio da determinação das parasitemias foram aplicados à estatística paramétrica, utilizando o teste ANOVA e TUKEY (Programa SISTAT-Windows), os quais mostraram se existiam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos controle e experimentais para cada extrato, para o ácido acetilsalicílico e para a associação dos extratos naturais ao ácido acetilsalicílico no que se refere à concentração das doses e às vias administradas (oral e intraperitoneal).

04- RESULTADOS

4.1- Efeito do AAS *in vitro* em sangue contaminado com *Trypanosoma cruzi*

De acordo com os dados obtidos (figura 01), observou-se a redução de parasitos nos lotes T1 e T2 em relação ao controle, no período de 24 e 48 horas após a incubação.

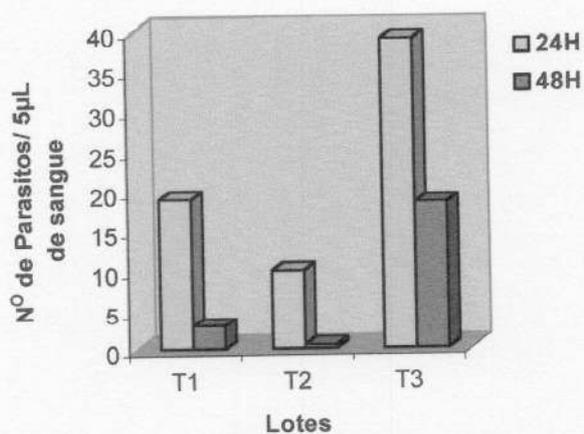


Figura 01- Parasitemia determinada nos lotes T1- 2,5mg/mL, T2- 10mg/mL de AAS e T3- salina (controle); após 24 e 48 horas de incubação à 4°C (média de ensaio em duplicata).

4.2- Efeito do AAS, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*

Na figura 02 (A) estão apresentadas as curvas de parasitemia, traçadas a partir das médias aritméticas diárias de cada grupo. Constatou-se diferença significativa ($*p < 0,05$ - teste ANOVA) nos grupos B e C, em relação ao controle. Todos os animais do grupo controle foram a óbito. O GA e o GC apresentaram 60% e o GB 20%, respectivamente, de mortalidade dos animais experimentais após 30 dias de observação.

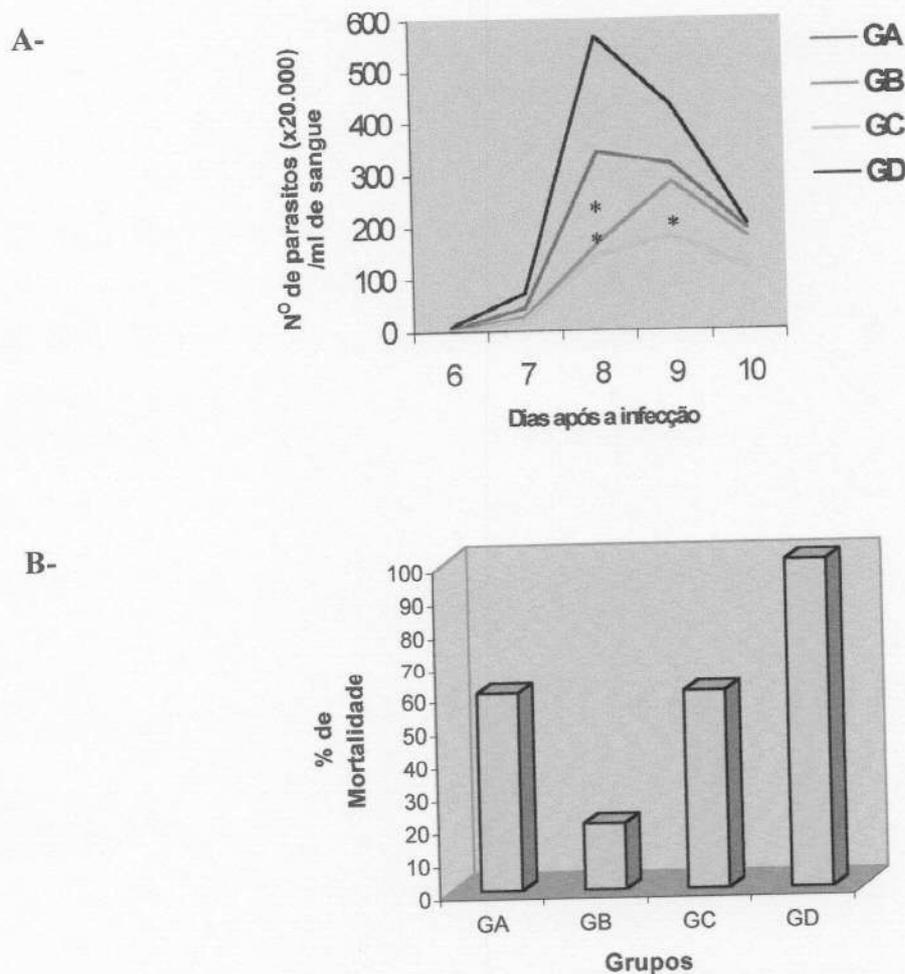


Figura 02- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS. GA - 25mg/kg, GB - 50mg/kg, GC - 100mg/kg e GD - (controle). Parasitemia determinada do 6º ao 10º dia pós-infecção. * $p < 0,05$ (teste ANOVA) quando comparados com o grupo controle. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

4.3- Efeito do AAS, v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo, foi testado o efeito do AAS administrado intraperitonealmente sobre a parasitemia e a mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi*. No GC foi observada redução parasitêmica de 70% ($p < 0,05$) e o GA e GB, aproximadamente 50%, em relação ao grupo controle. A sobrevivência dos camundongos dos grupos experimentais foi maior nos animais tratados com 25 e 50mg/kg (80% e 60%, respectivamente) e no GC (100mg/kg) não sobreviveu nenhum animal.

