

Mariana da Costa Siqueira

“Avaliação da citotoxicidade de extratos, frações e substâncias puras de *Pterogyne nitens* em *Trypanosoma cruzi* e em macrófagos”

Araraquara – SP

2012

Mariana da Costa Siqueira

“Avaliação da citotoxicidade de extratos, frações e substâncias puras de *Pterogyne nitens* em *Trypanosoma cruzi* e em macrófagos”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica - Bioquímica.

Orientador: Prof^a Dr^a Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara – SP

2012

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo durante esses anos de faculdade, me apoiando, me dando forças para continuar e me fazendo acreditar que tudo isso valeria a pena.

À minha família, minha fortaleza, meus melhores amigos. Amo vocês acima de tudo.

Às minhas grandes amigas-irmãs: Anália, Cris, Dalvi, Gabi.

Às minhas grandes companheiras Caroline e Clau, obrigada por me apoiarem sempre.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e a minha família, por terem sido a minha base durante esses anos todos.

Agradeço à FAPESP pelo apoio ao trabalho desenvolvido.

A todos do Laboratório de Imunologia, em especial à técnica Val, aos mestres Gabriela Duó Passerini, Gabriela Alves Licursi Vieira e Rogério Andreo, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e à Professora Regina Cicarelli, pela orientação durante o projeto.

Agradeço a todos do Laboratório de Parasitologia, pela ajuda com alguns equipamentos e metodologias.

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Meios, soluções e reagentes	19
3.2 Métodos	21
4. Resultados e Discussão	26
5. Conclusões	41
6. Referências Bibliográficas	43

RESUMO

A atividade biológica de extratos, frações e substâncias puras de *Pterogyne nitens* foi avaliada em formas epimastigotas das cepas Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi*, e a citotoxicidade das substâncias com potente atividade tripanocida foi testada em macrófagos murinos pelo método colorimétrico de redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) a formazana, um produto colorido. As mesmas amostras foram também avaliadas quanto a um possível sinergismo com o fármaco benzonidazol.

Foram consideradas substâncias ativas contra o parasito: nitensidinas A, D, E e ácido cafeico, com concentrações inibitórias (CI_{50}) inferiores às do benzonidazol (9,01 $\mu\text{g/mL}$ para cepa Y e 25,00 $\mu\text{g/mL}$ para cepa Bolívia). Essas substâncias foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade em macrófagos de camundongos isogênicos *Balb/c* e *C57/Black* não infectados utilizando-se o mesmo método colorimétrico. Além disso, essas mesmas substâncias foram analisadas em diferentes tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas, a fim de detectar-se o seu tempo mínimo de ação nos parasitos que foram então observados quanto à sua morfologia através de microscopia de contraste de fase. Os resultados indicam que não há toxicidade seletiva, ou seja, as moléculas se mostraram tóxicas tanto para as cepas testadas do parasito, quanto para macrófagos murinos das linhagens utilizadas. Modificações nas estruturas químicas podem ser sugeridas para que as substâncias continuem ativas contra *Trypanosoma cruzi* e se tornem menos tóxicas para células de mamíferos.

Palavras-chave: MTT, *Pterogyne nitens*, *Trypanosoma cruzi*, macrófagos murinos.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Algumas espécies da família Reduviidae, as quais são epidemiologicamente significantes como vetores. BELLINI, et al., 2011. Erro! Indicador não definido.
- Figura 2:** Estágios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*. (a) forma amastigota; (b) forma epimastigota; (c) forma tripomastigota. **12**
- Figura 3:** Alcalóides guanidínicos de *Pterogyne nitens*. **28**
- Figura 4:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina A. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **35**
- Figura 5:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina D. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **36**
- Figura 6:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina E. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **36**
- Figura 7:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com ácido cafeico. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **37**
- Figura 8:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle. Tempos: zero, 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **37**
- Figura 9:** Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi* em contato com nitensidina A. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%. **38**

Figura 10: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de <i>T. cruzi</i> em contato com nitensidina D. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.	38
Figura 11: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de <i>T. cruzi</i> em contato com nitensidina E. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.	39
Figura 12: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de <i>T. cruzi</i> em contato com ácido cafeico. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.	39
Figura 13: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de <i>T. cruzi</i> . Controle. Tempos: zero, 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Extratos, frações e substâncias puras testados em cepas Y e Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Tabela 2: Amostras testadas em cepas Y e Bolívia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Tabela 3: Resultados da citotoxicidade das substâncias em macrófagos de camundongos <i>Balb/c</i> e <i>C57/Black</i>	29
Tabela 4: Índices de segurança (<i>safety index</i>) das substâncias estudadas.....	30
Tabela 5: Resultados do teste de redução do MTT em diferentes tempos para cepa Y	30
Tabela 6: Resultados do teste de redução do MTT em diferentes tempos para cepa Bolívia .	30
Tabela 7: Avaliação do efeito sinérgico entre extratos, frações e substâncias obtidas de <i>Pterogyne nitens</i> com benzonidazol e formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y e BOL).....	32
Tabela 8: Valores de CI ₅₀ das substâncias testadas em macrófagos de camundongos <i>Balb/c</i> e <i>C57/Black</i>	34
Tabela 9: Índices de segurança (<i>safety index</i>) das substâncias estudadas.....	34

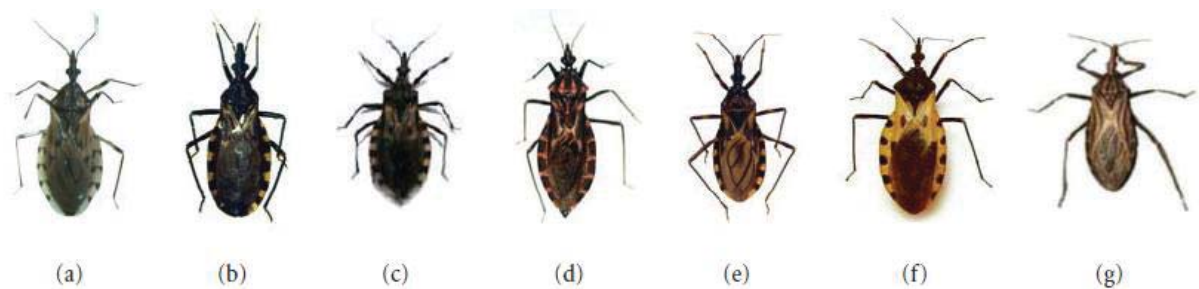
1. Introdução

A Doença de Chagas é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário pertencente ao subfiló Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (LANA & TAFURI, 2000; SCHMUÑIZ, 2000; REY, 2001), e transmitida pelo inseto triatomíneo barbeiro (CARNEIRO, 1963).

Atualmente afeta aproximadamente oito milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2007) e está se tornando um problema de saúde significativo em países desenvolvidos como EUA e Espanha (RIERA et al., 2006; HOTEZ, 2008).

Existem três ciclos de transmissão vetorial, doméstico, silvestre e peridoméstico. O ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, já que perpetua a infecção em seres humanos. Nesse ciclo, o vetor (Figura 1) cresce e multiplica-se em fendas nas paredes, buracos nos telhados, debaixo e atrás de móveis, quadros e outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru e telhados de palha ou junco (BRENER et al., 2000).

Figura 1: Algumas espécies da família Reduviidae, as quais são epidemiologicamente significantes como vetores: (a) *Triatoma sordida*; (b) *Triatoma infestans*; (c) *Triatoma pseudomaculata*; (d) *Panstrongylus megistus*; (e) *Triatoma brasiliensis*; (f) *Triatoma dimidiata* (BELLINI et al., 2011).



As principais formas de transmissão da doença são: vetorial, através do contato da picada com as fezes e urina de triatomíneos contaminados; e congênita. Outras formas menos frequentes de transmissão da doença se dão através da doação de órgãos, consumo de comida ou bebida contaminada (transmissão oral) e acidentes laboratoriais.

