

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**“Avaliação do potencial tripanocida de
substâncias extraídas da Família
Piperaceae em formas epimastigotas de
Trypanosoma cruzi”**

Gabriela Duó Passerini

ARARAQUARA

2008

Gabriela Duó Passerini

**“Avaliação do potencial tripanocida de substâncias
extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas
de *Trypanosoma cruzi*”**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

ARARAQUARA

2008

Gabriela Duó Passerini

**“Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da
Família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*”**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia**

Araraquara, 15 de agosto de 2.008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

Profa. Dra. Márcia Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

Prof. Dr. Sergio de Albuquerque
Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto.

DADOS CURRICULARES

Nome: Gabriela Duó Passerini

Nome em citações bibliográficas: PASSERINI, G.D.

Sexo: Feminino

Filiação: Reinaldo de Jesus Passerini e Regina Aparecida Duó Passerini

Nascimento: 25/10/1982 – Araraquara – SP, Brasil.

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Departamento de Ciências Biológicas
Rodovia Araraquara - Jaú Km 01 - 14800-902, SP - Brasil
Laboratório de Imunologia
Telefone: (16) 33016950
URL da home page: <http://www.fcfar.unesp.br>

Formação Acadêmica:

2002 – 2005: Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Rio Claro/SP, UNESP, Brasil.

Título: “Avaliação da atividade de substâncias extraídas de plantas de formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*”.

Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli

2006 – 2008: Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: “Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*”.

Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli.

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Atuação Profissional:

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Rio Claro/SP

02/2003 - 05/2004 - Estágio: “Aprendizado em Técnicas de Biologia Molecular” nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), sob a orientação do Prof. Dr. Maurício Bacci.

04/2003 - 02/2006 - Bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET/SESu)

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Araraquara/SP

07/2004 - 12/2004 - Estágio de Treinamento na disciplina de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas

05/2005 - 03/2006 - Iniciação Científica com o título “Avaliação da ação de substâncias extraídas de plantas em formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*”

04/2006 - 07/2006 - Aperfeiçoamento Científico na disciplina de Imunologia com o título: “Padronização de um método colorimétrico para avaliação da atividade de substâncias extraídas de plantas em *Trypanosoma cruzi*”

03/2008 – 10/2009 - Participação em projetos: “Avaliação da atividade de substâncias

extraídas de plantas em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*” – FAPESP.

Produção Bibliográfica:

Artigos completos publicados em periódicos:

- 1- BOSETTO, M. C., MORTARA, R. A., AMBRÓSIO, D. L., PASSERINI, G. D., SILVA, M. T. A., OKUDA, E., CICARELLI, R. M. B.

Detection and Localization of Small Nuclear Ribonucleoproteins (snRNPs) in trypanosomatids by using anti-m3G antibodies. Japanese Journal of Infectious Diseases., v.61, p.95 - 99, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos:

- 1- PASSERINI, G. D., SIQUEIRA, M. C., MONNAZZI, L. G. S., MALLAVOLTA, V. A. A., MOTA, J. S., FELIPPE, L. G., SILVA, F. C., FURLAN, M., MEDEIROS, B. M. M., CICARELLI, R. M. B.

“Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae”. IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 2008, Araraquara.

- 2- SILVA, F. C., REGASINI, L. O., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., CICARELLI, R. M. B., PASSERINI, G. D., GIANINNI, M. J. S. M., FURLAN, M.

“Estudo químico e biológico de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae)”. VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota / FAPESP, 2008, Araraquara.

- 3- SILVA, F. C., REGASINI, L. O., DEBONSI, H. M., AMBRÓSIO, D. L., PASSERINI, G. D., CICARELLI, R. M. B., BOLZANI, V. S., KATO, M. J., FURLAN, M.

“Potencial tripanocida de amidas e derivados semi-sintéticos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae)”. 30ª Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia.

- 4- MOTA, J. S., BATISTA JR, J. M., LOPES, A. A., AMBROSIO, D. L., PASSERINI, G. D., CICARELLI, R. M. B., BOLZANI, V. S., KATO, M. J., FURLAN, M.

“Avaliação do potencial anti-chagásico *in vitro* e *in vivo* de cromenos de espécies de Piperaceae”. 30ª Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia.

- 5- SILVA, F. C., REGASINI, L. O., PASSERINI, G. D., AMBRÓSIO, D. L., NAVICKIENE, H. M. D., BOLZANI, V. S., CICARELLI, R. M. B., KATO, M. J., FURLAN, M.

“Potencial anti-chagásico de amidas naturais e derivados semi-sintéticos de *Piper tuberculatum* (Piperaceae)” 30ª Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia.

- 6- CESAR, F. S., MOTA, J. S., SILVA, F. C., FELIPPE, L. G., AMBROSIO, D. L., PASSERINI, G. D., CICARELLI, R. M. B., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., FURLAN, M.

“Potencial tripanocida e antifúngico dos extratos de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”. I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007, Araraquara.

- 7- PASSERINI, G. D., AMBRÓSIO, D. L., ROSA, J. A., LOPES, A. A., BATISTA JR, J. M., MOTA, J. S., FURLAN, M., CICARELLI, R. M. B.

“Atividade tripanocida de extrato bruto de espécies de *Piper* utilizando método

colorimétrico e microscopia”. I Simpósio Interação Parasito-Hospedeiro - Modelo de Estudo, 2007, Araraquara.

8- PASSERINI, G. D., AMBRÓSIO, D. L., LOPES, A. A., BATISTA JR, J. M., MOTA, J. S., FURLAN, M., CICARELLI, R. M. B.

“Trypanocidal activity of crude extract of *Piper* species by using colorimetric method and microscopy”. X IUBMB Conference (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) & XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador.

9- AMBRÓSIO, D. L., PASSERINI, G. D., LOPES, A. A., BATISTA JR, J. M., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., FURLAN, M., CICARELLI, R. M. B.

“Trypanocidal activity of *Piper* species (Piperaceae)”. XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ International Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa, 2005, Caxambu.

Participação em Eventos:

1- IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – “Parasitologia no contexto da saúde pública”. – Araraquara, 2008.

2- X IUBMB Conference (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) & XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). – Salvador, 2007.

3- I Simpósio Interação Parasito-Hospedeiro - Modelo de Estudo. – Araraquara, 2007.

4- XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease/ XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ International Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa. – Caxambu, 2005.

5- VI Simpósio Nacional de Biologia Molecular aplicada à Medicina. – Santos, 2005.

6- 52a. Jornada Farmacêutica – Araraquara, 2005.

7- 50o. Congresso Brasileiro de Genética. – Florianópolis, 2004.

8- 15o. Encontro de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS). – São Pedro, 2004.

9- 49o. Congresso Nacional de Genética. – Águas de Lindóia, 2003.

10- I Congresso Brasileiro de Legislação Ambiental, Bioética e Biodireito. – Ribeirão Preto, 2002.

11- IV Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina. – Marília, 2002.

DEDICATÓRIA...

A Deus por estar sempre ao meu lado, guiando meu caminho;

**Aos meus pais Tuca e Nardinho e a minha irmã Mariana, pelo amor e
incentivo sempre;**

Ao meu noivo Miltinho, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

**A minha orientadora
Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli**

**Pela amizade, confiança, incentivo, apoio.
Obrigado por ter compartilhado os seus
conhecimentos profissionais**

Muito obrigada pela oportunidade!