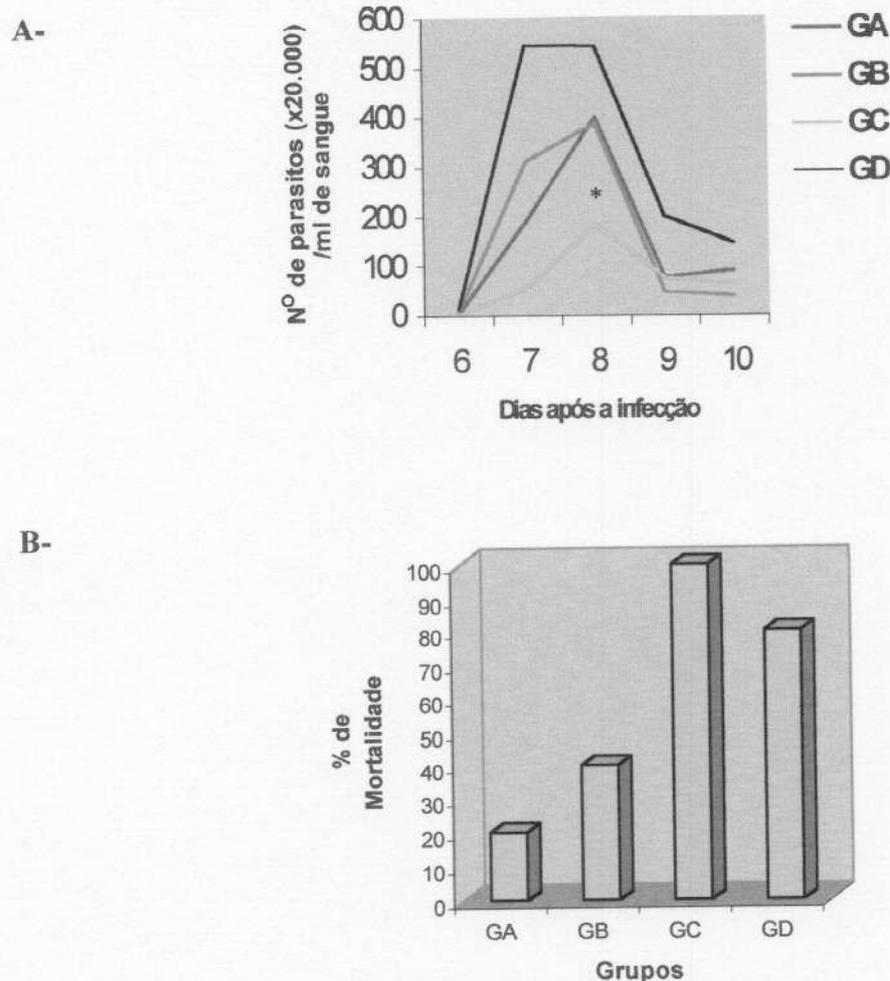


Figura 03- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS. GA- 25mg/kg, GB- 50mg/kg, GC-100mg/kg e GD- (controle). Parasitemia determinada do 6º ao 10º dia pós-infecção.* $p < 0,05$ (teste ANOVA) quando comparados com o grupo controle. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

4.4- Efeito da associação do AAS ao EBL de *Moringa oleifera* em sangue contaminado com tripomastigotas

Teste *in vitro* indicou que em 24 e 48 horas houve redução do número de parasitos em todos os lotes com tratamento em relação ao controle (sem tratamento). A maior redução encontrada foi no lote T4 (AAS 1,0mg/ml + EBL 2,5mg/ml), sendo superior a 90% em 24 e 48h.

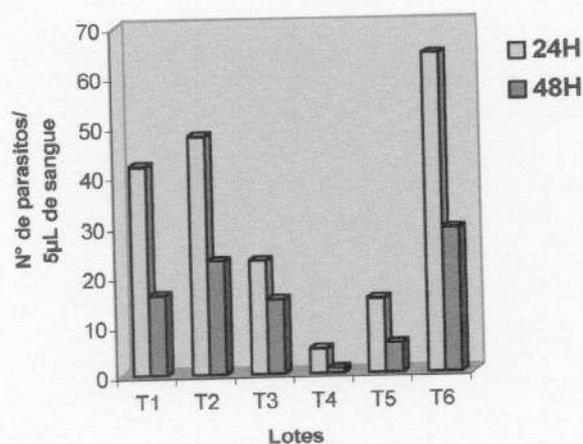
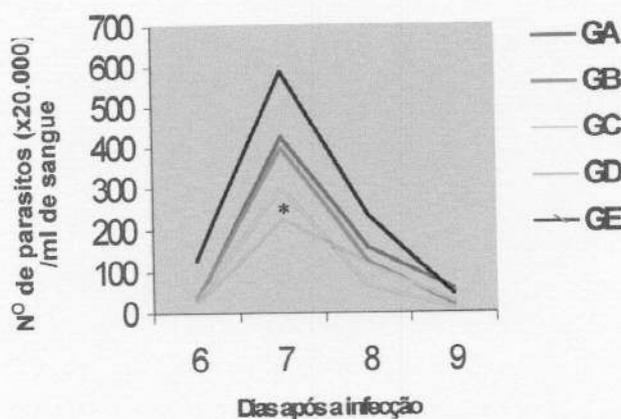


Figura 04- Parasitemia determinada nos lotes T1- AAS (2,5mg/ml), T2- EBL (2,5mg/ml), T3- AAS (2,5mg/ml) + EBL (2,5mg/ml), T4- AAS (1,0mg/ml) + EBL (2,5 mg/ml), T5- AAS (2,5mg/ml) + EBL (1,0mg/ml) e T6- controle, após 24 e 48 horas de incubação à 4° C (média de ensaio em duplicata).

4.5- Efeito da associação do AAS ao EBL de *Moringa oleifera*, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*

Quanto a parasitemia, houve diferença no grupo que recebeu a associação (D), com redução parasitêmica de 62%, no 7^o dia pós-infecção em relação ao GE. Observou-se 80% de mortalidade dos animais experimentais do GB e de 40% do GD.