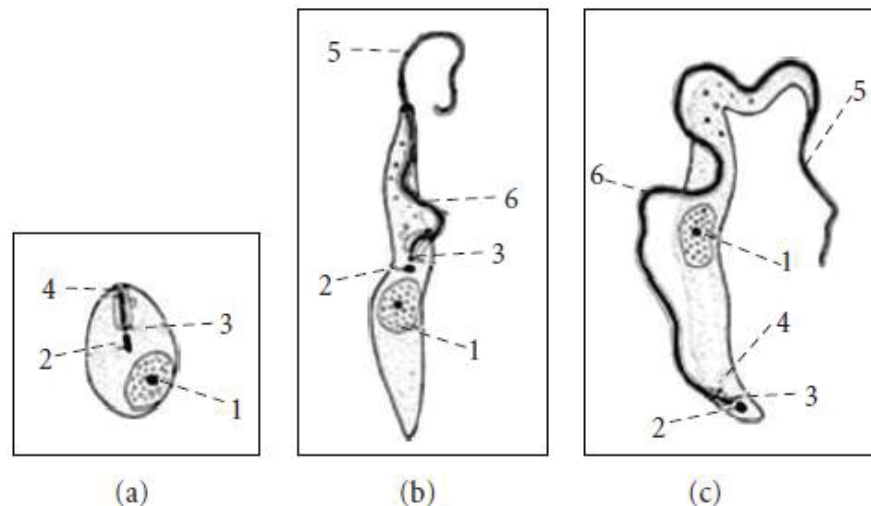
Inicialmente a doença era essencialmente limitada ao continente americano (considerada endêmica em 21 países, desde o sul dos EUA até o norte da Argentina e do Chile), especialmente em áreas rurais. Atualmente, a Doença de Chagas atravessou fronteiras internacionais e, em áreas não endêmicas, a infecção pode ser transmitida verticalmente (transmissão congênita), através de transfusão sanguínea, através do transplante de órgãos de doadores infectados e ainda raramente por acidentes de laboratório. Com o aumento do número de mulheres migrantes para áreas não endêmicas, especialmente para os EUA e Espanha, a possibilidade da transmissão congênita torna-se um problema relevante nestes países. Estudos recentes demonstram que nos EUA apenas 9% dos médicos obstetras e ginecologistas mostraram-se atentos ao risco da transmissão congênita da Doença de Chagas (PÉREZ-MOLINA et al., 2012).

A Doença de Chagas é dividida basicamente em duas fases: aguda e crônica. Durante a fase aguda os sintomas podem incluir febre, inflamação no local de inoculação, edema unilateral de pálpebra (sinal de Romaña), inchaço de linfonodos e esplenomegalia. Esta fase desaparece espontaneamente em 2 a 4 meses, e o paciente, se não tratado, permanece infectado entrando na fase crônica. Cerca de 60% dos pacientes nunca apresentam sintomas, enquanto os outros 40% desenvolvem 20 a 30 anos após a fase aguda cardiomiopatia, arritmias, megasíndromes e, mais raramente, polineuropatias (PÉREZ-MOLINA et al., 2012).

O parasito *T. cruzi* apresenta as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 2). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Esta forma está presente no início do intestino do barbeiro. A forma tripomastigota é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, com flagelo que se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior, sendo ela a forma infectante, presente na parte terminal do intestino do triatomíneo.

A forma amastigota é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza e é encontrada dentro dos macrófagos principalmente (LANA & TAFURI, 2000; BELLINI et al., 2011).

Figura 2: Estágios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*. (a) forma amastigota; (b) forma epimastigota; (c) forma tripomastigota. (1) núcleo, (2) cinetoplasto, (3) corpo basal, (4) bolso flagelar, (5) flagelo, (6) membrana ondulante (BELLINI et al., 2011).



É bem conhecido o papel que tem o macrófago como célula de primeira linha de defesa na proteção natural frente a diferentes agentes infecciosos, dentre eles o *T. cruzi*. Apesar de o macrófago possuir diversos mecanismos de defesa, o parasito também possui recursos para invadi-lo e para evadir às suas ações uma vez fagocitado. Em alguns casos, esta célula fagocítica parece ser insuficiente e o microrganismo tenta escapar à ação microbicida, gerando uma infecção crônica (FERREIRA & BONFIM-MELO, 2012).

Muitos fármacos para o tratamento da Doença de Chagas estão em desenvolvimento atualmente, no entanto, muitos deles ainda se encontram em fase pré-clínica de testes. As moléculas mais promissoras são aquelas inibidoras da biossíntese de ergosterol e inibidores de cruzipaína, uma enzima primária expressa durante a infecção pelo *T. cruzi* e dita ser essencial para infectar o hospedeiro mamífero.

No final de 1960 e começo da década de 70, dois fármacos começaram a ser utilizados no tratamento da Doença de Chagas: nifurtimox e benzonidazol, comercializados, respectivamente, com os nomes Lampit® e Rochagan® (COURA & CASTRO, 2002). Entre os efeitos colaterais dos dois medicamentos, pode-se observar: perda de peso, náusea e vômito, excitação nervosa, insônia, convulsão, vertigens, dores de cabeça e sonolência (MAYA et al., 1997; VELOSO et al., 2001). Ambos fármacos, nifurtimox e benzonidazol são compostos nitroheterocíclicos, que precisam ser ativados por redução para exercer suas ações citotóxicas. Durante o processo de bioativação, radicais livres são formados, de maneira que a atividade antiparasitária está estreitamente relacionada com a toxicidade ao hospedeiro. São fármacos com alta teratogenicidade e, portanto, não podem ser administrados em mulheres grávidas. Benzonidazol é o fármaco de preferência, devido a seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração tecidual e possível melhor eficácia. É administrado em doses de 5–10 mg/kg/dia em crianças e 5 mg/kg/dia em adultos, sendo essas doses divididas em duas ou três ao dia, preferencialmente após as refeições e por 60 dias (PÉREZ-MOLINA et al., 2012). No Brasil, o nifurtimox foi retirado do mercado devido a seus efeitos colaterais (LANA & TAFURI, 2000; REY, 2001) e em 2003, a empresa farmacêutica Roche parou de produzir o Rochagan®. Em 2004 iniciou-se a transferência de tecnologia da produção do medicamento para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (MEY et al., 2012), que é o único produtor de benzonidazol no Brasil e no mundo (CORREIO BRASILIENSE, 2012). Entre abril e outubro de 2011, houve falta no fornecimento de matéria-prima para a produção do medicamento, o que ocasionou desabastecimento em diversas regiões do país, inclusive naqueles locais com grande quantidade de doentes crônicos e onde há grande possibilidade do surgimento de novos casos da fase aguda da Doença de Chagas. Houve mudança do fornecedor de matéria-prima e, segundo responsáveis do LAFEPE, a produção

foi normalizada. Considerando a situação atual, mais estudos são necessários para avaliar fármacos mais eficazes para o tratamento da Doença de Chagas.

A eficácia do tratamento da Doença de Chagas é difícil de ser avaliada, uma vez que depende da fase em que a doença se encontra, da dose utilizada e do tempo de tratamento. Além disso, para monitorar a resposta ao tratamento, são utilizados métodos clássicos, como xenodiagnóstico e culturas de sangue, pouco sensíveis, principalmente durante a fase crônica e, a ausência de parasitemia não indica ausência de parasitos nos tecidos. Técnicas de PCR aumentaram a sensibilidade de detecção dos parasitos e são úteis na avaliação rápida de possíveis falhas no tratamento.

Após tratamento com benzonidazol, há cura em cerca de 80% dos pacientes em fase aguda, em 90% dos pacientes infectados congenitamente tratados no primeiro ano de vida. Sua eficácia é menos clara em pacientes crônicos, principalmente devido a falhas nos estudos clínicos realizados, que não permitem afirmar qual a taxa de cura nesses pacientes. Dados atuais indicam entre 5% e 20% de cura de pacientes adultos em fase crônica (PÉREZ-MOLINA et al., 2012).

Atualmente, a maioria dos medicamentos, incluindo antimicrobianos, antineoplásicos e antiparasitários são baseados em substâncias naturais (WINK, 2007, 2008; SCHÄFER e WINK, 2009). As substâncias bioativas vegetais são na maior parte metabólitos secundários, que são usados como defesa contra predadores e/ou parasitos, bem como para outras relações inter e intraespecíficas (HARBORNE, 1990).

Devido à imensa flora e aos aspectos culturais do uso de plantas medicinais na forma de decoctos ou infusões, seu uso tornou-se uma prática muito comum no tratamento de infecções no Brasil (CALIXTO, 2000). Essa diversidade química e as diferentes atividades farmacológicas das plantas vêm trazendo o desenvolvimento de centenas de novas substâncias bioativas (LUIZE et al., 2005) e, neste contexto, extratos vegetais oferecem possibilidades de

obtenção de novos metabólitos com atividade contra protozoários, incluindo os tripanosomatídeos. Estudos em diferentes países, incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia vêm demonstrando que diversas plantas possuem atividade contra o *T. cruzi* (MUELAS-SERRANO et al., 2000; WENINGER et al., 2001; ABE et al., 2002; IGWEH et al., 2002; COTINGUIBA et al., 2009).

Na busca por novas plantas que apresentem moléculas que possam ter boa atividade contra o *T. cruzi*, realizou-se um teste preliminar para avaliar a atividade tripanocida da fração alcaloídica de folha de *P. nitens* e observou-se ótimo resultado. A concentração inibitória do composto que reduz em 50% a viabilidade celular (CI₅₀), para esta fração foi 9,19 µg/mL, o que indica boa atividade tripanocida dessa fração de *P. nitens*, quando comparada à atividade do fármaco benzonidazol.

Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, sendo popularmente conhecida como “amendoim do campo”, “amendoim bravo”, “bálsamo”, entre outros. Esta espécie ocorre desde o Ceará até o Paraná, bem como em outros países latino-americanos como Argentina, Bolívia e Paraguai. Esta leguminosa é a única do gênero e está incluída na lista de espécies brasileiras em extinção, sendo, portanto, recomendada para a conservação genética no Estado de São Paulo (CARVALHO et al., 1994). A madeira do “amendoim-bravo” é moderadamente densa e apresenta relativa resistência física, sendo amplamente empregada na construção civil (LORENZI et al., 1998). O lenho de *P. nitens* apresenta uma seiva rósea e o extrato aquoso do seu “pó-de-serra” tem coloração roxa, sendo muito utilizado na tinturaria. (CARVALHO et al., 1994).

Contudo, existem poucos relatos das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Segundo estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina, as cascas do caule possuem ação anti-helmíntica contra o “tacho”, nome popular de *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007).

O rastreamento de novas substâncias tripanocidas requeria um processo de contagem ao microscópio, demandando grande tempo, trabalho de laboratório intenso e a presença de um observador único. Dessa forma, novas metodologias de investigação surgiram frente a essa dificuldade, dentre elas os métodos colorimétricos.

Pode-se citar, por exemplo, a redução do sal tetrazólio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide] em um produto colorido, formazana, pela enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (DUTTA et al., 2005). Esse produto colorido, determinado espectrofotometricamente a 595 nm, depois de dissolvido os cristais em dodecil sulfato de sódio, é proporcional a atividade metabólica das células observadas ou a viabilidade destas em cultura (SIEUWERTS et al., 1995). Essa técnica é de fácil e rápida aplicação, e possibilita testar diversas substâncias simultaneamente (MUELAS-SERRANO et al., 2000), tendo sido realizada algumas vezes com sucesso em células de mamíferos e alguns protozoários, como as formas promastigotas (BERG et al., 1994) e amastigotas de *Leishmania* (SERENO & LEMESTRE, 1997), forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* (ELLIS et al., 1993), *Entamoeba histolytica* (CEDILLO-RIVERA et al., 1992), trofozoitos de *Giardia duodenalis* (PONCE-MACOTELA et al., 1994), *Tetrahymena pyriformis* (HEGYESI & CSABA, 1997) e epimastigotas de *T. cruzi* (MUELAS-SERRANO et al., 2000; COTINGUIBA et al., 2009).

Neste trabalho, testou-se diferentes extratos, frações e substâncias isoladas de *P. nitens* para a atividade tripanocida nas cepas Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e Bolívia (FUNAYAMA & PRADO JUNIOR, 1974; ZINGALES et al., 1998) de *T. cruzi*. Os parasitos submetidos à ação das substâncias ativas também foram avaliados quanto à morfologia, por microscopia de contraste de fase.

As substâncias com atividade tripanocida satisfatória foram testadas também em macrófagos de camundongos isogênicos *Balb/c* e *C57/Black*, não-infectados, os quais apresentam, respectivamente, baixa e alta resistência à infecção pelo *T. cruzi*

(WRIGHTSMAN et al., 1981). Essas avaliações permitirão abrir perspectivas futuras de estudos mais aprofundados sobre possíveis mecanismos de ação das substâncias.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Testar diferentes extratos, frações e substâncias isoladas de *P. nitens* quanto à atividade tripanocida nas cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias com atividade tripanocida satisfatória em macrófagos de camundongos isogênicos *Balb/c* e *C57/Black*, não-infectados, os quais apresentam, respectivamente, baixa e alta resistência à infecção pelo *T. cruzi* (WRIGHTSMAN et al., 1981).
- Avaliar a ação das substâncias com atividade tripanocida potente quando comparadas ao benzonidazol em diferentes tempos – 2, 6, 24, 48 e 72 horas – de tratamento.
- Observar os parasitos submetidos à ação das substâncias ativas quanto à morfologia, por microscopia de contraste de fase.
- Avaliar a atividade tripanocida de extratos, frações e substâncias puras de *Pterogyne nitens* em ação sinérgica com benzonidazol nas cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*;
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias com forte atividade tripanocida em sinergismo com benzonidazol em macrófagos de camundongos isogênicos não-infectados, *C57/Black* e *Balb/c*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Meios, soluções e reagentes

- **Para cultivo de *Trypanosoma cruzi***

- Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) - (FERNANDES e CASTELLANI, 1966)

68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0,3% *Liver Infusion Broth*; 0,5% *Tryptose*. Água q.s.p. 900 mL. O pH foi ajustado para 7,2 e a solução filtrada em papel de filtro e autoclavada. Após resfriada, adicionou-se 10% da concentração final de soro fetal bovino estéril e inativado e 1% de solução de 25 mg/mL de *Haemin*, também estéril.

- **Para método colorimétrico (MTT)**

- Solução MTT/PMS

2,5 mg/mL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio] e 0,22 mg/mL de PMS (*Phenazine Methosulfate*) em água mili-Q.

- Solução 10% Dodecilsulfato de sódio (SDS) – 0,01 N HCl

- **Para avaliação da citotoxicidade em macrófagos**

- Solução de Tioglicolato de Sódio 3%

- Tampão Fosfato Estéril (PBS) 10X

80g NaCl; 2g KCl; 11,5g Na₂HPO₄; 2g KH₂PO₄; Água destilada q.s.p. 1L; pH 7,2.

- Meio RPMI – 1640 Completo

10,4 g de RPMI (um envelope) em 1L de Água Mili-Q; 2,38 g de HEPES 10 mM; 2 g de Bicarbonato de Sódio; pH 7,0 – 7,2.

Filtrar em membrana 0,2 µm e estocar a 4°C.

No momento do uso, para cada litro de meio RPMI, adicionar 1,0 mL dos seguintes constituintes:

- Penicilina 100 U/mL
- Estreptomicina 100 µg/mL
- β-mercaptoetanol 5×10^{-2} M
- concentração final de 5% de Soro Fetal Bovino.

- Isopropanol PA

- **Extratos brutos, frações e substâncias puras**

Três extratos, doze frações e doze substâncias isoladas das folhas, caules e flores de *P. nitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae), testados pelo método colorimétrico do MTT (Tabela 1), foram fornecidas pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara pelos pesquisadores Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani e Dr. Luis Octávio Regasini. Os procedimentos adotados para a obtenção do material químico encontram-se descritos na literatura (REGASINI et al., 2007, 2008a, 2008b, 2008c, 2009; FERNANDES et al., 2008).

Tabela 1: Extratos, frações e substâncias puras testados em cepas Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

Substâncias			
Partes da Planta			
Flores	Folhas	Caule	Comuns às partes
Extrato hexânico	Extrato hexânico	Extrato hexânico	Galegina
Fração acetato de etila	Fração acetato de etila	Fração acetato de etila	Nitensidina A
Fração n-butanólica	Fração n-butanólica	Fração n-butanólica	Nitensidina D
Fração hidroalcoólica	Fração hidroalcoólica	Fração hidroalcoólica	Nitensidina E
Fração alcaloídica	Fração alcaloídica	Fração alcaloídica	Pteroginina
Ácido cafeico	Ácido cinâmico		
Ácido clorogênico	Nitensosídeo B		
Ácido ferúlico			
Ácido sinápico			

- **Extratos brutos, frações e substâncias puras, avaliados quanto ao sinergismo com benzonidazol**

Os três extratos hexânicos, doze frações e doze substâncias apresentados na Tabela 1 foram testados para avaliação de sinergismo com benzonidazol pelo método colorimétrico do MTT. Para tanto, utilizou-se a relação de 1:1 (massa/massa) para extratos e frações, enquanto para as substâncias puras a relação foi equimolar.

3.2 Métodos

- **Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida para se realizar este experimento por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

Os parasitos (cepas Y e Bolívia) foram cultivados em meio LIT com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório.

- **Método colorimétrico utilizando MTT para a análise de atividade tripanocida**

O teste colorimétrico do MTT utilizado neste projeto foi padronizado por COTINGUIBA et al. (2009) com formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y).

Após diluições em Dimetilsulfóxido (DMSO), 3 µL de cada substância testada (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL), foram adicionados a 95 µL de meio LIT contendo $1,0 \times 10^7$ parasitos/mL na forma epimastigotas de *T. cruzi*. Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis em fluxo laminar. A placa foi incubada em câmara úmida por 72 horas.

Então, adicionou-se 10 µL de solução MTT/PMS em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo de luz por 75 minutos a 28°C. Neste momento, ocorre a redução do sal tetrazólio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, formazana, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta et al., 2005).