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto;

Às funcionárias da pós-graduação e às da biblioteca, pelos serviços prestados e pela atenção, sempre;

A todos do Laboratório de Imunologia (Erica, Carol, Re, Gi) e de Paternidade (Joyce, Greici, Jeane, Maria Angélica), pela companhia nesses anos, pelas longas conversas e pela amizade;

Em especial à Dani e ao Túlio por todo tempo, ajuda e paciência, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e de meu aprendizado, e à Má, minha estagiária, que muito me ajudou em todos os momentos;

À Valéria, técnica do Laboratório, e ao Gustavo, pela ajuda com os camundongos e, mais do que isso, pela companhia no dia-a-dia, as longas conversas e a grande amizade e carinho;

A todos os professores e alunos do NuBBE (Núcleo de Bioensaios Biossíntheses e Ecofisiologia de Produtos Naturais), em especial à Sílvia Noeli, Lidiane, Ana Cristina, Francine, Vânia, Jonas, Fernando, João Marcos, Luis Otávio e Mike, pelo fornecimento de material, indispensável para a realização desse trabalho, além de todas as discussões e ajudas “químicas”;

Ao Prof. Dr. João Aristeu Rosa e a todos os professores e alunos do Laboratório de Parasitologia pela amizade e apoio;

À Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros pela colaboração e amizade;

Às técnicas Marisa, Néia, Bel, Zenaide e Silvia pela amizade e longas conversas;

Às minhas queridas e eternas amigas de Araraquara Sur, Pavan, Marcelinha, Gorda, Dri e as de Rio Claro, Fer, Carquis, Mari A., Mari B., Thaís, Paulinha e Jú por estarem sempre ao meu lado, não importando a distância e o momento;

A toda minha família (avôs, tios, primos, cunhados, sogros) por dividirem comigo momentos tão especiais da minha vida e à Darinha pelos longos momentos em frente ao computador e o eterno carinho;

Enfim, a todas as pessoas que fizeram parte da construção desse trabalho de alguma forma, ou dentro de um laboratório ou do lado de fora, sempre me apoiando e me incentivando.

**"Todo grande progresso da ciência resultou
de uma nova audácia da imaginação."
(John Dewey)**

**"Para se chegar à verdade, antes tem que se subir pelos degraus dos erros, é o que
acontece com a ciência, em sua constante busca, até a exatidão dos resultados."
(Ivan Teorilang)**

**"A ciência se compõe de erros que, por sua
vez, são os passos até a verdade."
(Julio Verne)**

**“Não há saber mais ou saber menos: há
saberes diferentes.”
(Paulo Freire)**

RESUMO

O protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*, transmitido principalmente pelo inseto triatomíneo, por infecção congênita ou por transfusão sanguínea, causa a tripanossomíase americana ou doença de Chagas, como é mais conhecida. Essa é uma séria doença parasitária que ocorre na América Latina, com considerável impacto social e econômico. Dois medicamentos, nifurtimox e benzonidazol, são indicados no tratamento de pessoas infectadas, mas são pouco eficientes na fase aguda e praticamente ineficientes na fase crônica. Devido a esses fatores, é de extrema importância que se encontre um novo e eficiente agente quimioterápico e/ou quimiopreventivo. Neste trabalho, foi investigada a atividade de extratos, frações, substâncias puras e semi-sintéticas de diferentes espécies da Família Piperaceae na presença das formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*; as substâncias que se apresentaram ativas, também foram analisadas nas cepas NCS e Bolívia. Além disso, observaram-se as possíveis modificações morfológicas que essas substâncias poderiam causar nos parasitos, bem como um possível local de sua atuação e uma análise preliminar de sua citotoxicidade, quando na presença de macrófagos de camundongos isogênicos. A eficácia dessas substâncias foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando a redução do MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] em *formazan*, produzido pela atividade da enzima succinato desidrogenase da mitocôndria. Os cristais de *formazan* formados, depois de dissolvidos, foram determinados espectrofotometricamente. Os resultados encontrados foram proporcionais às atividades metabólicas das células (parasitos e/ou macrófagos), sendo o IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima) calculado por regressão linear para cada substância. Intensas modificações morfológicas foram observadas nos parasitos após determinado período de incubação, confirmando a atividade tóxica de algumas das substâncias. Entretanto, aparentemente, não houve correlação direta entre as modificações morfológicas nos parasitos e os valores de IC₅₀ encontrados.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, Família Piperaceae, MTT, macrófagos, modificações morfológicas.

ABSTRACT

The hemoflagellate protozoan, *Trypanosoma cruzi*, transmitted by triatominae bugs, congenital route or blood transfusion, causes American trypanosomiasis or Chagas' disease, as it is more known. This is a serious parasitic disease which occurs in Latin America, as a considerable social and economic impact. Two drugs, nifurtimox and benznidazol, had been evaluated in the treatment of infected people, but they have low tolerance in the acute phase and practically inefficient in the chronic phase. Because of these considerations, it is important to search for new more efficient chemopreventive and chemotherapeutic agents. In this work, we have been investigating the activity of crude extracts, fractions, pure and half-synthetic substances from different species of the Piperaceae Family in the presence of the epimastigote forms from *T. cruzi* Y strain; the samples which presented some activity also were analyzed in NCS and Bolívia strains. Moreover, we observed morphological modifications that some samples can make in the parasites, as well as a possible action site and a preliminary analysis of their cytotoxicity, when in the presence of isogenic mice macrophages (Balb/c and C57/Black). The efficacy of these samples was also measured using the reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] into a stained formazan product by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase activity. The crystals of formazan formed, after dissolved, had been determined spectrophotometrically. The results were proportional to the metabolic activity of the cells (parasites and/or macrophages), being the IC_{50} (half of the maximum inhibitory concentration) calculated by linear regression for each sample. Intense morphological modifications were observed in the parasites after a determined time of incubation, confirming the toxic activity of some substances. However, it seems that there was no any direct correlation between these parasite morphological findings and the IC_{50} .

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Piperaceae Family, MTT, macrophages, morphologic modifications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Morfologia do <i>T. cruzi</i> : formas epimastigota, tripomastigota e amastigota.	29
Figura 2 -	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .	31
Figura 3 -	Situação das doenças negligenciadas extremamente negligenciadas	34
Figura 4 -	Teste colorimétrico (MTT).	53
Figura 5 -	Estruturas moleculares das substâncias puras de <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> com atividade tripanocida e benzonidazol.	63
Figura 6 -	Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de DNA genômico.	69
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de DNA plasmidial.	70
Figura 8 -	Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (1,0%) para analisar intercalação.	70
Figura 9 -	Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose (1,0%) para analisar intercalação.	71
Figura 10 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	72
Figura 11 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	73
Figura 12 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença da fração hexânica da folha de <i>P. arboreum</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	74
Figura 13 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de piplartina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	75
Figura 14 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	76

Figura 15 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	77
Figura 16 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de pelitorina (amida) de semente de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	78
Figura 17 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de proctoriona C (policetídeo) de <i>P. blanda</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	79
Figura 18 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de <i>P. obtusifolia</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	80
Figura 19 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Y), na presença de cromeno da folha de <i>P. obtusifolia</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	81
Figura 20 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	82
Figura 21 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	83
Figura 22 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença da fração hexânica da folha de <i>P. arboreum</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	84
Figura 23 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de piplartina (amida) da folha de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	85
Figura 24 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	86
Figura 25 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	87
Figura 26 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de pelitorina (amida) da semente de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	88