A-



B-

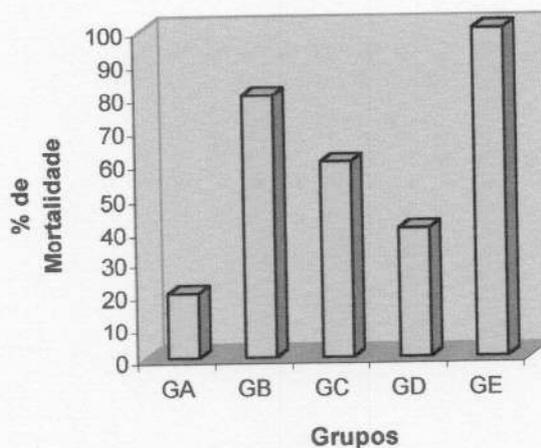


Figura 05- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS e EBL de *M. oleifera* GA- AAS (25mg/kg), GB- EBL (50mg/kg), GC- AAS (10mg/kg) + EBL (50mg/kg), GD- AAS (25mg/kg) + EBL (15mg/kg) e GE- (controle). Parasitemia determinada do 6^o ao 9^o dia pós-infecção.* $p < 0,05$ (teste ANOVA) quando comparados com o grupo controle. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

4.6- Efeito da associação do AAS ao EBL de *Mandevilla velutina* em sangue contaminado com tripomastigotas

Nos tubos 3 e 5 houve redução parasitêmica de 62% e 58%, após 24 horas e de 67% e 47% após 48 h, respectivamente, em relação ao controle sem tratamento. O EBL teve redução da parasitemia de 48% em 24h. Neste teste, em 24 e 48 h., o AAS reduziu o número de tripomastigotas em cerca de 30% em comparação ao T6.

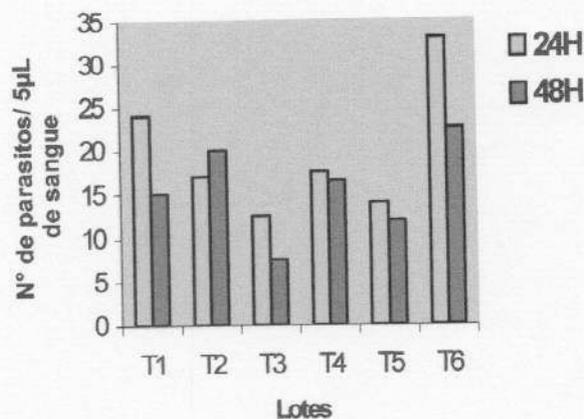
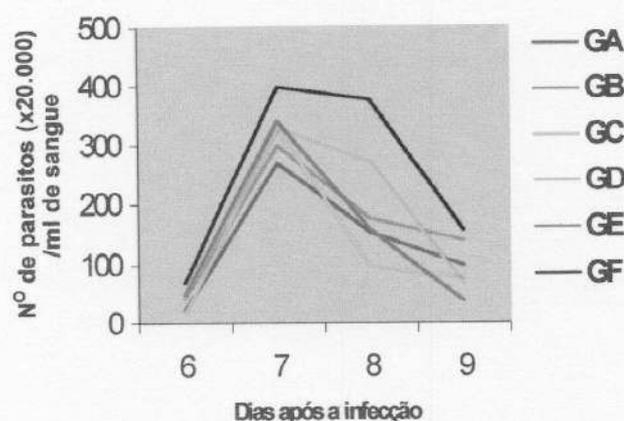


Figura 06- Parasitemia determinada nos lotes T1-AAS (2,5mg/mL), T2- EBL (2,5mg/mL), T3- AAS (2,5mg/mL) + EBL (2,5mg/mL), T4- AAS (1mg/mL) + EBL (2,5mg/mL), T5- AAS (2,5mg/mL) + EBL (1mg/mL) e T6 (controle); após 24 e 48 horas de incubação à 4°C (média de ensaio em duplicata).

4.7- Efeito da associação do AAS ao EBL de *Mandevilla velutina*, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Na figura 07 (A) estão apresentadas as curvas parasitêmicas, traçadas a partir das médias aritméticas diárias de cada grupo. Não foi observada diferença significativa nos grupos que receberam tratamento somente com AAS ou EBL, ou com as associações de ambos, em relação ao controle que recebeu apenas água. No GB constatou-se uma mortalidade de 40% dos animais experimentais e nos demais grupos a mortalidade foi maior ou igual a 80%.

A-



B-

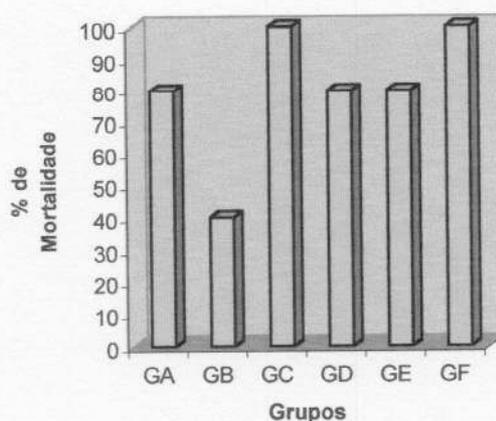


Figura 07- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS e EBL de *M. velutina*. GA- AAS (25mg/kg), GB- EBL (25mg/kg), GC- AAS (25mg/kg) + EBL (25mg/kg), GD- AAS (10mg/kg) + EBL (25mg/kg), GE- AAS (25mg/kg) + EBL (10mg/kg) e GF- (controle). Parasitemia determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

4.8- Efeito da associação do AAS ao EBL de própolis de *A. mellifera* em sangue contaminado com tripomastigotas

A atividade tripanomicida foi detectada em todos os lotes que receberam tratamento, sendo maiores nos lotes 4 e 5 com redução da parasitemia de 55% e 75%, respectivamente, comparados ao T6. Nos lotes contendo as associações, a contagem dos parasitas aos 24 e 48 h não diferiu entre si. O AAS reduziu 27% e o EBL 33% em 24 horas, e 41% e 44% em 48 horas, respectivamente.

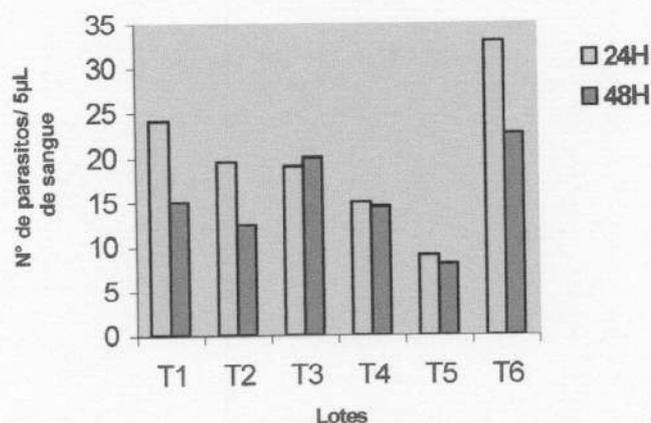


Figura 08- Parasitemia determinada nos lotes T1- AAS (2,5mg/mL), T2- EBL (20mg/mL), T3- AAS (2,5mg/mL) + EBL (20mg/mL), T4- AAS (1mg/mL) + EBL (20mg/mL), T5- AAS (2,5mg/mL) + EBL (5mg/mL) e T6 (controle); após 24 e 48 hs de incubação à 4° C (média de ensaio em duplicata).