Adicionou-se 100 µL da solução 10% SDS/ 0,01N HCl, para dissolver os cristais de formazana, incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação 3.2.1 (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

$$\%C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

(3.2.1)

Onde G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controle e G_p , o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações da substância. A_c corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência da substância) sem parasito; A_p , o valor da absorbância nos testes e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações da substância na ausência do parasito.

Foram realizados dois controles em triplicatas, um sem parasitos na presença da substância e outro na ausência desta e contendo parasitos.

- **Determinação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo**

As amostras com potente atividade tripanocida foram avaliadas quanto sua citotoxicidade em macrófagos murinos.

Camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Três dias após, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e após a exposição do peritônio, abrindo-se a pele do animal, injetou-se 5,0 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,2), realizando-se leve massagem manual. As células foram coletadas do peritônio e transferidas para tubo estéril, mantidos em banho de gelo. Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se três vezes a 200 rpm durante 5 minutos à temperatura de $4^\circ C$ em tampão fosfato para lavagem das células. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 completo.

O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer utilizando corante vital líquido Lázarus, sendo ajustado à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI – 1640 completo para os testes. Dessa suspensão, foram adicionados 100 μL em cada poço da placa (96 poços) de poliestireno estéril. Em seguida, adicionou-se, em triplicata, 100 μL de cada uma das substâncias diluída em meio de cultura RPMI completo

(concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, respectivamente). Como controle foi utilizado o mesmo volume de RPMI completo com a mesma concentração de células, no entanto, em ausência da substância testada.

A incubação da placa foi feita durante 24 horas (37°C, 7,5% de CO₂). Após esse período, 100 µL de uma solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) diluído em meio RPMI na proporção 1:1 foram adicionados em cada poço, incubando-se por 3 horas (37°C, 7,5% de CO₂). Após a incubação, retirou-se 100 µL do sobrenadante adicionando-se 100 µL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm (Leitor de ELISA – BioRad).

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com o parecer nº 25/2008.

- **Cálculo de concentração inibitória (CI₅₀)**

A CI₅₀, concentração da substância que reduz em 50% a viabilidade celular dos parasitos ou dos macrófagos, foi determinada graficamente a partir de uma curva dose-resposta (concentração x viabilidade celular), obtida através de análise de regressão linear com limite de confiança próximo a 95% e a CI₅₀ definida através de equação da reta gerada (Software Origin 7.0).

- **Cálculo do *Safety Index* (Si)**

Baseado nos resultados de CI₅₀ dos macrófagos e dos parasitos, a relação CI₅₀ macrófagos/CI₅₀ parasitos foi calculada para cada uma das substâncias. Essa relação é conhecida como *Safety index* (índice de segurança) (LARGERON et al., 1999). Índices de segurança acima de

10 sugerem que a substância seja menos tóxica para as células de mamíferos do que para os parasitos.

- **Modificações morfológicas dos parasitos**

Modificações morfológicas dos parasitos das cepas Y e Bolívia foram analisadas após incubação em diferentes tempos com as substâncias que apresentaram atividades mais promissoras e comparadas com os respectivos controles (sem substância). A concentração das substâncias testadas foi equivalente ao CI_{50} de cada uma delas, em um volume final de 2,0 mL de meio e número de parasitos na ordem de $1,0 \times 10^7$ parasitos/mL.

Os tubos foram incubados na estufa BOD ($28^{\circ}C$) e as lâminas convenientemente preparadas analisadas por microscopia de contraste de fase em microscópio Leica - Leitz DMRXE em tempos previamente determinados (2, 6, 24, 48 e 72 horas). Essas análises foram realizadas em colaboração com a equipe do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas – FCF - UNESP - Campus Araraquara, SP.

- **Cálculo do sinergismo (ΣFIC)**

O sinergismo das amostras com benzonidazol foi avaliado pelo cálculo do índice de CI_{50} fracional (ΣFIC) como segue:

$$\Sigma FIC = \frac{(CI_{50} \text{ de A + B})}{(CI_{50} \text{ de A})} + \frac{(CI_{50} \text{ de A + B})}{(CI_{50} \text{ de B})}$$

(3.2.2)

onde A se refere aos extratos, frações ou substâncias de *P. nitens*, e B, ao benzonidazol. A unidade dos valores de CI_{50} foi $\mu\text{g/mL}$. Um efeito sinérgico é sugerido se o índice FIC for menor do que 0,5 (nível de significância) (ORHAN et al., 2005; HELLMANN et al., 2010).

4. Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação do potencial tripanocida de extratos, frações e substâncias puras de *P. nitens* em cepas Y e BOL de *T. cruzi* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes amostras de *Pterogyne nitens* testadas em cepas Y e Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

Amostras testadas	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Cepa Y	Cepa Bolívia
Flores		
Extrato hexânico	IS	IS
Fração acetato de etila	65,28	> 100
Fração alcaloídica	2,20	2,17
Fração n-butanólica	> 100	> 100
Fração hidroalcoólica	> 100	> 100
Ácido cafeico	6,41	44,33
Ácido clorogênico	> 100	100
Ácido ferúlico	> 100	> 100
Ácido sinápico	54,02	47,22
Folhas		
Extrato hexânico	72,96	> 100
Fração acetato de etila	> 100	> 100
Fração alcaloídica	10,40	4,88
Fração n-butanólica	71,90	67,31
Fração hidroalcoólica	> 100	> 100
Ácido cinâmico	> 100	> 100
Nitensosídeo B	> 100	> 100
Caule		
Extrato hexânico	22,52	78,63
Fração acetato de etila	43,83	44,62
Fração n-butanólica	47,07	100

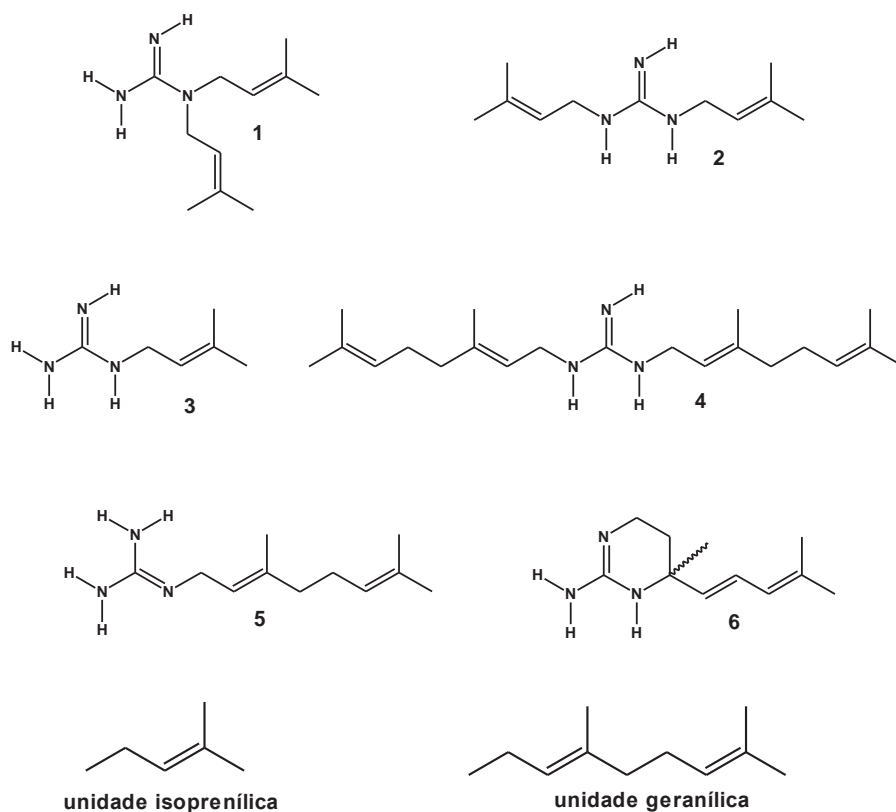
Fração hidroalcoólica	> 100	> 100
Fração alcaloídica	3,42	3,32
Comuns às partes		
Galegina	> 100	> 100
Nitensidina A	3,32	3,52
Nitensidina D	3,03	2,95
Nitensidina E	2,41	3,00
Pteroginina	70,36	65,13
Benzonidazol	9,01	25,00

IS – insolúvel em DMSO

As substâncias que não mostraram atividade suficiente para determinação de sua CI_{50} entre as concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ tiveram sua concentração inibitória representada como >100 (maior que 100 $\mu\text{g/mL}$). Para extrato hexânico obtido de flores, não foi possível a obtenção de sua CI_{50} , uma vez que a substância não foi solúvel em DMSO, sendo então apresentada como IS (insolúvel).