Figura 27 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de proctoriona C (policetídeo) de <i>P. blanda</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	89
Figura 28 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de <i>P. obtusifolia</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	90
Figura 29 -	<i>T. cruzi</i> (cepa NCS), na presença de cromeno isolado da folha de <i>P. obtusifolia</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	91
Figura 30 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	92
Figura 31 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	93
Figura 32 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença da fração hexânica da folha de <i>P. arboreum</i> , observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	94
Figura 33 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de piplartina (amida) da folha de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	95
Figura 34 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	96
Figura 35 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença da mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	97
Figura 36 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de pelitorina (amida) de semente de <i>P. tuberculatum</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	98
Figura 37 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de proctoriona C (policetídeo) de <i>P. blanda</i> observados por microscopia após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	99
Figura 38 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de <i>P. obtusifolia</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas.	100
Figura 39 -	<i>T. cruzi</i> (cepa Bolívia), na presença de cromeno da folha de <i>P. obtusifolia</i> observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Extratos, frações e substâncias testadas com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	46
Tabela 2 -	Cálculo do IC ₅₀ dos extratos, frações e substâncias puras testadas em cepa Y de <i>T. cruzi</i>	62
Tabela 3 -	Resultado do IC ₅₀ das substâncias testadas na cepa NCS e Bolívia de <i>T. cruzi</i>	65
Tabela 4 -	Resultado do IC ₅₀ das substâncias testadas nas cepas Y, NCS e Bolívia	65
Tabela 5 -	IC ₅₀ das substâncias em macrófagos de Balb/c e C57/Black/6	67
Tabela 6 -	Cálculo do Si (<i>Safety index</i>)	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva da porcentagem de parasitos mortos em relação a diferentes concentrações da substância, obtidas por contagem em câmara de Neubauer e teste colorimétrico com MTT.	59
Gráfico 2 -	Curva da porcentagem de parasitos mortos em relação a diferentes concentrações da substância, obtidas por contagem em câmara de Neubauer e teste colorimétrico com MTT.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2-ME	β -mercaptoetanol
atm	Pressão atmosférica
CO ₂	Dióxido de carbono (Gás carbônico)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
EBr	Brometo de etídio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HAI	<i>Haemagglutination-inhibition test</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
IC ₅₀	50% da concentração inibitória
IFI	Teste de Imunoflorescência
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
ISM	<i>Isometamidium chloride hydrochloride</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/L	Miligrama por litro
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
N	Normal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia polimerásica (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PG	Projetos Genoma
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RPMI	Meio Instituto Roswell Park Memorial
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodécil sulfato de sódio
Si	<i>Safety index</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TDR	Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TE	Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
μm	Micrometro
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1)	Como tudo começou.....	25
1.2)	Doença de Chagas.....	26
1.3)	Transmissão.....	27
1.4)	Morfologia e ciclo biológico.....	29
1.5)	A doença.....	31
1.6)	Diagnóstico clínico e laboratorial.....	32
1.7)	Terapêutica.....	33
1.8)	Futuro: O que esperar?.....	34
1.9)	Estudos atuais sobre novas substâncias.....	36
1.10)	Família Piperaceae.....	39
1.11)	Gênero <i>Piper</i>	39
1.12)	Gênero <i>Peperomia</i>	40
1.13)	Atividade tripanocida.....	40
1.14)	Avaliação de citotoxicidade em células de mamíferos.....	41
2	OBJETIVOS.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1)	Materiais.....	46
3.1.1)	Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
3.1.2)	Extratos, frações e substâncias isoladas da Família Piperaceae.....	46
3.1.3)	Camundongos isogênicos.....	48
3.1.4)	Meios, Soluções e Reagentes.....	48
3.2)	Métodos.....	51
3.2.1)	Cultivo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
3.2.2)	Padronização do método colorimétrico utilizando MTT.....	51
3.2.3)	Confirmação da sensibilidade do método.....	53
3.2.4)	Avaliação da atividade tripanocida de substâncias extraídas de plantas.....	54
3.2.5)	Determinação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo.....	54
3.2.6)	Cálculo do índice de citotoxicidade (IC ₅₀).....	55
3.2.7)	Cálculo do <i>Safety index</i> (Si).....	55
3.2.8)	Extração de DNA genômico.....	55
3.2.9)	Extração de DNA plasmidial (miniprep).....	55
3.2.10)	Intercalação das substâncias no DNA genômico e plasmidial.....	56
3.2.11)	Modificações morfológicas dos parasitos.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1)	Padronização do método colorimétrico utilizando MTT.....	59
4.2)	Avaliação da atividade tripanocida de substâncias extraídas de plantas.....	61
4.3)	Determinação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo.....	66

4.4)	Extração de DNA genômico.....	69
4.5)	Extração de DNA plasmidial (miniprep).....	70
4.6)	Intercalação das substâncias no DNA genômico e plasmidial.....	70
4.7)	Modificações morfológicas dos parasitos.....	72
4.7.1-)	Modificação morfológica em <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y).....	72
4.7.1.1-)	Controle (ausência de substância).....	72
4.7.1.2-)	Benzonidazol.....	73
4.7.1.3-)	Fração hexânica da folha de <i>Piper arboreum</i>	74
4.7.1.4-)	Piplartina (amida) de folha de <i>Piper tuberculatum</i> ..	75
4.7.1.5-)	Mistura piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	76
4.7.1.6-)	Mistura piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	77
4.7.1.7-)	Pelitorina (amida) da semente de <i>Piper tuberculatum</i>	78
4.7.1.8-)	Proctoriona C (policetídeo) de <i>Peperomia blanda</i> ...	79
4.7.1.9-)	Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de <i>Peperomia obtusifolia</i>	80
4.7.1.10-)	Cromeno isolado da fração hexânica da folha de <i>Peperomia obtusifolia</i>	81
4.7.2-)	Modificação morfológica em <i>Trypanosoma cruzi</i> (NCS)....	82
4.7.2.1-)	Controle (ausência de substância).....	82
4.7.2.2-)	Benzonidazol.....	83
4.7.2.3-)	Fração hexânica da folha de <i>Piper arboreum</i>	84
4.7.2.4-)	Piplartina (amida) de folha de <i>Piper tuberculatum</i> ..	85
4.7.2.5-)	Mistura piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	86
4.7.2.6-)	Mistura piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	87
4.7.2.7-)	Pelitorina (amida) da semente de <i>Piper tuberculatum</i>	88
4.7.2.8-)	Proctoriona C (policetídeo) de <i>Peperomia blanda</i> ...	89
4.7.2.9-)	Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de <i>Peperomia obtusifolia</i>	90
4.7.2.10-)	Cromeno isolado da fração hexânica da folha de <i>Peperomia obtusifolia</i>	91
4.7.3-)	Modificação morfológica em <i>Trypanosoma cruzi</i> (Bolívia)	92
4.7.3.1-)	Controle (ausência de substância).....	92
4.7.3.2-)	Benzonidazol.....	93
4.7.3.3-)	Fração hexânica da folha de <i>Piper arboreum</i>	94
4.7.3.4-)	Piplartina (amida) de folha de <i>Piper tuberculatum</i> ..	95
4.7.3.5-)	Mistura piplartina e diidropiplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	96
4.7.3.6-)	Mistura piplartina e cis-piplartina (amidas) de <i>Piper tuberculatum</i>	97
4.7.3.7-)	Pelitorina (amida) da semente de <i>Piper tuberculatum</i>	98
4.7.3.8-)	Proctoriona C (policetídeo) de <i>Peperomia blanda</i> ...	99
4.7.3.9-)	Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de <i>Peperomia obtusifolia</i>	100
4.7.3.10-)	Cromeno isolado da fração hexânica da folha de <i>Peperomia obtusifolia</i>	101

5	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS.....	106

Introdução

1) INTRODUÇÃO

A prevenção de certas doenças parasitárias depende da associação de diversos fatores, tais como, medidas ecológicas, sanitárias e emprego de fármacos eficazes e seguros (Frayha et al., 1997). A eficácia do tratamento depende, por sua vez, do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitos. Com o avanço tecnológico e do conhecimento científico para o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos parasitos no homem, tornou-se possível à realização do processo de planejamento de fármacos de maneira mais racional, enfatizando o mecanismo de ação, com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais dos parasitos, minimizando os efeitos deletérios das substâncias para o homem.

1.1) Como tudo começou

Baseado no livro História da Doença de Chagas de Milton Carneiro, deve-se retornar um pouco ao ano de 1908 para averiguar como Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas observou pela primeira vez os tripanosomas e a doença.

No ano de 1908, estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil na região norte de Minas Gerais e a malária impedia o andamento dessa construção. Para acabar com esse problema, o engenheiro-chefe da construtora, Dom Cantarino Mota entrou em contato com Oswaldo Cruz, que designou Carlos Chagas, assistente do Instituto de Manguinhos para ir à Lassance, norte de Minas e dirigir o combate à doença.

Em uma conversa com o engenheiro Cantarino Mota, já em Lassance, foi sugerido a Carlos Chagas que fizesse um estudo sobre o "barbeiro" uma vez que esse vivia nas casas de pau-a-pique e chupava sangue de pessoas e animais.

Chagas dissecou diversas vezes o barbeiro e, dentro de seu tubo digestivo encontrou "flagelados com caracteres de critídias", como ele próprio disse. Remeteu, então, alguns exemplares do barbeiro a Oswaldo Cruz que fez as mesmas observações. Para o estudo do ciclo evolutivo, inocularam os tripanosomas em sagüis, coelhos e cães.

Chagas deu o nome ao tripanosoma de *Trypanosoma cruzi* (*Trypanosoma* que significa corpo em verruma e *cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz).