4.9- Efeito da associação do AAS ao EBL de própolis de *A. mellifera*, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*

Neste experimento, o GC e o GD, reduziram a parasitemia em 62% e 73% ($p < 0,05$) no 8º dia pós-infecção, comparados ao GF. Os grupos D e E, que receberam associações, demonstraram maior sobrevivência.

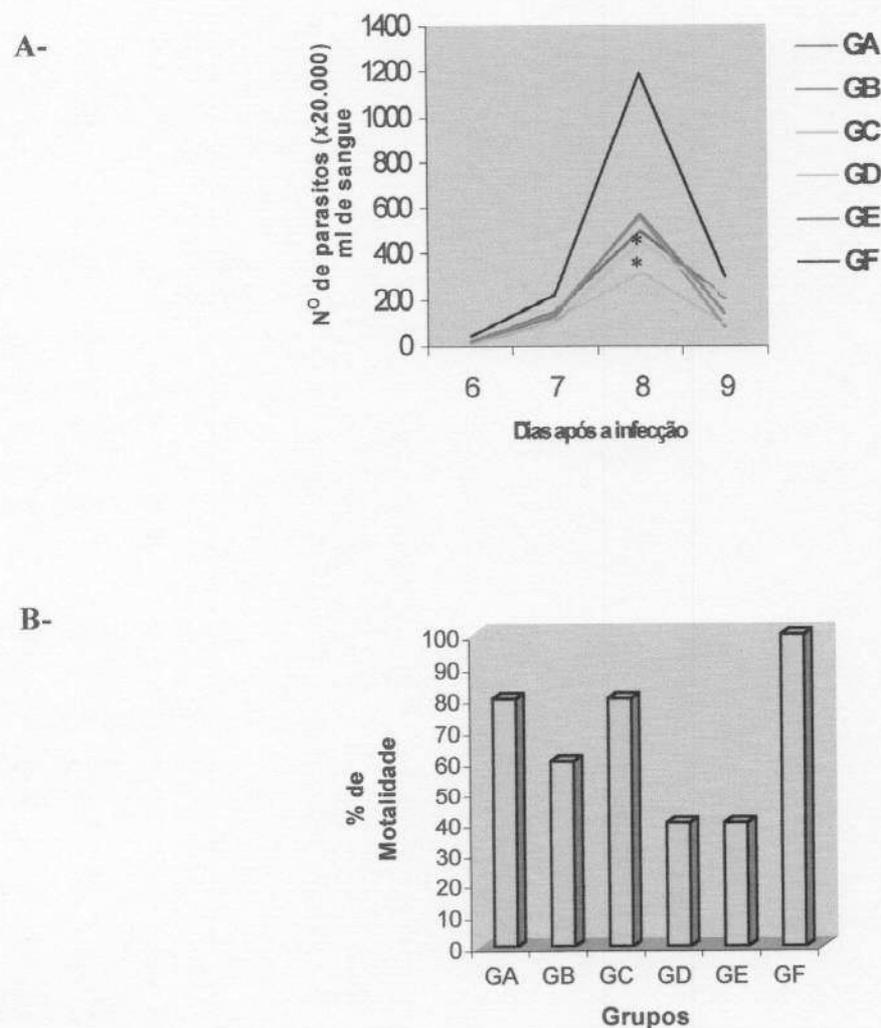


Figura 09- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS e EBL da própolis de *A. mellifera*. GA- AAS (25mg/kg), GB- EBL (77mg/kg), GC- AAS (25mg/kg) + EBL (77mg/kg), GD- AAS (10mg/kg) + EBL (77mg/kg), GE- AAS (25mg/kg) + EBL (20mg/kg) e GF- (controle). Parasitemia determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção.* $p < 0,05$. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção ($n=5$).

4.10- Efeito da associação do AAS ao EBL de *Mandevilla velutina*, v.ip., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*

Em todas as associações de AAS e *M. velutina* foram observadas redução significativa nas parasitemias, e também no GB (AAS). O grupo tratado apenas com EBL reduziu o número de tripomastigotas no sangue em cerca de 35% em relação ao GA (controle). Constatou-se uma menor mortalidade (20%) nos animais nos grupos E e F.