Dentre os extratos e frações analisados, as frações alcaloídicas de *P. nitens* mostraram potência elevada contra as duas cepas do parasito, apresentando valores de CI_{50} similares ou menores que o de benzonidazol, como mostrado na Tabela 2. Esses dados indicam que os alcalóides guanidínicos podem ser os responsáveis pela atividade tripanocida dos extratos brutos. Seis alcalóides guanidino-terpênicos foram testados com o intuito de confirmar a presente proposição, sendo eles, pteroginina, galegina e nitensidinas A, D e E, moléculas representadas como 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente na Figura 3.

Figura 3: Alcalóides guanidínicos de *Pterogyne nitens*.



Ao se comparar os valores de CI_{50} obtidos para estes alcalóides supõe-se uma correlação entre o número de unidades isoprênicas (ou prenílicas) e a potência tripanocida. Os alcalóides substituídos por uma (nitensidinas D e E) ou duas unidades geranílicas (nitensidina A) mostraram maior potência que aqueles substituídos por uma (galegina) ou duas unidades isoprenílicas (pteroginina). Este fato foi confirmado pelos valores de CI_{50} das nitensidinas A, D e E, as quais demonstraram valores próximos a $3,00 \mu\text{g/mL}$, cerca de três vezes mais potentes que benzonidazol contra as cepas Y e oito vezes mais potentes contra a cepa BOL. Por outro lado, galegina e pteroginina mostraram-se moderada ou fracamente ativas contra a cepa Y.

Dentre as frações, principalmente as hidroalcoólicas provenientes de todas as partes da planta, mostraram-se fracamente ativas contra o *T. cruzi*, mesmo na concentração máxima testada, sendo sua CI_{50} apresentada como maior que 100 na tabela acima, o que demonstra

que as substâncias mais polares de *P. nitens*, presentes nesta fração, são fracamente ativas contra os parasitos. Isso se deve ao fato de que substâncias mais lipofílicas (apolares) é que atravessam a membrana do parasito e as frações hidroalcoólicas carregam consigo aquelas mais hidrofílicas (polares).

Os resultados obtidos (Tabela 2) mostraram que as substâncias responsáveis pela atividade dos extratos e frações de *P. nitens* estão correlacionadas à presença dos alcalóides guanidino-terpênicos, substituídos por unidades geranílicas.

A partir dos valores de CI_{50} das substâncias testadas quanto à atividade tripanocida, foram selecionadas as amostras mais ativas para análise de citotoxicidade em macrófagos de camundongos isogênicos *Balb/c* e *C57/Black* não-infectados utilizando-se o método colorimétrico da redução do MTT. Essas substâncias foram nitensidina A, nitensidina D e nitensidina E, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados da citotoxicidade (CI_{50} $\mu\text{g/mL}$) das substâncias testadas em macrófagos de camundongos *Balb/c* e *C57/Black*.

Substâncias	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Balb/c</i>	<i>C57/Black</i>
Nitensidina A	2,14	2,71
Nitensidina D	4,38	2,5
Nitensidina E	6,87	<1

Pode-se observar que esses alcalóides (nitensidinas A, D, E) se mostraram altamente citotóxicos para os macrófagos de ambas linhagens de camundongos isogênicos. São, portanto, moléculas não-seletivas, uma vez que se mostraram tóxicas tanto para *T. cruzi*, como para macrófagos murinos.

Os Si das substâncias de *P. nitens* foram calculados relativamente à atividade tripanocida. Índices com valores maiores que 10 sugerem que o uso da substância pode ser

considerado seguro e promissor para novos estudos. Os dados da Tabela 6 apresentam esses valores.

Tabela 4: Índices de segurança das substâncias estudadas.

Substâncias	Si (Safety index)			
	<i>Balb/c</i> x cepaY	<i>C57/Black</i> x cepa Y	<i>Balb/c</i> x cepa Bol	<i>C57/Black</i> x cepa Bol
Nitensidina A	0,64	0,82	0,61	0,77
Nitensidina D	1,45	0,83	1,48	0,85
Nitensidina E	2,27	0,41	2,29	0,33

As substâncias foram avaliadas nas cepas Y e BOL em diferentes tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Resultados da citotoxicidade (IC₅₀ µg/mL) das substâncias na cepa Y em diferentes tempos

Substâncias	CI ₅₀ (µg/mL)					
	Tempo	2h	6h	24h	48h	72h
nitensidina A		28,67	8,52	6,94	3,50	2,50
nitensidina D		<50	49,70	12,03	2,97	3,03
nitensidina E		62,36	15,32	4,67	3,61	2,41

Tabela 6: Resultados do teste de redução do MTT em diferentes tempos para cepa Bolívia

Substâncias	CI ₅₀ (µg/mL)					
	Tempo	2h	6h	24h	48h	72h
nitensidina A		32,56	13,87	4,41	2,45	1,79
nitensidina D		41,63	12,74	14,18	3,15	2,95
nitensidina E		48,47	20,89	13,19	4,73	3,00

Com exceção de nitensidina A (em ambas as cepas), os valores de CI₅₀ obtidos reproduziram os dados anteriores (Tabela 2). Em 48 horas, todas as substâncias mostraram atividade tripanocida mais alta que benzonidazol após 72 horas, em ambas as cepas.

Sinergismo é um tipo de resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais fármacos, cuja resultante é maior do que simples soma dos efeitos isolados de cada um deles. O sinergismo pode ocorrer com substâncias que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que agem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). Das associações sinérgicas podem surgir efeitos terapêuticos ou tóxicos (SECOLI, 2001).

A Tabela 7 apresenta os resultados de CI_{50} referentes aos testes de sinergismo sem (A) e com (A+B) benzonidazol com as cepas Y e BOL de *T. cruzi*.

Tabela 7: Avaliação do efeito sinérgico entre extratos, frações e substâncias obtidas de *Pterogyne nitens* com benzonidazol e formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y e BOL), onde IS = insolúvel em DMSO, ND = CI_{50} não determinada, A (sem benzonidazol), A+B (com benzonidazol), ΣFIC – índice de CI_{50} fracional

Partes da planta	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
	Cepa Y			Cepa BOL		
Flores	A	A+B	ΣFIC	A	A+B	ΣFIC
extrato hexânico	IS	IS	ND	IS	IS	ND
fração acetato de etila	65,28	46,02	5,81	>100	18,30	0,92
fração alcaloídica	2,20	<1	0,57	2,17	<1	<u>0,50*</u>
fração <i>n</i> -butanólica	>100	40,92	4,95	>100	25,00	1,25
fração hidroalcoólica	>100	27,49	3,33	>100	76,97	3,85
ácido cafeico	6,41	9,74	2,60	44,33	6,23	<u>0,39*</u>
ácido clorogênico	>100	3,78	<u>0,46*</u>	100	1,00	<u>0,05*</u>
ácido ferúlico	>100	40,59	4,91	>100	24,33	1,22
ácido sinápico	54,02	19,76	2,56	47,22	15,88	0,97
Folhas	A	A+B	ΣFIC	A	A+B	ΣFIC
extrato hexânico	72,96	IS	ND	>100	IS	ND
fração acetato de etila	>100	22,69	2,75	>100	42,74	2,14
fração alcaloídica	10,40	1,14	<u>0,24*</u>	4,88	<1	<u>0,24*</u>
fração <i>n</i> -butanólica	71,90	7,22	0,90	67,31	15,91	0,87
fração hidroalcoólica	>100	50,00	6,05	>100	6,84	<u>0,34*</u>
nitensosídeo B	>100	20,09	2,43	>100	13,97	0,70
ácido cinâmico	>100	28,01	3,39	>100	>100	ND
Caules	A	A+B	ΣFIC	A	A+B	ΣFIC
extrato hexânico	22,52	14,56	2,26	78,63	7,93	<u>0,42*</u>
fração acetato de etila	43,83	13,22	1,77	44,62	7,69	<u>0,48*</u>
fração <i>n</i> -butanólica	47,07	12,85	1,70	100	9,26	<u>0,46*</u>
fração hidroalcoólica	>100	57,44	6,95	>100	24,56	1,23
fração alcaloídica	3,42	1,14	<u>0,46*</u>	3,32	<1	<u>0,34*</u>
Comuns às partes	A	A+B	ΣFIC	A	A+B	ΣFIC
galegina	>100	28,70	3,47	>100	18,12	0,91
nitensidina A	3,32	<1	<u>0,41*</u>	3,52	<1	<u>0,32*</u>
nitensidina D	3,03	1,65	0,73	2,95	<1	<u>0,38*</u>
nitensidina E	2,41	2,39	1,26	3,00	2,24	0,84
benzonidazol	9,01	-	-	25,00	-	-

* valores que indicam sinergismo

Em relação à cepa Y, somente as frações alcalóidicas dos caules ($\Sigma\text{FIC} = 0,46$) e das folhas ($\Sigma\text{FIC} = 0,24$) apresentaram sinergismo, o que sugere que a mistura de alcalóides guanidínicos de *P. nitens* possa conter substâncias com ação sinérgica com o benzonidazol.