Em um exame a fresco de sangue de uma criança gravemente enferma em 23 de abril de 1909, encontrou alguns flagelados que apresentaram morfologia idêntica à do tripanosoma presente no sangue de animais. A menina se chamava Berenice e se tornou mundialmente conhecida, pois à cepa do parasito isolado foi dado seu nome.

A primeira notícia científica da descoberta da autoria de Carlos Chagas foi publicada em 1909, no "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz" e, em 1912, apareceu pela primeira vez em uma divulgação não científica no "Almanaque Brasileiro Garnier".

Além desse trabalho, Chagas publicou outros relacionados à sua descoberta. Os mais importantes foram: "Nova tripanosomose humana" (1909); "Aspecto clínico geral da nova entidade mórbida produzida pelo *Schizotrypanum cruzi*" (1910); "O ciclo do *Schizotrypanum cruzi* no homem e nos animais de laboratório" (1911); "Sobre um tripanosoma do tatu" (1912); "Formas nervosas de uma nova tripanosomose" (1913); "Revista do ciclo do *Trypanosoma cruzi*" (1913) e "Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e da tripanosomose americana. Retrospecto histórico" (1922).

1.2) Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas, é uma zoonose causada pelo hemoflagelado denominado *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e transmitida pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família Reduviidae). Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (Chagas 1909; Lana & Tafuri 2000; Schmunis 2000; Rey 2001).

Em um estudo feito pelo World Bank em 1993, a doença de Chagas na América Latina chegou a ocupar o primeiro lugar das doenças tropicais e o quarto das doenças transmissíveis, ficando atrás apenas das doenças respiratórias agudas, diarreia e Aids (Schmunis 1997). Em um outro estudo, agora realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1997, a doença de Chagas se mostrou endêmica na América Latina, afetando de 16 a 18 milhões de pessoas e tendo uma população maior que 100 milhões expostas à infecção (WHO 1997; Lana & Tafuri 2000; Schmunis 2000; Pozas et al., 2005).

A prioridade no combate da doença de Chagas sempre foi renegada devido ao seu caráter crônico e rural, acometendo populações carentes, sem condição de reivindicação de suas necessidades. Senão por compromisso social, estudos de custo-benefício mostraram a importância do combate à doença (Silveira 2000). Sendo a doença uma zoonose, sua erradicação parece utópica. Sempre haverá o risco de domiciliação de vetores silvestres e da contaminação humana acidental. Devido ao grande número de reservatórios selvagens e domésticos e, conseqüente inviabilidade de seu esgotamento, aliado ainda à indisponibilidade de vacinas e fármacos efetivos no tratamento da fase crônica da doença, a única possibilidade de combate à doença atualmente reside na redução ou interrupção da transmissão vetorial focada no controle de populações domiciliadas (Silveira 2000). Por isso, a doença de Chagas

ainda é endêmica em muitas áreas do interior do Brasil, exigindo pesquisas sobre novos fármacos contra o *T. cruzi* e novas formas de combater o triatomíneo, o que sugere que o governo brasileiro faça investimentos, também, no combate ao inseto.

O *T. cruzi* é representado por um conjunto de populações que circulam em hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Estas populações, também denominadas isolados ou cepas, apresentam grande heterogeneidade de comportamento biológico como, por exemplo, diferentes graus de virulência para animais experimentais e humanos, variações na sensibilidade a substância e tropismo tissular (Docampo et al., 2005).

Atualmente, as cepas de *T. cruzi* são agrupadas em dois tipos: cepas do tipo I, que segundo Briones e colaboradores (1999) são as linhagens isoladas de seres humanos e, cepas do tipo II, que são as linhagens isoladas de vetores. A cepa Y, descrita por Silva & Nussenzweig (1953) é considerada uma cepa padrão do tipo I; a cepa NCS (cepa tipo I), isolada de paciente chagásico da região de Araraquara pelo Dr. Arnaldo Buainain (Buainain et al., 1987) do Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP, e gentilmente cedida ao nosso laboratório desde 1987; a cepa Bolívia foi isolada de triatomíneo em Vitichi – Bolívia por Funayama e Prado Júnior (1974). Essa cepa, apesar de apresentar predominantemente a forma larga, também apresenta uma pequena proporção de forma delgada em sua constituição. Na maioria, seus parasitos têm membrana ondulante com poucas ondulações e flagelo relativamente curto (Zingales et al., 1998).

1.3) Transmissão

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. Neste ciclo, o vetor cresce e se multiplica 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).

Os principais mecanismos de transmissão são pelo contato com as fezes e urinas de triatomíneos contaminados (principais gêneros são *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*), transfusões sanguíneas, transmissão congênita ou vertical (Lana & Tafuri 2000) e transmissão oral. As transmissões mais raras, mas não menos importante são as por acidente laboratorial, manejo de animais infectados, transplantes de órgãos e leite materno (Mazza et al., 1936; Comandaroba et al., 2002; Coura & Castro 2002).

A transmissão vetorial deve ser considerada o mecanismo primário de difusão da doença, pois dela dependem as outras formas de transmissão, sendo responsável por 80 a 90%

dos casos. Ela acontece geralmente à noite, quando os triatomíneos abandonam seus esconderijos e picam, geralmente o rosto, do indivíduo que está dormindo. Depois ou durante a picada, o inseto evacua próximo ao local, contendo em suas fezes e urina, tripanosomas infectantes. Ao sentir a dor e o prurido, o indivíduo picado acorda, coça, suja os dedos com fezes contaminadas, esfregando os olhos e os locais atingidos pela picada, e assim há a contaminação (Carneiro 1963). Esse tipo de transmissão vem aumentando ao longo dos anos devido, principalmente, as atividades de "turismo ecológico" em locais ecologicamente fechados como os sítios da Mata Atlântica brasileira, por exemplo (Dias 2002).

A transfusão sanguínea foi considerada uma possibilidade de transmissão primeiramente por Salvador Mazza na Argentina (Mazza et al., 1936) e até hoje o cuidado com o banco de sangue deve ser grande (Dias 2002).

Na década de 70 (1974), no atual Instituto de Cardiologia "Dante Pazzanese" de São Paulo, foi detectado pelo médico cardiologista, Dr. Elias Buainain (*in memorian*), através do quadro clínico e do xenodiagnóstico, um dos primeiros casos de infecção de Chagas por transfusão sanguínea, em um indivíduo estrangeiro que vivia no Brasil e que possuía um alto poder aquisitivo (Dra. Regina Cicarelli, comunicação pessoal). Isso, certamente, porque ainda eram (e são) poucos os países latino-americanos que realizam sorologia para *T. cruzi* em 100% dos doadores (Brenner et al., 2000). Além disso, esse tipo de transmissão é a principal forma de contaminação nos países não endêmicos como Canadá, Espanha e Estados Unidos, encontrando-se uma porcentagem que varia de 5 a 20% (Dias 2006b).

A transmissão congênita, como o próprio nome já diz, ocorre em crianças infectadas pela mãe sorologicamente positiva, que apresenta *T. cruzi* no sangue do cordão umbilical (Coura & Castro 2002). Sua porcentagem de contaminação varia de 0,5 a 8% no Brasil (Dias 2000). Acredita-se que a infecção congênita pelo *T. cruzi* continuará como um problema de saúde pública, nos países latino-americanos, pelo menos nos próximos 30 anos, quando se espera que o número de mulheres infectadas em idade fértil deva reduzir significativamente (Carlier & Torrico 2003).

A contaminação de alimentos por vetores silvestres e reservatórios de *T. cruzi* em vertebrados é provavelmente o fator de maior importância na transmissão oral da doença de Chagas (Camandaroba et al., 2002). Desde o relato de Mazza e colaboradores em 1936 sobre transmissão por leite materno, outras observações assinalaram casos de transmissão oral em Teutônia (RS) (Nery-Guimarães et al., 1968; Silva et al., 1968), na Paraíba (Shikanai-Yasuda et al., 1991), na Colômbia, na Argentina, no México, na Amazônia (Valente et al., 1999), registrando-se mais recentemente, em 2005, um surto em Santa Catarina. Ainda segundo a

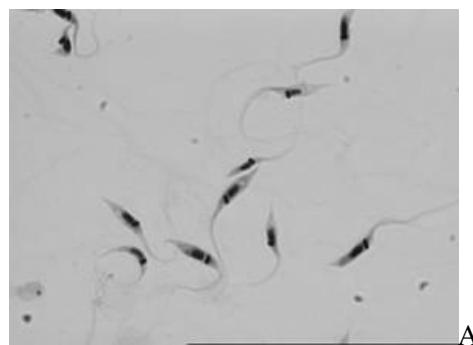
Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, um outro episódio parece ter ocorrido no Ceará, em 2006. Em acidentes de laboratório, a contaminação oral foi comprovada em técnicos que se infectaram pela ingestão de formas de cultura ou de sangue contaminado, enquanto que pelo menos um caso (na Argentina) deveu-se a ingestão comprovada de carne de caça (Dias 2006a).