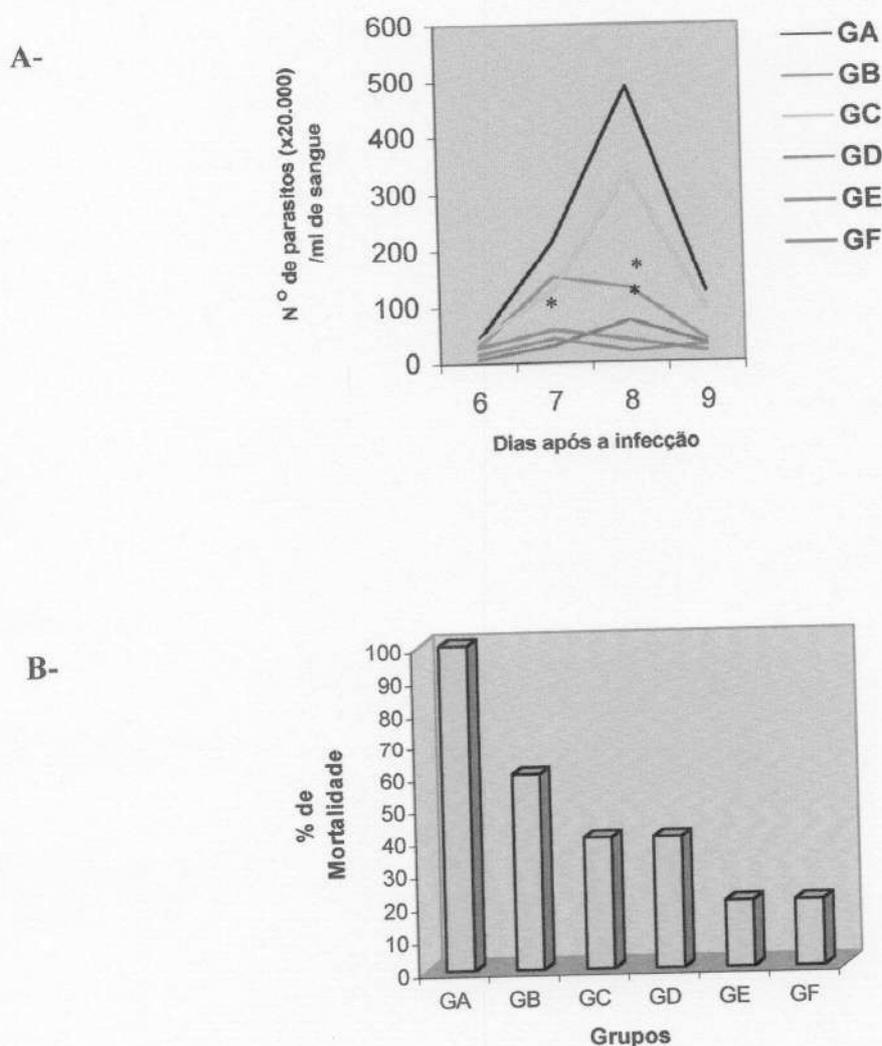
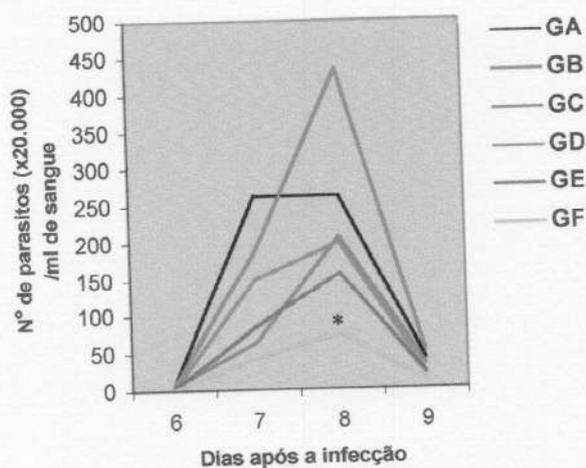


Figura 10- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS e EBL de *M. velutina*. GA – controle, GB - AAS (25mg/kg), GC - EBL (50mg/kg), GD - AAS (25mg/kg) + EBL (50mg/kg), GE - AAS (25mg/kg) + EBL (25mg/kg) e GF - AAS (10mg/kg) + EBL (20mg/kg). Parasitemia determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção.* $p < 0,05$ (teste ANOVA) quando comparados com o grupo controle. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

4.11- Efeito do pré-tratamento da associação do AAS ao EBL de *Moringa oleifera* e de *Mandevilla velutina*, v.o., na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*

No estudo de pré- tratamento foi possível verificar que no grupo tratado somente com AAS a parasitemia foi intensa, ou seja, o número de *T. cruzi* no sangue foi maior que aquele encontrado no grupo controle, ambos com 100% de mortalidade. As associações de AAS e EBL (GD e GF) demonstraram redução parasitêmica e mortalidade de 20% e 60% dos animais experimentais, respectivamente.

A-



B-

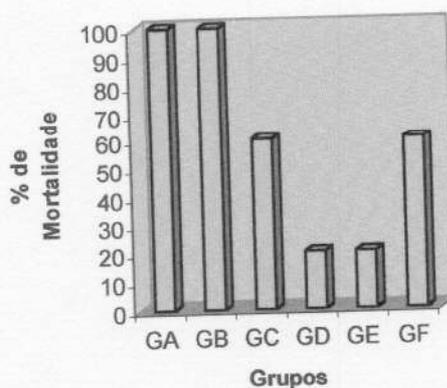


Figura 11- (A) Curvas de parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com AAS e EBL de *M. velutina* e de *M. oleifera*. GA – controle, GB - AAS (25mg/kg), GC - EBL de *M. velutina* (50mg/kg), GD - AAS (25mg/kg) + EBL de *M. velutina* (50mg/kg), GE - EBL de *M. oleifera* (50mg/kg) e GF - AAS (10mg/kg) + EBL de *M. oleifera* (50mg/kg). Parasitemia determinada do 6º ao 9º dia pós-infecção. * $p < 0,05$. (B) Porcentagem de mortalidade dos animais experimentais em observação por 30 dias após a infecção (n=5).

05-DISCUSSÃO

Diante da importância médica, socioeconômica da Doença de Chagas e da necessidade de novos medicamentos que possam ser empregados na sua terapêutica, este trabalho objetivou o estudo das associações entre a Aspirina^R e os extratos de *M. oleifera*, de *M. velutina* e da própolis de *A. mellifera* na fase aguda da Doença de Chagas experimental

O primeiro passo deste trabalho foi determinar doses do ácido acetilsalicílico e dos produtos naturais que individualmente reduzissem a parasitemia em torno de 50%, *in vitro* e *in vivo* nas condições padronizadas por Cover & Gutteridge (1982) e Brener (1979), respectivamente.

Partindo do pressuposto que Freire-de-Lima *et all* (2000) estudaram os efeitos do AAS no tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi*, via intraperitoneal e observaram que a dose de 50mg/kg promoveu inibição da parasitemia em cerca de 90%, foram elaborados experimentos com doses de AAS entre 25 e 100 mg/kg do peso do animal e 2,5 e 10 mg/mL em testes *in vitro*.

No ensaio *in vitro* com o AAS todos os lotes apresentaram redução da parasitemia em 24 horas, sendo os resultados das concentrações de 2,5mg/mL e 10mg/mL em torno de 51% (figura 01), o mesmo foi observado após 48 hrs, determinando a partir deste estudo as concentrações entre 2,5mg/mL e 10mg/mL a serem utilizados nos experimentos *in vitro*.

Testes em animais infectados com *T. cruzi* demonstraram que, para as associações propostas neste trabalho, seriam viáveis as doses entre 25 e 50 mg/kg de AAS em tratamento por via oral (fig.02) e de 25mg/kg por via intraperitoneal (fig.03), ou seja, doses que

reduziram a parasitemia em cerca de 50%. Os grupos tratados com 100mg/kg em ambas as vias de administração apresentaram reduções acentuadas da parasitemia dos camundongos infectados, porém, a alta taxa de mortalidade destes animais e os efeitos colaterais como o sangramento da cauda e a perda de peso mostraram que essa dose não seria aceitável para a associação. Pois doses altas ou repetitivas de Aspirina^R podem provocar inibição da agregação plaquetária e, conseqüentemente, causar hemorragias (DEF, 2001/2002).