Em relação à cepa BOL, praticamente todas as frações e substâncias puras apresentaram sinergismo com benzonidazol. Isso parece sugerir que uma única substância pode não ser suficiente para a quimioterapia, considerando-se diferenças entre as cepas do parasito.

Considerando-se os sinergismos das substâncias em relação à cepa Y, observa-se sinergismo do alcalóide guanidínico: nitensidina A ($\Sigma\text{FIC} = 0,41$) com benzonidazol, o que confirma os dados da ação sinérgica das frações alcalóidicas. Tais resultados sugerem que nitensidina A foi responsável pelo efeito sinérgico dessas frações, uma vez que esta molécula, presente nas frações alcalóidicas apresentou maior atividade tripanocida em ação sinérgica com o benzonidazol. Além disso, o fenilpropanóide ácido clorogênico também apresentou atividade sinérgica com benzonidazol ($\Sigma\text{FIC} = 0,46$).

Relativamente à cepa BOL, tendo em vista o potencial sinérgico dos alcalóides guanidínicos e benzonidazol, nitensidina A, nitensidina D e pteroginina mostraram sinergismo. Interessante observar que, dentre as amostras testadas, um forte efeito sinérgico ocorreu com o fenilpropanóide ácido clorogênico ($\Sigma\text{FIC} = 0,05$) e ácido cafeico ($\Sigma\text{FIC} = 0,39$) com benzonidazol. Esses resultados confirmam as diferenças de sinergismos entre as cepas.

As substâncias puras, que apresentaram sinergismo com benzonidazol, estão mostradas na Figura 3, e foram avaliadas quanto à citotoxicidade em macrófagos murinos.

As substâncias em equimolaridade com benzonidazol também foram avaliadas quanto à citotoxicidade em macrófagos murinos. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de CI₅₀ das substâncias testadas em macrófagos de camundongos *Balb/c* e *C57/Black*

Substâncias	CI ₅₀ (µg/mL)	
	<i>Balb/c</i>	<i>C57/Black</i>
ácido clorogênico + benzonidazol	>100	>100
ácido cafeico +benzonidazol	>100	>100
nitensidina A +benzonidazol	<1	<1
nitensidina D +benzonidazol	<1	<1
pteroginina +benzonidazol	49,14	27,14

Observou-se que os fenilpropanóides, ácido clorogênico e ácido cafeico com benzonidazol, não alterava a viabilidade dos macrófagos. Para confirmar que a redução do MTT a formazana estava ocorrendo devido às células viáveis e não devido à substância, colocou-se MTT em meio RPMI em contato com essas substâncias, na ausência de células. Verificou-se que, mesmo na ausência de células, MTT estava sendo reduzido a formazana, conferindo coloração arroxeadada àquela solução, o que no teste de MTT é interpretado como presença de células viáveis. Entretanto esta reação ocorreu apenas com o meio de cultura RPMI utilizado em testes com macrófagos e não com meio LIT para as cepas de *T. cruzi*.

Estes testes poderão ser realizados futuramente utilizando contagem de células por azul de Trypan.

Para as outras substâncias, calculou-se o *Safety Index* (S) relativamente ao efeito sinérgico como apresentado na Tabela 9. Os resultados sugerem que, apesar do sinergismo com benzonidazol, nenhuma das substâncias testadas mostrou-se segura. Estudos futuros poderiam ser realizados para avaliar o sinergismo entre as substâncias.

Tabela 9: Índices de segurança (*safety index*) das substâncias estudadas.

Substâncias (+benzonidazol)	Si (<i>Safety index</i>)			
	<i>Balb/c</i> / cepa Y	<i>C57/Black</i> / cepa Y	<i>Balb/c</i> / cepa BOL	<i>C57/Black</i> / cepa BOL
nitensidina A	<1	<1	<1	<1
nitensidina D	<1	<1	<1	<1
pteroginina	5,10	2,82	9,83	5,43

As substâncias mostraram diferentes atividades conforme a cepa de *T. cruzi*.

No início do trabalho, havia uma grande expectativa de que as estruturas alcaloídicas pudessem se tornar substâncias tripanocidas promissoras, uma vez que três (nitensidina A, D, E) dos seis alcalóides testados apresentaram-se fortemente ativos para ambas as cepas de *T. cruzi*. Porém, a citotoxicidade em macrófagos murinos também foi elevada, com índices de segurança (Si) muito menores do que 10. Embora esses resultados não sejam promissores para a busca de novos candidatos a agentes tripanocidas, conhecer seu mecanismo de ação em *T. cruzi* poderá gerar informações interessantes para sugerir modificações estruturais dessas moléculas.

A seguir são apresentados os resultados das observações sobre as alterações morfológicas produzidas pelas substâncias puras nas duas cepas de *T. cruzi* (Figuras 4 a 15). As imagens foram obtidas por microscopia de contraste de fase.

- Cepa Y

Nitensidina A em cepa Y de *T. cruzi*

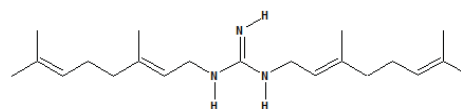
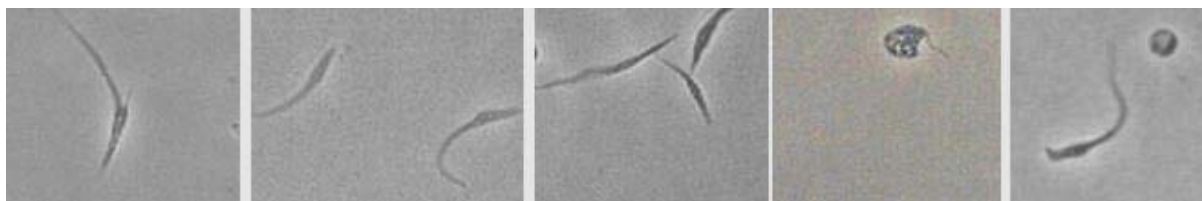


Figura 4: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina A. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Após duas horas de contato dos parasitos com Nitensidina A, estes se apresentaram totalmente imóveis, o que permaneceu até 72 horas. Essa observação parece indicar a morte dos parasitos após duas de contato com a substância.

Nitensidina D em cepa Y de *T. cruzi*

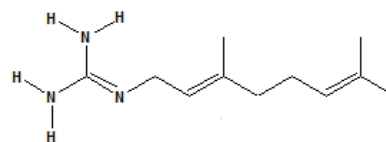


Figura 5: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina D. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Quanto à morfologia dos parasitos, pôde-se observar que os mesmos na presença de Nitensidina D tiveram seu aspecto morfológico bastante modificado. A partir de 24 horas em contato com a substância, os parasitos começaram a se apresentar em formas mais arredondadas. Não se pode, no entanto, fazer nenhuma afirmação sobre o que isso possa significar. Observou-se que, com o passar do tempo, a motilidade dos parasitos foi reduzida, no entanto, permaneceu presente. É interessante considerar a possibilidade de estudos com imunofluorescência, para que se possa observar em que parte do parasito a substância estaria agindo.

Nitensidina E em cepa Y de *T. cruzi*

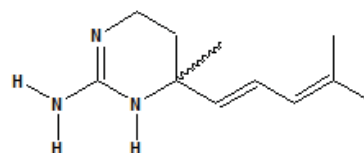
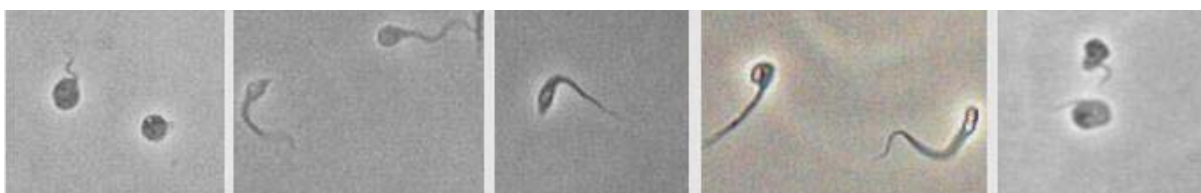


Figura 6: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com nitensidina E. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Não houve forte mudança morfológica dos parasitos em presença de Nitensidina E. O que se pôde observar é que após algum tempo, dentro de muitos dos

parasitos apareceram grandes vacúolos. Quanto à motilidade dos protozoários, não foi observada alteração.