O surto em Santa Catarina totalizou 45 casos suspeitos, sendo 31 confirmados e 5 óbitos. A transmissão foi relacionada ao consumo de caldo de cana em um único ponto de venda nas margens da BR 101 (Barracão Penha II), no município de Navegantes. No local foram encontrados dez vetores infectados numa palmeira próxima ao quiosque de venda de caldo de cana, um dentro do quiosque, também infectado, e 33 na mata fechada atrás do quiosque, não estando infectados apenas três deles. Também próximo foi encontrado um gambá fêmea com quatro filhotes, todos infectados (Ianni & Mady 2005).

Logo em seguida, 26 pessoas foram contaminadas com suco de açaí acrescido do parasito em Igarapé da Fortaleza, Amapá (Ianni & Mady 2005). Somente no Pará, 71 casos foram notificados, incluindo dezessete microepidemias familiares, principalmente por ingestão de suco de açaí contaminado. A palmeira de açaí, juntamente com a de bacaba, cujo suco também é consumido na região, e a de babaçu são conhecidas por abrigar triatomíneos na região Norte do Brasil (Valente et al., 2001). Curiosamente, nos treze casos agudos relatados em Abaetetuba (PA), aproximadamente a metade evoluiu com eletrocardiograma normal, característica observada em estudos de campo em outras regiões do Brasil (Ianni & Mady 2005).

1.4) Morfologia e ciclo biológico

O *T. cruzi* apresenta as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota, como se pode observar na Figura 1.



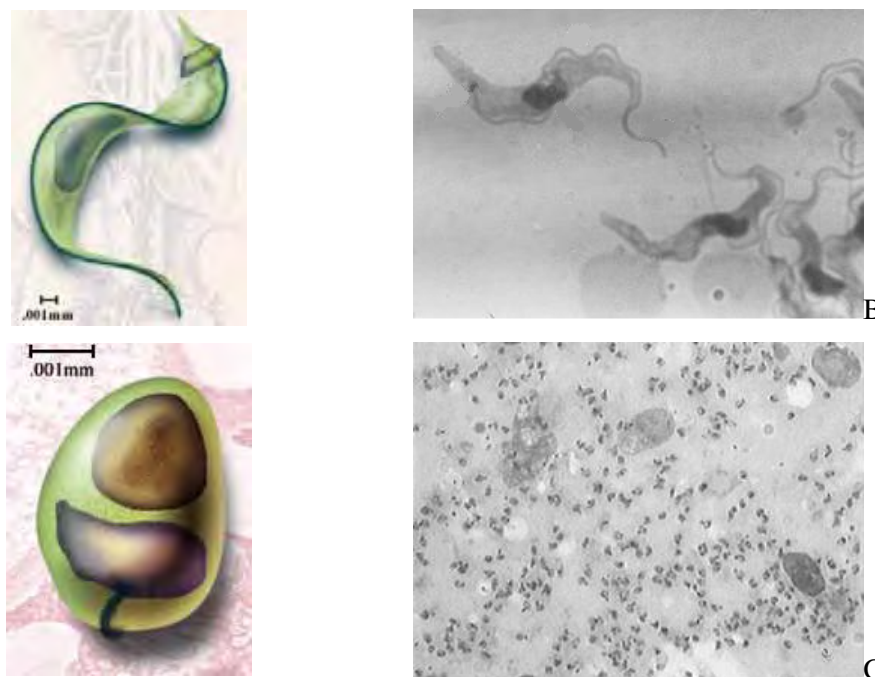


Figura 1: Morfologia do *T. cruzi*: (A) epimastigota, (B) tripomastigota e (C) amastigota.

Fonte: A) <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html> e <http://www.ciens.ula.ve/~biolprot/protozoo/tcformas.htm>

B) <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html> e <http://www2.nau.edu/~fpm/research/res.html>

C) <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html> e <http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>

A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e flagelo livre na porção anterior. Essa é a forma de replicação no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) que se encontra na porção posterior do intestino e em cultura em meio líquido (Chagas 1909; Lana & Tafuri 2000; Rey 2001).

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. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, no líquido cefalorraquidiano, leite, esperma e em cultura de células. Os tripomastigotas metacíclicos são morfologicamente semelhantes às formas tripomastigotas, sendo as formas infectantes liberadas nas fezes do vetor (Lana & Tafuri 2000; Rey 2001).

A forma amastigota é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza (Lana & Tafuri 2000). É a forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear e em cultura de células. (Chagas 1909; Lana & Tafuri 2000; Rey 2001).

A Figura 2 representa o ciclo biológico da doença de Chagas. Há multiplicação de

formas epimastigotas no intestino posterior do vetor (A). Na ampola retal, os parasitos se transformam em tripomastigotas metacíclicos que é a forma infectante, comprida (B) que são eliminados com as fezes (C). Ao penetrar no hospedeiro vertebrado, os flagelados invadem células do sistema fagocitário mononuclear cutâneo (D) onde, perde o flagelo e a membrana ondulante e sob a forma amastigota, voltam a multiplicar-se. Depois passam para o sangue como tripomastigotas (E). Os parasitos disseminam-se pelo organismo, reproduzindo-se assexuadamente e atacando principalmente músculos lisos e estriados, macrófagos e fibroblastos (F). Depois de várias divisões assexuadas, as formas arredondadas se transformam em novas formas alongadas e passam novamente para o sangue. O ciclo fecha-se quando o paciente é picado por outro triatomíneo (G) e as formas sanguíneas chegam ao intestino do vetor (H) (Carneiro 1963; Rey 2001).

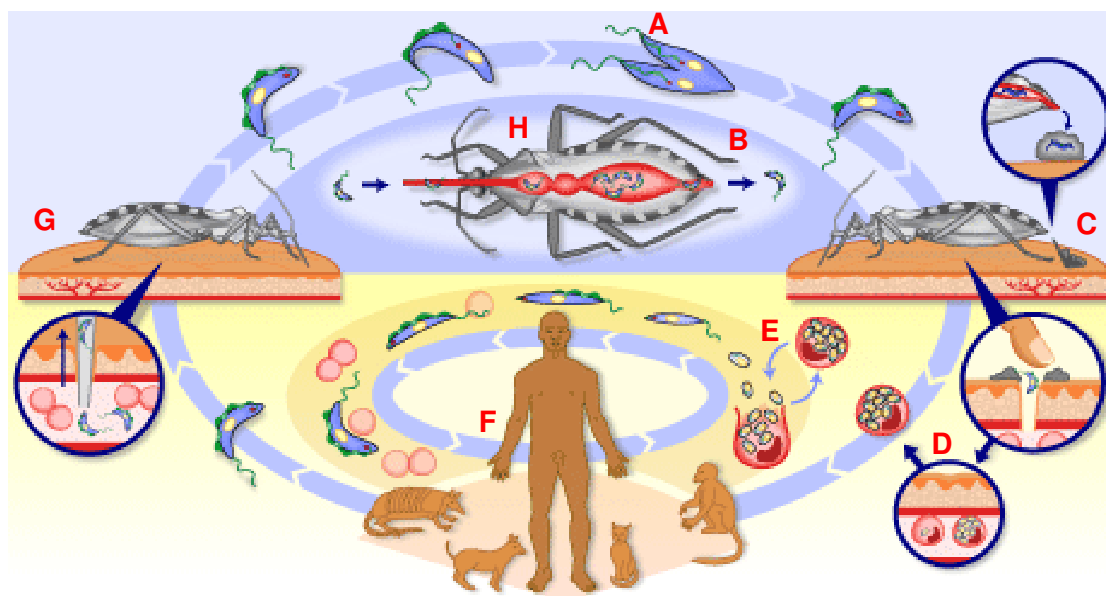


Figura 2: Ciclo biológico do *T. cruzi*

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

1.5) A doença

A doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica, podendo ser sintomática (aparente) ou assintomática (não aparente), sendo esta a mais freqüente, de 90 a 98% dos pacientes (Brener et al., 2000; Lana & Tafuri 2000).