Com base nos relatos de Oliveira (1999 e 2002) sobre a atividade anti-*T. cruzi* da *Moringa oleifera*, priorizou-se as doses de 25 e 50mg/kg do peso do animal para os experimentos *in vivo* e de 2,5mg/mL *in vitro*.

No experimento com sangue contaminado com tripomastigotas, no lote que recebeu a associação das concentrações de 1,0mg/mL de AAS e 2,5mg/mL de EBL de *M. oleifera* houve redução da parasitemia superior a 90% em 24 e 48 hrs, sugerindo um possível sinergismo (acréscimo da ação de uma droga por outra) entre o AAS e o EBL de *M. oleifera*, nestas concentrações contra o *T. cruzi*.

Em grupos de animais foram testadas diferentes doses para avaliar a capacidade anti-*T. cruzi* das associações de AAS e do EBL de *M. oleifera*. A mistura das doses de 25mg/kg (AAS) e 15mg/kg (EBL), reduziu a parasitemia em torno de 62% (figura 05), e promoveu a sobrevivência de 60% dos camundongos, potencializando o tratamento quando comparados aos respectivos controles e reproduzindo o teste *in vitro*.

Em estudos com EBL de *Mandevilla velutina* realizados por Silva (1999a), foi observado a ação tripanomicida do EBL em sangue incubado com *T. cruzi* nas concentrações de 10, 20 e 30mg/mL. Com respeito a associação da Aspirina^R ao EBL *M. velutina in vitro*, os valores das parasitemias apresentadas na figura 06 apontaram a concentração de 2,5mg/mL de AAS e de EBL como a combinação que mais potencializou o tratamento quando comparada o AAS e a *M. velutina* utilizadas separadamente, sugerindo um sinergismo entre ambos.

Nos ensaios com a *Mandevilla velutina*, em experimentos com animais infectados adotou-se a dose de 50mg/kg do peso do animal para as associações. Segundo Silva (1999a), os animais tratados com doses de 200mg/kg apresentaram uma diminuição mais acentuada da parasitemia (90%) e maior sobrevivência (100%). Em seguida, diferentes doses de EBL de *M. velutina* foram testadas em animais infectados com tripomastigotas (figura 07). Os resultados

das parasitemias das associações e dos componentes individuais foram semelhantes, não reproduzindo os dados do ensaio *in vitro* (fig. 06). No entanto, notou-se um aumento da mortalidade dos animais tratados somente com AAS (25mg/kg) em relação aos resultados da figura 02. Cabe esclarecer, que durante a execução do experimento, apareceram algumas feridas no corpo da maioria dos animais, provavelmente, interferindo na mortalidade dos mesmos e, conseqüentemente, no estudo.

Em testes realizados com o EBL de *M. oleifera* e de *M. velutina* (dados não apresentados), foram observados que a utilização de altas doses dos extratos não provocava efeitos tripanomicidas quando eram associadas ao AAS. É sabido que algumas plantas com propriedades medicinais quando utilizadas em excesso ou com produtos químicos podem não ter os efeitos positivos esperados, podendo até mesmo serem letais (Goodman *et al.*, 1996). Assim, associar a dose de 200mg/kg de EBL de *M. velutina*, tanto via oral como ip., ao AAS possivelmente causaria ao animal um resultado negativo.

Vale ressaltar, que a porção de ácido salicílico da molécula de AAS (salicilato) constitui o núcleo farmacologicamente ativo da molécula. A biotransformação dos salicilatos ocorre principalmente no fígado. Além disso, alguns medicamentos podem ser inativados no trato gastrointestinal antes de serem absorvidos e entrarem na circulação sistêmica (Craig e col, 1986). Sugere-se que os princípios ativos das associações de AAS aos extratos dos produtos naturais utilizadas no tratamento dos camundongos, que não reproduziram os ensaios *in vitro*, sofreram mudanças moleculares durante a absorção e, conseqüentemente, redução das suas propriedades farmacológicas.

O resultado do teste *in vitro* da concentração de 1g/mL de EBL da própolis de *A. mellifera* demonstrou intensa atividade tripanomicida (Moroni, 2001). Em relação à associação de AAS com a própolis de *A. mellifera* em sangue contaminado, foi observada redução da parasitemia nas doses de 1mg/mL de AAS + 20mg/mL de EBL e 2,5mg/mL de AAS + 5mg/mL de EBL (fig. 08). Com base nos resultados obtidos, sugere-se que ao diminuir a quantidade da própolis nas associações a atividade tripanomicida do tratamento tende a aumentar. É de importância citar que os efeitos do EBL e das associações foram apenas em 24horas, não mostrando mudanças significativas em 48horas, sugerindo então que os princípios ativos presentes no EBL da própolis poderiam estar sofrendo degradação e redução

das suas propriedades medicinais com o tempo. Por este motivo, o EBL da própolis passou a ser diluído sempre antes do início de cada tratamento.

Estudos realizados em animais por Moroni (2001) demonstraram que a própolis de *A. mellifera*, possui atividade contra o *T. cruzi* e que a melhor dose por via oral foi de 153,8mg/kg com porcentagem de redução da parasitemia em 82%. Neste trabalho, estabeleceu-se a metade da dose via oral (77mg/kg) para a realização dos experimentos, com o intuito de prevenir superdosagens.

Nos ensaios *in vivo*, todos os grupos experimentais que receberam tratamento reduziram a parasitemia, sendo que a dose de 10mg/kg (AAS) e 77mg/kg (EBL), provocou a maior redução parasitêmica (73%) e aumentou a sobrevivência dos animais em relação aos controles.

Na via oral de administração de medicamento, este pode sofrer degradação ao passar pelo sistema digestório, pode não sofrer absorção a nível de intestino ou, quando absorvido, pode ser metabolizado pelo fígado, com isso, o princípio ativo é degradado e a atividade medicinal passa a não existir. Já na v. ip., o fármaco entra direto na circulação sanguínea evitando processos como os descritos (Silva, 1999b). Com o intuito de aumentar a velocidade da absorção das associações nos animais, foram organizados testes em camundongos utilizando administração via intraperitoneal.