Ácido cafeico em cepa Y de *T. cruzi*

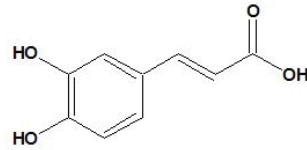
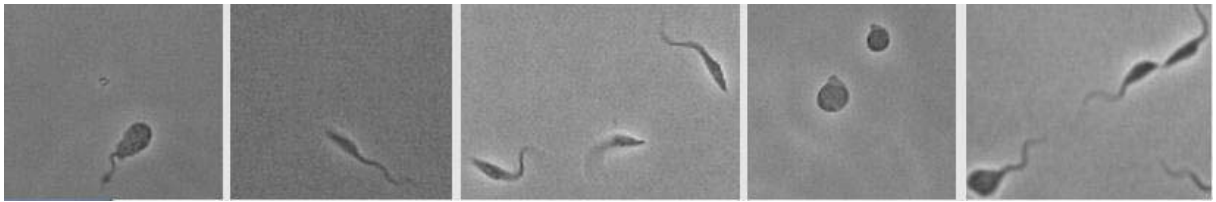


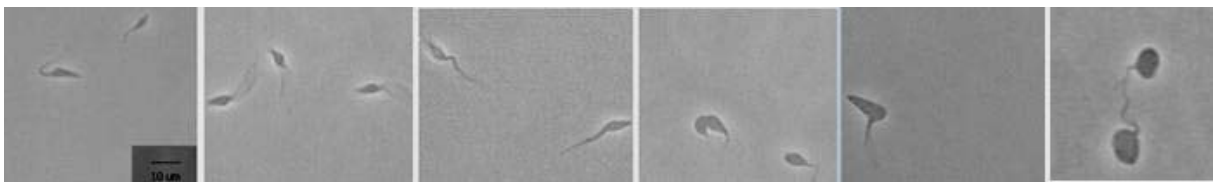
Figura 7: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em contato com ácido cafeico. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Desde a primeira fotografia, após 2 horas de contato dos parasitos com ácido cafeico, já se pôde observar alterações na morfologia da maioria dos protozoários. Os parasitos preservaram sua motilidade. Sua forma tornou-se mais ovalada.

Controles da cepa Y de *T. cruzi*

Figura 8: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle. Tempos: zero, 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



- Cepa BOL

Nitensidina A em cepa BOL de *T. cruzi*

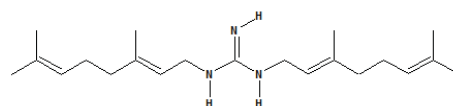
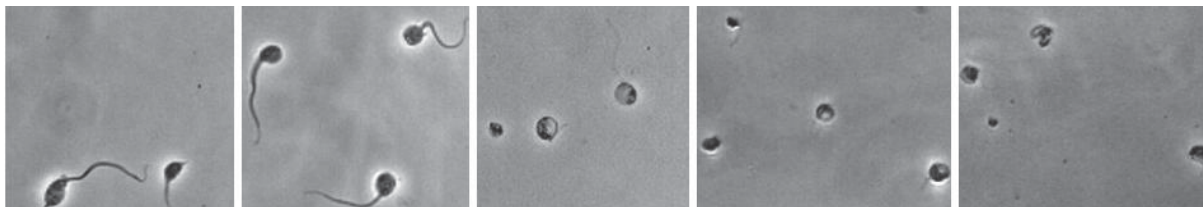


Figura 9: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi* em contato com nitensidina A. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Logo de início a morfologia dos parasitos mostrou-se alterada. O tamanho das células diminuiu ao longo do experimento e surgiram grandes vacúolos no interior das mesmas. Após 72 horas, o flagelo não se apresentava livre e os parasitos estavam todos imóveis, o que sugere morte celular.

Nitensidina D em cepa BOL de *T. cruzi*

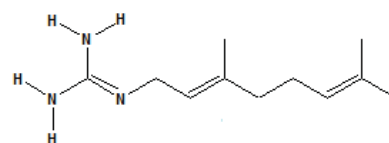
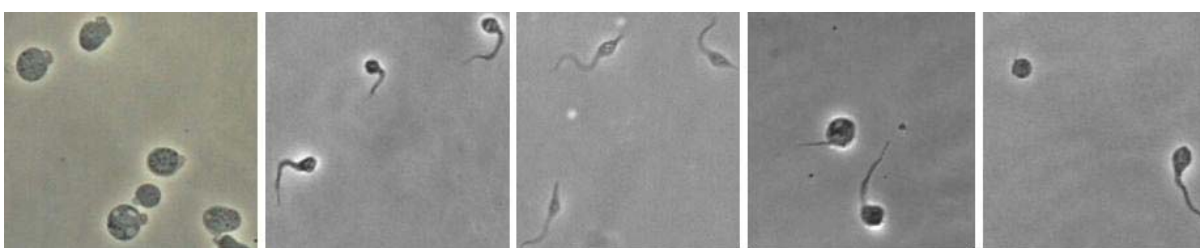


Figura 10: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi* em contato com nitensidina D. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Ao longo do experimento pôde-se observar alternância na morfologia dos parasitos. Ora se apresentavam todos esféricos, ora com sua morfologia levemente arredondada. A motilidade permaneceu até o fim do experimento. Pôde-se observar considerável redução do número de células até que se completassem 72 horas.

Nitensidina E em cepa BOL de *T. cruzi*

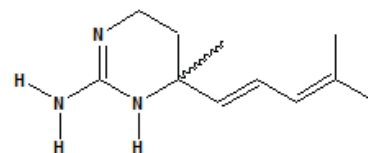


Figura 11: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi* em contato com nitensidina E. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: Após duas horas em contato com Nitensidina E, grandes vacúolos apareceram no citoplasma do parasito, e os mesmos estavam maiores e arredondados. Ao longo do experimento a morfologia não estava alterada, mas as células ainda se apresentavam maiores do que o normal, e arredondadas. Os parasitos se mostraram móveis até o fim do experimento.

Ácido cafeico em cepa BOL de *T. cruzi*

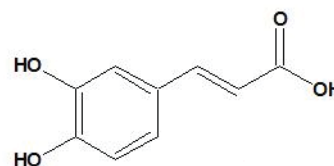
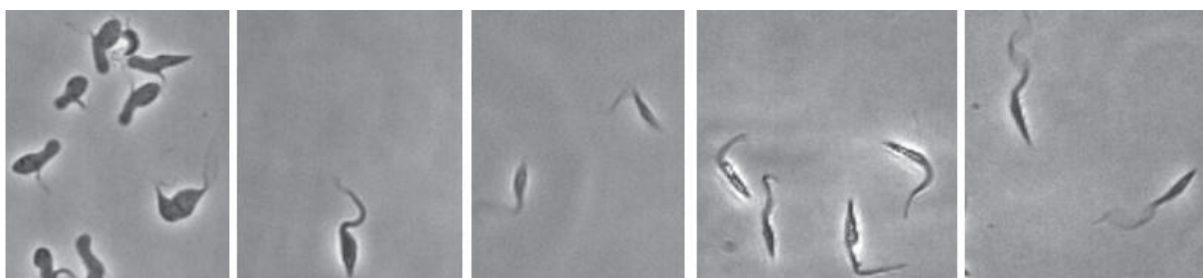


Figura 12: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi* em contato com ácido cafeico. Tempos: 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



Observações: A morfologia dos parasitos da cepa BOL foi alterada inicialmente. A maioria dos parasitos fotografados após duas horas de contato com ácido cafeico, apresentou-se arredondada, com aspecto inchado. No entanto, ao decorrer do experimento, a morfologia foi

voltando ao normal, ou seja, como a do controle. Isso não pôde ser observado para cepa Y, onde o arredondamento das células se manteve até o fim do experimento.

Controles da cepa BOL de *T. cruzi*

Figura 13: Fotomicrografia das formas epimastigotas da cepa BOL de *T. cruzi*. Controle. Tempos: zero, 2, 6, 24, 48 e 72 horas da esquerda para a direita. Aumento de 400 vezes com zoom de 100%.



5. Conclusões

O teste colorimétrico utilizando MTT foi eficiente para a análise da atividade tripanocida (cepas Y e Bolívia) dos extratos, frações e substâncias isoladas de *P. nitens* testados.

O derivado fenilpropanóide, ácido cafeico, apresentou uma atividade tripanocida mais potente para a cepa Y de *T. cruzi*, mostrando baixa citotoxicidade em macrófagos. No entanto, com o desenvolvimento do trabalho, evidenciou-se que em meio de cultura RPMI – utilizado para os testes com macrófagos murinos – ocorria redução do sal tetrazólio MTT a produto colorido formazana mesmo na ausência de células, o que foi interpretado como resultado falso-positivo.

Os valores de CI_{50} para os fenilpropanóides testados em sinergismo com benzonidazol em macrófagos murinos através do método de redução do MTT não representam realmente a concentração na qual 50% das células estão inviáveis, uma vez que ambas as substâncias, assim como ácido cafeico isoladamente, reduzem MTT em meio RPMI a formazana, indicando viabilidade mesmo onde não há células viáveis.