Depois da infecção e incubação, inicia-se a fase aguda da doença. A doença aguda se diferencia da crônica por ser inicial, rápida e com elevada parasitemia. Além disso, pode apresentar manifestações locais quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romaña) ou na pele (chagoma de inoculação), aparecendo dentro de 4 a 10 dias após a picada do

triatomíneo, regredindo em um ou dois meses (Brener et al., 2000; Lana & Tafuri 2000). A mortalidade nesses casos é de 2 a 8%, especialmente em crianças (Coura & Castro 2002).

Já a fase crônica se mostra tardia, de lenta evolução e com baixa parasitemia, podendo essa se dividir em indeterminada (infecção com ausência de sintomatologia, que acontece de 50 a 69% dos casos), subaguda e determinada ou sintomática (formas cardíacas em 13% dos casos, digestivas em 10% e formas mistas em 8%) (Brener et al., 2000; Lana & Tafuri 2000).

Depois que o indivíduo é infectado, as primeiras reações que ele apresenta são: inflamação mononuclear devido à ruptura de células parasitadas e severas inflamações acompanhadas de necrose, especialmente no coração. Outros sintomas e reações da doença de Chagas são: agregação de plaquetas, degranulação de eosinófilos, patologia microvascular, edemas, trombose, isquemia, megaesôfago e megacólon (Andrade 1999).

Geralmente o órgão mais afetado pela doença de Chagas é o coração. O parasitismo produz a desintegração e a destruição das miofibrilas e conseqüente liberação de produtos tóxicos. As lesões miocárdicas são primitivamente inflamatórias e, secundariamente degenerativas. As principais manifestações clínicas das lesões cardíacas são a taquicardia, a hipotensão, a arritmia extrassistólica e a cardiomegalia (aumento extraordinário do volume do coração) (Carneiro 1963).

1.6) Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela clínica e, confirmado, quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial. Elementos importantes para a suspeita da etiologia chagásica são: região de procedência do paciente, estadia em casas onde havia triatomíneos, e transfusões sanguíneas, mesmo fora das áreas endêmicas (Brener et al., 2000; Lana & Tafuri 2000; Rey 2001).

A presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romana e/ou chagoma de inoculação) acompanhados de febre irregular ou ausente, adenopatia-satélite ou generalizada, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema generalizado ou dos pés, fazem suspeitar da fase aguda da doença. As alterações cardíacas com sinais de insuficiência cardíaca confirmada pelo eletrocardiograma e alterações no esôfago e cólon (reveladas por raios X) fazem suspeitar da fase crônica (Brener et al., 2000; Lana & Tafuri 2000; Rey 2001).

Os métodos de diagnóstico laboratorial apresentam diferentes resultados se aplicados na fase aguda ou crônica da infecção. Na fase aguda, observa-se alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos (IgM e IgG) que podem atingir níveis elevados. Nessa fase, recomenda-se a pesquisa direta do parasito (a

fresco, micro-hematócrito, gota espessa, etc.) e, se necessário, pesquisa indireta (xenodiagnóstico, hemocultura, PCR, etc.) (Lana & Tafuri 2000; Luquetti & Rassi 2000; Rey 2001). Na fase crônica, observa-se baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG). Assim, recomendam-se métodos sorológicos (IFI, ELISA, HAI) (Lana & Tafuri 2000; Luquetti & Rassi 2000; Rey 2001).

1.7) Terapêutica

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz. Brener e outros pesquisadores fizeram diversos testes de substâncias em animais e observaram que vários componentes têm um efeito supressor, mas nenhum deles conseguiu promover uma cura definitiva em todos os pacientes (Brener 1968; Lana & Tafuri 2000). Além disso, muitos problemas são encontrados quanto a seu uso, incluindo toxicidade aguda, falta de absorção oral e resistência (Wang 1995).

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), sendo mais efetivo para eliminar os parasitos na fase aguda da doença, diminuindo o curso da infecção, desde que a doença não tivesse acometido o sistema cardiovascular (Saúde-Guimarães & Faria 2007).

No entanto, no Brasil, o nifurtimox foi retirado do mercado devido a seus efeitos colaterais (Lana & Tafuri 2000; Rey 2001). Entre os efeitos colaterais dos dois medicamentos, pode-se observar: perda de peso (anorexia), náusea e vômito, excitação nervosa, insônia, convulsão, vertigens, dores de cabeça, sonolência, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, polineuropatias periféricas e dermatites (Castro & Dias 1988; Saúde-Guimarães & Faria 2007). Dessa forma, o benzonidazol se tornou aqui, a única alternativa para o tratamento, apesar de muitas críticas devidas também a seus efeitos colaterais e a pouca efetividade na fase crônica da doença.

Essa baixa eficiência é encontrada principalmente em adultos, uma vez que, estudos conduzidos pelo TDR (Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais), programa especial da OMS, demonstraram que crianças menores de 12 anos, no início da fase crônica, puderam ser curadas ou demonstraram cerca de 60% de negatificação da sorologia e todos ficaram menos vulneráveis a desenvolver danos cardíacos em relação ao grupo não tratado (Andrade et al., 1996; Sosa-Estani et al., 1998; Andrade et al., 2004; Sosa-Estani & Segura 2006).

Atualmente, o uso do benzonidazol está sendo descontinuado no Brasil.

1.8) Futuro: O que esperar?

As doenças negligenciadas são doenças que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas que afetam principalmente pessoas pobres, como por exemplo, a leishmaniose, a doença do sono, a malária, e a doença de Chagas.

Há um grande volume de trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética dos parasitos causadores destas doenças, porém todo esse conhecimento não consegue se reverter em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas.

Entre 1975 e 1999, dos 1.393 fármacos desenvolvidos, apenas 1% foi dirigida para a tuberculose e as doenças tropicais (Barrett & Gilbert 2002), que estão englobadas entre as doenças negligenciadas e as extremamente negligenciadas, respectivamente. Isso se deve, provavelmente, ao retorno econômico que é muito pequeno frente aos gastos para o desenvolvimento de um produto de sucesso (cerca de 300 milhões de dólares).

As doenças negligenciadas também podem afetar indivíduos dos países ricos, como pacientes com tuberculose e pessoas que contraem malária em viagens, para as quais a indústria farmacêutica baseada em pesquisa tem interesse apenas marginal. No caso das doenças "extremamente negligenciadas", como a doença do sono, a de Chagas e a leishmaniose, os pacientes são tão pobres que praticamente não possuem poder de compra, e nenhuma manipulação das forças de mercado poderá estimular o interesse das empresas farmacêuticas.

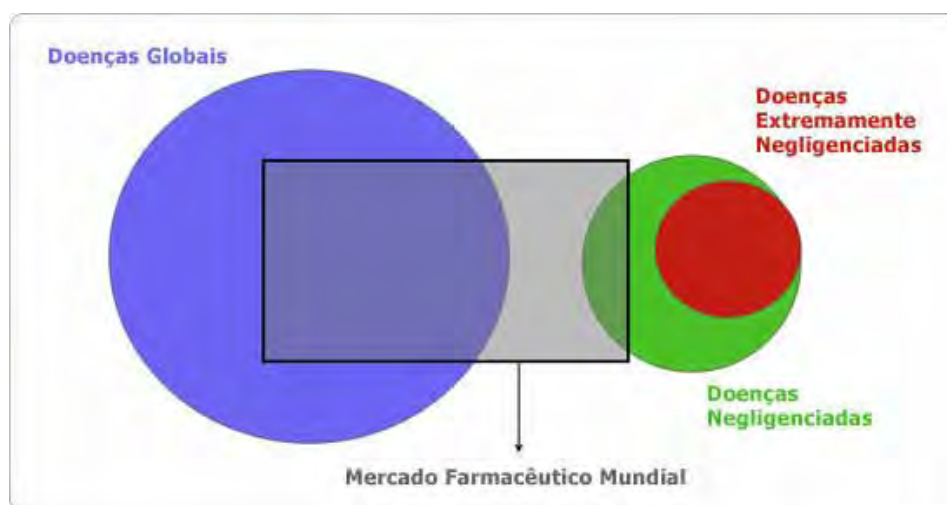


Figura 3: Situação das doenças negligenciadas extremamente negligenciadas
 Fonte: http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx

As **Doenças Globais**, como o câncer, doenças cardiovasculares, doenças mentais e distúrbios neurológicos representam a maior concentração de P&D da indústria farmacêutica. Apesar de elas afetarem tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento, nestes a maioria das pessoas que necessitam de medicamentos para tratar essas doenças não pode pagar por elas e, por conseguinte, não é atendida pelo mercado farmacêutico.