No experimento associando AAS ao EBL de *M. velutina* v.ip. todas as associações testadas promoveram redução parasitêmica em relação ao controle (fig. 10-A), sendo que em dois dos grupos que receberam associação (GE e GF- fig. 10B) alcançaram sobrevivência de 80% dos animais.

A associação do AAS ao EBL de *M. oleifera* (dados não apresentados), via intraperitoneal, nas doses de 10 e 25mg/kg, respectivamente, reduziu 70% da parasitemia ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado apenas com AAS e promoveu uma mortalidade de 40% dos animais, enquanto o AAS e o EBL foram de 40 e 60%, respectivamente. No entanto, pôde-se perceber a perda de peso dos animais tratados com a associação, de aproximadamente 20% do peso inicial, ao final dos dez dias de experimento. Tal resultado pode ser justificado pelo excesso de extrato ip. De acordo com Oliveira (2002), a presença de reações adversas nos

animais tratados indicou uma possível interferência no sistema nervoso central, causado pela toxicidade de um ou mais componente do EBL administrado intraperitonealmente.

Já as combinações de AAS ao EBL da própolis via ip. (resultados não apresentados) também promoveram reduções parasitêmicas em relação ao controle, e ao AAS e EBL quando administrados isoladamente. Os resultados obtidos não foram significativos, exceto a associação de 10mg/kg de AAS e 77mg/kg de EBL em relação ao controle que recebeu somente própolis e promoveu 80% de sobrevivência dos animais. Neste estudo, o extrato da própolis não foi eficaz, sugerindo que a via oral seja melhor para o tratamento da doença.

De acordo com Moroni (1998 e 2000), a melhor dose v.ip. é 924,6mg/kg do peso do animal. Assim se explica os resultados do experimento com o AAS e o EBL da própolis v.ip., no qual a própolis foi utilizada em doses menores, quanto à não reduzir a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Experimentos utilizando a via oral para administração AAS e via intraperitoneal para o EBL de *M. oleifera*, e vice-versa foram realizados com camundongos infectados com *T. cruzi* (dados não apresentados). Os resultados da parasitemia observados não diferiram em relação ao controle. Notou-se perda de peso, cansaço físico e estresse do animal durante o tratamento, possivelmente interferindo nos resultados experimentais.

Além disso, ao avaliar as inúmeras desvantagens da via intraperitoneal, incluindo dor, probabilidade de maior efeitos adversos, estresse, risco de contaminação, altos custos para o tratamento, e outros empecilhos destacados por Lapa (2000), não foram realizados mais estudos utilizando concomitantemente as vias oral e intraperitoneal neste trabalho.

Para uma possível prevenção com a associação do AAS e o EBL dos produtos naturais ou até uma amenização das sintomatologias da fase aguda da Doença de Chagas, realizou-se ensaios de pré - tratamento por via oral, os quais indicaram que a Aspirina^R sozinha não é eficiente quando utilizada durante intervalos maiores que 10 dias, resultando na mortalidade de 100% dos animais infectados em 30 dias pós-infecção (fig. 11).

Neste estudo, o EBL de *M. oleifera* e de *M. velutina* reduziram entre 50 a 60% a parasitemia. As associações apresentaram resultados semelhantes aos extratos administrados isoladamente, exceto a dose de 50mg/kg de EBL de *M. oleifera* e 10mg/kg de AAS, que resultou em 84% de redução parasitêmica em relação ao controle com AAS, com sobrevida de

40% dos camundongos experimentais. A associação das doses de 50mg/kg de *M. velutina* e 25mg/kg de AAS reduziu a parasitemia em 53% em relação ao controle tratado apenas com AAS e resultou em 20% de mortalidade dos animais (fig. 11-B).

Sobre a quimioterapia da Doença de Chagas, sabe-se que o desafio é produzir drogas efetivas, baratas e de baixa (ou sem) toxicidade para os pacientes. É relevante citar que com pequenas quantidades de AAS e dos extratos, foi possível detectar atividade tripanomicida nos experimentos realizados. Estes resultados são promissores no tratamento da Doença de Chagas, já que os componentes utilizados neste trabalho são acessíveis economicamente à maior parte da população e também possuem baixa toxicidade em dosagens menores.

Estudos anteriores sugerem o envolvimento do Sistema Óxido Nítrico no mecanismo de ação do EBL de *Mandevilla velutina* (Silva, 1999a), da própolis de *Apis mellifera* (Moroni, 2001) e da *Moringa oleifera* (Oliveira, 2002) na redução da parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*. Segundo Rang (2001), altas concentrações de NO, além de promover a vasodilatação inibem a COX. O ácido acetilsalicílico ao inibir a COX, interrompe a biossíntese das PGs inibindo o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, como citado na introdução. Neste contexto, pode-se sugerir uma possível correlação destes mecanismos no combate ao parasita pelas associações testadas no presente trabalho, porém estudos adicionais deverão ser realizados para um maior esclarecimento.

06- CONCLUSÃO

- » Nos experimentos *in vitro*, todos os lotes com associações demonstraram atividade tripanomicida.
- » O efeito anti-*T. cruzi* da associação das doses de 25mg/kg de AAS e de 15mg/kg de *Moringa oleifera* administrado v.o., foi maior do que os respectivos controles. As associações aplicadas intraperitonealmente promoveram reações colaterais nos animais experimentais, não sendo melhores do que o tratamento do AAS e do EBL administrados individualmente;
- » As associações do AAS ao EBL de *Mandevilla velutina* v.o. promoveram reduções parasitêmicas semelhantes aos componentes administrados isoladamente, ou seja, não potencializaram o tratamento. No entanto, todas as combinações testadas v.ip., foram mais eficazes do que os respectivos controles.
- » A dose de 10mg/kg de AAS e de 77mg/kg de EBL da própolis administrada v.o., resultou na maior redução parasitêmica do experimento e aumentou a sobrevivência dos animais em relação aos controles. Para tratamentos v.ip., o EBL da própolis não é eficaz em dose de 77mg/kg.
- » O período de pré- tratamento (7 dias) anterior a infecção dos animais provocou um aumento da parasitemia e mortalidade dos animais tratados somente com AAS. A associação com a dose de 50mg/kg de EBL de *M. oleifera* e 10mg/kg de AAS, promoveu a redução da parasitemia e o aumento da sobrevivência dos animais em relação aos grupos controles.
- » A utilização das vias oral e intraperitoneal, concomitantemente, para a administração do tratamento foi descartada devido aos efeitos adversos observados nos animais experimentais.