Pteroginina foi a única substância que em sinergismo com benzonidazol aproximou-se do valor mínimo indicado do *Safety index* ($Si = 10$).

Houve aumento da atividade tripanocida das substâncias nitensidina A, nitensidina D e nitensidina E, nos diferentes tempos de exposição dos parasitos às mesmas. Os resultados foram confirmados pelas alterações morfológicas provocadas nos parasitos, observadas através de microscopia de contraste de fase.

A avaliação morfológica por microscopia de contraste de fase foi interessante para observar o aumento de vacúolos nos parasitos, assim como a ausência de motilidade destes frente às diferentes substâncias testadas.

Ter realizado o Trabalho de Conclusão de Curso no Laboratório de Imunologia da Profª Drª Regina Maria Barretto Cicarelli foi uma grande experiência para a aluna, que pôde desenvolver habilidades na área de pesquisa em um laboratório com diversas facilidades, principalmente em relação a equipamentos e materiais, os quais eram modernos e abundantes.

6. Referências Bibliográficas

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGULAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 1188-1191, 2002.

BELLINI, M. F.; SILISTINO-SOUZA, R.; VARELLA-GARCIA, M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; SILVA, A. E. Review Article: Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. **J. Trop. Med.** Vol 2012, Article ID 357948, doi:10.1155/2012/357948, 2011.

BERG, K.; ZHAI L.; CHEN, M.; KHARAZMI, A.; OWEN, T. C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v.80, n. 3, p. 235-239, 1994.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In JR Cançado, **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imp. Of. de Minas Gerais, p. 510-516, 1968.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n.2, p. 179- 189, 2000.

CARNEIRO, M. História da doença de Chagas. **Curitiba**: [s.n.], p. 91, 1963.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Piracicaba: Colombo: Embrapa, 1994.

CASTRO, J. A.; DIAS, E. G. T. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed. Environmental**, v. 1, p. 19-33, 1988.

CEDILLO-RIVERA, R.; RAMIREZ, A.; MUÑOZ, O. A rapid colorimetric assay with tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. **Arch. Med. Res.**, v. 23, n. 2, p. 59-61, 1992.

CORREIO BRAZILIENSE. SASSINE, V. Potadores da Doença de Chagas sofrem com a carência de medicamentos. Data do artigo: 06 de fevereiro de 2012. Artigo acessado pela internet. http://www.correio braziliense.com.br/app/noticia/brasil/2012/02/06/interna_brasil,288902/por-tadores-da-doenca-de-chagas-sofrem-com-a-carencia-de-medicamentos.shtml. Acessado em 20 de agosto de 2012.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; DEBONSI, H.M.; PASSERINI, G.D.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med Chem Res.**, V. 18 p. 703–711, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002. Suplemento 1.

CRIVOS, M. et al. Pathways as signature in landscape: towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guaraní (Northeastern Argentina). **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.2, p. 1 – 12, 2007.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

ELLIS, J. A.; FISH, W. R.; SILEGHEM, M.; MCODEMBA, F. A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. **Vet. Parasitol.**, v. 50, n. 1-2, p. 143-149, 1993.

FERNANDES, J. F. & CASTELLANI O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FERNANDES, DC; REGASINI, L. O.; VELLOSA, JCR; PAULETTI, PM; CASTROGAMBOA, I; BOLZANI, VS; OLIVEIRA, OMM; SILVA, DHS. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 56, p. 723–726, 2008.

FERREIRA, E.R.; BONFIM-MELO, A.; MORTARA, R.A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. **Frontiers in Immunology**. doi: 10.3389/fimmu.2012.00363, 2012.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 8, p. 75-81, 1974.

HARBORNE, J.B. Role of secondary metabolites in chemical defense mechanisms in plants. **Ciba Found Symp.** V.154 p. 126–134, 1990.

HEGYESI H.; CSABA, G. Time and concentration dependence of the growthpromoting activity of insulin and histamine in Tetrahymena. Application of the MTT method for the determination of cell proliferation in a protozoan model. **Cell Biol. Int.**, v. 21, n. 5, p. 289-293, 1997.

HELLMANN, J. K.; MÜNTER, S.; WINK, M.; FRISCHKNECHT, F. Synergistic and additive effects of epigallocatechin gallate and digitonin on *Plasmodium* sporozoite survival and motility. **PLoS ONE** 5(1): e8682. doi:10.1371/journal.pone.0008682, 2010.

HOTEZ, P.J. Neglected infections of poverty in the United States of America. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2: e256. 2008.

IGWEH, A. C.; AGUIYI, J. C.; OKWUASABA, F. K. Antitrypanosomal effects of the aqueous extract of *Bassica oleracea*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 17-21, 2002.

LANA, M. & TAFURI, W. L. Em NEVES D. P. **Parasitologia Humana**, 10. ed. São Paulo: Atheneu, p. 73-96. 2000.

LARGERON, M.; LOCKHART, B.; PFEIFFER, B.; FLEURY, M. B. Synthesis and in vitro evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 5043-5052, 1999.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, 1998.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MAYA, J. D.; REPETT, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J. M.; TLLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of nifurtimox and benzonidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 86, p. 101-106, 1997.

MEY, A.; CHAVES, G.C.; RIBEIRO, I.; MECHALI, D.; ABDALLA, M.; ABI-SAAB, M.; MORAIS, F.; DANTAS, D. Guia de compras do LAFEPE Benzonidazol. Uma contribuição para o acesso sustentável. 2ª ed. Rio de Janeiro, Junho de 2012.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plants extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 101-107, 2000.

ORHAN, G.; BAYRAM, A., ZER, Y., BALCI, I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43: p.140–143, 2005.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Curr. Infect. Dis. Rep.**; DOI 10.1007/s11908-012-0259-3, 2012.

PONCE-MACOTELA, M.; NAVARRO-ALEGRÍA, I.; MARTINEZ-GORDILLO, M. N.; ÁLVAREZ-CHACÓN, R. Efecto anti-giardíaco in vitro de 14 extractos de plantas. **Ver. Invest. Clin.**, v. 46, p. 343-347, 1994.

REGASINI, LO; LOPES, AA; SILVA, DHS; FURLAN, M; YOUNG, MCM; MARIA, DA; BARREIRO, EJ; BOLZANI, VS. Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, p. 335–340, 2007.

REGASINI, LO; FERNANDES, DC; CASTRO-GAMBOA, I; SILVA, DHS; FURLAN, M; BOLZANI, VS; BARREIRO, EJ; CARDOSO-LOPES, EM; YOUNG, MCM; TORRES, LB; VELLOSA, JCR; OLIVEIRA, OMM. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quim. Nova** v.31, p. 802–806, 2008 a.

REGASINI, LO; VELLOSA, JCR; SILVA, DHS; FURLAN, M; OLIVEIRA, OMM; KHALIL, NM; BRUNETTI, IL; YOUNG, MCM; BARREIRO, EJ; BOLZANI, VS. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**. v. 69, p. 1739–1744, 2008 b.

REGASINI, LO; OLIVEIRA, CM; VELLOSA, JCR; OLIVEIRA, OMMF; SILVA, DHS; BOLZANI, VS. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). **Afr. J. Biotechnol.** v. 7, p. 4609–4613, 2008 c.

REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S; CASTRO-GAMBOA, I; FURLAN, M; BARREIRO, E. J; FERREIRA, P. M. P; PESSOA, C; COSTA-LOTUFO, L. V; MORAES, M. O; YOUNG, M. C. M; BOLZANI, V. S. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.** 72, 2009.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIERA, C.; GUARRO, A.; KASSAB, H.E.; JORBA, J.M.; CASTRO, M.; ANGRILL, R.; GÁLLEGO, M.; FISA, R.; MARTIN, C.; LOBATO, A.; PORTÚS, M. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V. 75, p.1078 – 1081, 2006.

SCHÄFER, H., WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnol. J.** 4: p.1684–1703, 2009.

SCHUMUÑIS, G. A. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 1-5. 2000.

SECOLI, S.R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Rev. Esc. Enf. USP**, v.35, n. 1, p. 28-34, 2001.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stages of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 401-403, 1997.

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 cultures in vitro for assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, V. 20, p. 191-208, 1953.

VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J. O.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1005-1011, 2001.

WANG, C. C. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 93-127, 1995.

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; GALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WHO – World Health Organisation. Report Del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas (Acesso em Dezembro de 2012). Disponível em: www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas. 2007.

WINK, M. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. In: Kayser O, Quax W, eds. Medicinal Plant Biotechnology. **Wiley- VCH**. p. 97–116, 2007.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. **Curr. Drug. Med.** 9: p. 996–1009, 2008.

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J.. Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infect. Immun.**, v. 36, nº2, p. 637-644, 1981.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. M.; LISBOA, C. V.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Inst. J. Parasitol.**, v. 28, n. 1, p. 105-120, 1998.