As **Doenças Negligenciadas**, como a malária, provocam um interesse apenas marginal na indústria farmacêutica baseada em pesquisa. Embora também afetem indivíduos dos países ricos, como pacientes com tuberculose e pessoas que contraem malária em viagens, essas doenças afligem primordialmente as populações dos países em desenvolvimento.

As **Doenças Extremamente Negligenciadas**, como a doença do sono, a de Chagas e a leishmaniose, afetam exclusivamente as populações dos países em desenvolvimento. Como a maioria desses pacientes é pobre demais para pagar qualquer tratamento, eles não representam praticamente nenhum mercado e a maioria fica excluída do escopo dos esforços de P&D da indústria de remédios e, portanto, fora do mercado farmacêutico.

Na Figura 3, a zona acinzentada representa a parcela do **Mercado Farmacêutico Mundial** referente a produtos voltados para condições que são diferentes das puramente médicas (como celulite, calvície, rugas, dietas, estresse e problemas de adaptação a fuso horário), que constituem um segmento de mercado altamente lucrativo nos países ricos.

Portanto, o futuro, não só da doença de Chagas, mas de todas as doenças negligenciadas, está fortemente baseado na chamada “nova biologia”, isto é, na biologia molecular, que nos fornece diversas informações de vários projetos genomas (PG) em andamento, incluindo os humanos, os patogênicos (incluindo *T. brucei* e *T. cruzi*) e os genomas de vetores (Morel 1999) e na procura de novos fármacos a partir de estudos de vegetais em geral.

A última década assistiu ao surgimento de diversos PG visando à obtenção de uma amostragem total ou parcial de seqüências de DNA dos mais diversos organismos. O primeiro PG lançado neste contexto foi o humano, iniciado oficialmente em 1990 nos Estados Unidos e rapidamente seguido por outros países do Primeiro Mundo. O pleno conhecimento do genoma humano, com cerca de cem mil genes expressos, possibilitará um melhor estudo da diversidade genética humana, permitindo o desenvolvimento de testes diagnósticos e prognósticos e guiará o desenvolvimento de novos fármacos efetivos para as mais diversas doenças. A conclusão deste projeto representará, sem dúvida, a maior revolução biotecnológica do próximo século (Dias Neto 2002).

Ao PG humano surgiram vários outros dos mais diversos organismos, e dentre eles os PG de parasitos. Os primeiros PG de parasitos foram de imediato financiados por laboratórios privados e entidades governamentais, com óbvios interesses financeiros e estratégicos. Um exemplo neste sentido pode ser dado pelo PG de malária, que objetiva o seqüenciamento do genoma dos protozoários causadores desta doença. Em 1994, na tentativa de estimular o progresso de PG de parasitos extremamente relevantes na saúde pública, mas sem um financiamento substancial de entidades privadas, a OMS através da TDR, começou a apoiar e financiar parcialmente alguns destes PG. Foram escolhidos os parasitos relacionados a cinco grupos de doenças: esquistossomoses (*Schistosoma* spp), filariose (*Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* e *Onchocerca volvulus*), leishmanioses (*Leishmania* spp), doença de Chagas (*T. cruzi*) e tripanossomíase africana (*T. brucei*) (Dias Neto 2002).

A iniciativa da OMS tinha como objetivos principais o desenvolvimento de mapas detalhados do genoma de parasitos, a implementação de novas tecnologias, o desenvolvimento de bancos de dados acessíveis aos pesquisadores interessados, de métodos de análise genética de parasitos e o envolvimento e treinamento de pesquisadores de países do Terceiro Mundo, onde estas parasitoses são endêmicas. Um dos aspectos mais fascinantes dos diversos PG são os programas de descobertas de genes.

Nos PG de parasitos, estes programas oferecem a possibilidade da descoberta de mecanismos de resistência a fármacos e/ou outras substâncias, escape ao sistema imune do hospedeiro, novos alvos para quimioterapia ou produção de vacinas. A descoberta de genes também permite uma melhor compreensão da história evolutiva do parasito e das suas relações com seus hospedeiros (Dias Neto 2002).

Além de Morel (1999), outros autores nos fornecem suas opiniões sobre o futuro da doença de Chagas. Segundo Dias (2002), o novo milênio contemplará cada vez mais chagásicos idosos, daí derivando um grande desafio para os médicos e para o sistema de saúde nas próximas décadas e, o próprio Dias (1997) completa, dizendo que o fim da doença de Chagas em humano envolve, principalmente, a vontade política e a responsabilidade social.

1.9) Estudos atuais sobre novas substâncias

Várias cepas de *T. cruzi* foram isoladas de diferentes países e zonas geográficas. Diferenças importantes na resistência ou suscetibilidade às substâncias em uso, em experimentação em laboratório, ou em estudos clínicos, foram relatadas entre as diferentes cepas do parasito. Esta situação dificulta ainda mais a busca por novos fármacos anti-*T. cruzi* (Morelo et al., 1994).

Hoje em dia, a quimiorresistência apresentada pelos parasitos está muito presente em alguns países onde o fármaco não é mais utilizado com eficiência. Mesmo com as dificuldades, a falta de novos tripanocidas e o aumento da resistência conduziram os estudos para melhor entendimento dos mecanismos de ação e compreensão da quimiorresistência frente aos tripanocidas (Boibessot et al., 2002).

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais tem provocado renovado interesse pelo conhecimento das características das substâncias delas originadas. Incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras considerando a extensa e diversificada flora do país (Yunes et al., 2001).

Devido à imensa flora e aos aspectos culturais do uso de plantas na forma de extratos brutos ou infusões, sua utilização tornou-se prática muito comum no tratamento de infecções no Brasil (Calixto 2000). Essa diversidade química e as diferentes bioatividades das plantas vêm trazendo o desenvolvimento de centenas de novos fármacos (Luize et al., 2005).

Na literatura atual, observam-se investigações sobre a atividade tripanocida com uma grande variedade de extratos naturais, especialmente os vegetais, os componentes isolados e os semi-sintéticos (Coura & Castro 2002).

Estudos em diferentes países, incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia vêm mostrando muitas plantas com atividade contra o *T. cruzi* (Muelas-Serrano et al., 2000; Weninger et al., 2001; Abe et al., 2002; Igweh et al., 2002).

Vários estudos já foram realizados e, dentre as diferentes espécies de plantas brasileiras, encontram-se muitas com atividade leishmanicida e/ou tripanocida.

Dentre essas, pode-se citar:

Ferreira et al. (2004), analisaram as formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania amazonensis* na presença de extratos brutos de *Aspidosperma ramiflorum*, que se mostrou mais efetivo contra a espécie de *L. amazonensis*.

Luize et al. (2005), observaram a atividade de extratos hidroalcoólicos de 19 plantas medicinais, entre elas: *Piper regnellii* (“pariparoba”), *Cymbopogon citratus* (“capim limão”), *Matricaria chamomilla* (camomila), *Tanacetum parthenium* (“tanaceto”), *Tanacetum vulgare* (“erva dos vermes”), em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi*. Produtos naturais como alcalóides, terpenos, quinonas e polifenóis se mostraram com potencial para inibição do crescimento dos parasitos, sendo mais ativo na *L. amazonensis*.