07-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEZZATO, B. **Desenvolvimento anatômico e propagação vegetativa de *Mandevilla velutina* vari. Gabre (Muell-Arg) WOODSON-APOCINACEAE**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 100p. (Dissertação de Mestrado). 1988.

AGUIAR,C.B.F. Adaptação de Camundongos à Dieta Canídea: Parâmetros Bioquímicos, Hematológicos e Resistência a Infecção com *Trypanosoma cruzi*. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 67p. **Dissertação de Mestrado (Genética e Bioquímica)**. 2002.

ARAÚJO-JORGE,T.C. Resposta do Hospedeiro à infecção. In: ARAÚJO-JORGE,T.C.;DE CASTRO,S.L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, p.111-121.2000.

ASSIS, L. Mal de Chagas perto da cura. **Jornal de Brasília**,Brasília, 15 de Novembro de 2000. Disponível em: < http://www.cfm.org.br/clipping/Ano_2000/12-2000/15-12-2000/jbrasilha.htm.

Acesso em: 02 de novembro de 2002.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.460, 1979.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.460, 2000.

CALIXTO, J.B.; NICOLAU, M.; YUNES, R.A. The selective antagonism of bradykinin action on rat isolated uterus by crude *Mandevilla velutina* extract. **British Journal of Pharmacology**, v.85, p.729-731. 1985.

CHAVES, J.; CUNHA, R.H.; KAWABATA, J.N. Miocardite Chagásica Experimental: Resposta Celular na Fase Aguda. **Rev. Pat. Trop.** 15(2):91-98, jul./dez. 1986.

COVER, B.; GUTTERIDGE, W.E. A primary for drugs to prevent transmission of Chagas's disease during blood forms of *Trypanosoma cruzi*, both in vitro and infected blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.76, p.50-57, 1982.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Rev. Mem. Oswaldo Cruz**, rio de Janeiro, vol. 97(1): 3-24, January, 2002.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna**. 1ª edição da Livraria Roca Ltda. Vol. Único, 984 p. 1986.

DE CASTRO, S.L.; SANTA-RITA, R.M.; EINICKEN-LAMAS, M. Quimioterapia Experimental. In: ARAÚJO-JORGE, T.C.; DEECASTRO, S.L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, p.111-121.2000.

Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. Editora de Publicações Científicas Ltda. Produção Jornal Brasileiro de Medicina. 1148 p., 2001/2002.

DIAS, J. C. P. Controle da doença de Chagas. In: **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral** (J. C. P. Dias & J. R. Coura, org.), Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 453-468. 1997.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MELLO, F.G.; DOS REIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Rev. Nature**, vol.403, p. 199-202, 13 January 2000.

GOODMAN-HARDMAN, J., GILMAN, A.G.; LIMBIRD; L.E.; MOLINOFF, P.B.; P.B.; RUDDON, R.W. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** . 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. p.1435, 1996.

HIGASHI, K.O. and DE CASTRO, S.L. Própolis extrats are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v.43, p.149-155.1994.

LANNI, B.M.; MADY, C. Terapêutica da fase crônica da doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico?. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.70, n.1, p.59-61, 1998.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L; LIMA, T.C.M. Plantas medicinais: métodos farmacológicos para a avaliação da atividade. **Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. 52^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência- SBPC. Curso: Métodos Farmacológicos para avaliação da atividade. Julho, 2000.

- KERR, W.E.; SILVA, A.R. **Moringa -Uma nova hortaliça para o Brasil.** 1ª.ed.Uberlândia.UFU/DIRIU, 1999.
- MORONI, F. T. A Utilização do Produto Apícola Própolis no Tratamento da Doença de Chagas. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 56p. **Monografia, Graduação.**1998.
- MORONI, F. T. A Utilização do Produto Apícola Própolis no Tratamento da Doença de Chagas. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 120p. **Dissertação de Mestrado (Genética e Bioquímica).** 2001.
- OLIVEIRA,H.S.;SILVA,T.A.;BRANDEBURGO,M.I.H.;HAMAGUCHI,A. Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Moringa oleifera* (MORINGACEAE) na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. In: Reunião Anual da SBPC, Brasília-DF, livro de resumos, p.100, resumo 4458-A10, 190p. 1999.
- OLIVEIRA,H.S. Efeito Terapêutico de *Moringa oleifera* (Moringacea) na Parasitemia de Camundongos Infectados Experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 40p. **Monografia, Graduação.** 2002.
- PINHO, A.L. e COSTA, O.M. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, Junho, vol.31 no.3. ISSN 0037-8682. 1998.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia.** Editora Guanabara koogan, 4ª ed., p.703, 189-203, 1999.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia.** São Paulo, ed. Manole Ltda, p.425, 3ª ed. 1997

- ROSÁRIO, N.A. e RIBEIRO, A. C. Achados clínicos da sensibilidade a analgésicos e antiinflamatórios não-hormonais. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, Setembro, vol.46 no.3. ISSN 0104-4230. 2000.
- SILVA, R. M. G. Estudo da Ação Tripanomicida do Extrato Bruto de *Mandevilla velutina* em Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi*. Uberlândia, 60p. **Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)**, Universidade Federal de Uberlândia, 1999a.
- SILVA, R. M. G. Efeito do Extrato Bruto de *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) na Infecção de Camundongos com *Trypanosoma cruzi*. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 56p. **Monografia, Graduação**.1996.
- SILVA, T. A. Efeito do Extrato Bruto Liofilizado de *Ginkgo biloba* na Parasitemia e Mortalidade de Camundongos Infectados Experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, **Monografia de Graduação**. 1999b.
- SIQUEIRA- BATISTA, R.; CORRÊA, A.D. E HUGGINS, D.VW. **Moléstia de Chagas**. Editora Cultural Médica®. RJ/ Brasil, pg.185. 1996.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Pharmaceutics and phytotherapies: the need for deselopment of the industry of phytofarmaceutics and phytotherapies in Brazil. **Quimica Nova**. 24 (1): 147-152, 2001.