Menna-Barreto et al. (2005), analisaram o efeito de derivados de β -lapachone, extraído

de *Tabebuia* sp em *T. cruzi* e a atividade em suas organelas. Um dos derivados, N1, se mostrou ativo contra tripomastigotas em sangue, além de inibir a proliferação de epimastigotas e formas extra e intracelular de amastigotas. Também foi observada a condensação anormal de cromatina e danos mitocondriais.

Mesquita et al. (2005) utilizando plantas do cerrado brasileiro, *Annona crassiflora* (“araticum do cerrado”), *Duguetia furfuracea* (“araticum seco”), *Casearia sylvestris* (“erva-de-lagarto”), *Matayba guianensis* (“camboatá”), entre outras, observaram por testes colorimétricos (MTT) as atividades tripanocida (tripomastigotas), leishmanicida (promastigotas) e citotoxicidade em células de mamíferos de extratos brutos hexânicos e etanólicos. A maior atividade em *Leishmania donavani* foi encontrada no extrato hexânico de *C. sylvestris* e no extrato etanólico de *A. crassiflora*. Para *T. cruzi*, os melhores resultados foram encontrados com extrato hexânico de *C. sylvestris*.

Truiti et al. (2005), analisaram a atividade antiprotozoários e mulicidas de *Cayaponia podantha* (“taiuiá”), *Helicteres gardneriana* (“sacarrolha”), *Melochia arenosa* (“malva”), *Nectandra falcifolia* (“canelinha”), *Paullinia elegans* (“cipó-timbó”). Dessas, o extrato da planta *N. falcifolia* foi o que apresentou o melhor resultado quanto à atividade leishmanicida. Extratos etanólicos de *C. podantha* e *M. arenosa* inibiram o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* em concentrações muito baixas (10µg/mL). Os melhores resultados encontrados em termos de atividade mulicida foi o dos extratos etanólicos de *M. arenosa*.

Schinor et al. (2006), analisaram a atividade leishmanicida (amastigotas), tripanocida (tripomastigota) e antimicrobiana de extratos brutos de *Chresta exsucca*. Em *T. cruzi*, o extrato hexânico não apresentou nenhuma atividade até a concentração de 4000mg/mL, enquanto que os extratos diclorometânicos e os etanólicos reduziram a viabilidade dos parasitas em 46,7 e 49,2% respectivamente. Por outro lado, na presença de *L. amazonensis*, os três extratos apresentaram uma redução na viabilidade dos parasitos.

Felippe et al. (2008) analisaram a atividade tripanocida de cinco lignanas extraídas de *P. blanda*. Todas apresentaram uma boa atividade tripanocida, sendo que a lignana com dois grupos metilenodioxifenil foi mais ativa que as outras lignanas com um grupo ou nenhum. Na mesma linha de pesquisa, Batista Jr. et al. (2008) observaram a atividade de cromenos e seus derivados de *Piper gaudichaudianum* (que apresentou a melhor atividade, com IC₅₀ de 2,82 µM) e *Piper aduncum* também frente ao *T. cruzi*.

Dentre as diversas substâncias isoladas das espécies da flora brasileira com atividade tripanocida, em uma revisão, encontrou-se as quinonas da família Bignoniaceae e da Euphorbiaceae, os flavonóides da família Asteraceae, os alcalóides das Piperaceae,

Menispermaceae e Rutaceae, os terpenos das famílias da Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Taxaceae, as lignanas e neolignanas da família Piperaceae, as xantonas e as benzofuranodionas (Saúde-Guimarães & Faria 2007).

1.10) Família Piperaceae

A Família Piperaceae, que está incluída entre as angiospermas basais e são encontradas nos trópicos como plantas pioneiras, tem sido o sujeito de numerosas investigações fitoquímicas (Felippe et al., 2008). As diversas espécies podem apresentar hábito arbustivo, arbóreo ou herbáceo, crescendo geralmente no interior ou na margem de formações florestais.

A maioria das classes descritas inclui fenilpropanóides (Orjala et al., 1993), lignanas e neolignanas (Monache & Compagnone 1996; Parmar et al., 1997; Benevides et al., 1999; Martins et al., 2003), pironas (Singh 1992), amidas alifáticas e aromáticas (Alécio et al., 1998; Navickiene et al., 2000; Silva et al., 2002), alcalóides (Dodson et al., 2000), policetídeos (Cheng et al., 2003), derivados de ácidos benzóicos (Bergamo et al., 2005; Morandim et al., 2005) e cromenos (Moreira et al., 1998; Baldoqui et al., 1999; Morandim et al., 2005).

De acordo com Jaramillo et al. (2004), a Família Piperaceae compreende 4 gêneros, *Piper*, *Peperomia*, *Manekia* (antigamente *Sarcorrhachis*), e *Zippelia* (Wanke et al., 2007). *Piper* e *Peperomia* representam os mais importantes gêneros da família Piperaceae, com 2000 (Quijano-Abril et al., 2006) e 1700 (Wanke et al., 2006) espécies respectivamente.

Economicamente, a Piperaceae é empregada para a produção de pimenta no mercado de condimentos de todo o mundo.

1.11) Gênero *Piper*

Com diferentes espécies amplamente distribuídas em regiões subtropicais e tropicais do mundo, o gênero *Piper* é uma das mais diversas linhagens entre as angiospermas (Parmar et al., 1997; Jaramillo & Manos 2001). Membros do gênero *Piper* são de importância comercial, econômica e medicinal.

As plantas do gênero *Piper* têm sido utilizadas para muitas aplicações, incluindo remédios da medicina tradicional da China, Índia (sistema Ayurvédico) e na América Latina (Ma et al., 2004).

Apenas 12% de espécies do gênero *Piper* foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico (Parmar et al., 1997), as quais apresentaram uma grande variedade de metabólitos secundários, como neolignanas, alcalóides, lignanas, lactonas, chalconas, fenilpropanóides, amidas, flavonóides e óleos essenciais (Sengupta & Rey 1987; Benevides et al., 1999; Ahmad

& Tawan 2002; Ma et al., 2004).

Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina popular e, dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas as atividades tripanocidas das *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum* (Batista Jr. et al., 2008), leishmanicida de *P. rangellii* (Luize et al., 2005); antifúngica de *P. regnellii* (Pessini et al., 2005), *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. tuberculatum* (Navickiene et al., 2006); inseticida de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* (Fazolin et al., 2005; Estrela et al., 2006), entre outras.

1.12) Gênero *Peperomia*

Algumas espécies e variedades de *Peperomia* são usadas como plantas ornamentais e também na medicina popular, para os mais variados tipos de doenças.

Dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas algumas espécies como, *P. glabella*, utilizada na medicina popular como antiasmática (Chen et al., 1989; Monache & Compagnone 1996), *P. dindygulensis* (Wu et al., 2006) e *P. duclouxii* (Li et al., 2006) como antitumorais, *P. vulcânica*, utilizada na medicina popular para tratamento de esterilidade (Mbah et al., 2002), *P. blanda* como tripanocida (Felippe et al., 2008), entre outras.

1.13) Atividade tripanocida

Até a algum tempo, para o rastreamento de novas substâncias tripanocidas, era necessário um processo de contagem de parasitos ao microscópio, demandando grande tempo, trabalho de laboratório intenso e a presença de um observador único (Muelas-Serrano et al., 2000). Dessa forma, novas metodologias de investigação vêm surgindo, principalmente, os métodos colorimétricos.

Pode-se citar, por exemplo, a redução do sal tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, *formazan*, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta et al., 2005). Esse produto colorido, determinado espectrofotometricamente a 595 nm, depois de dissolvido os cristais em dimetil sulfóxido de sódio, será proporcional à atividade metabólica das células observadas ou a viabilidade dessas em cultura (Sieuwerts et al., 1995). Esta técnica é de fácil e rápida aplicação, além de ser bastante objetiva e de possibilitar o teste de diversas substâncias simultaneamente (Muelas-Serrano et al., 2000).

Essa metodologia já foi realizada algumas vezes e obtiveram sucesso em células de mamíferos e alguns protozoários, como as formas promastigotas (Berg et al., 1994) e

amastigotas de *Leishmania* (Serenio & Lemesre 1997); forma tripomastigota de *Trypanosoma brucei* (Ellis et al., 1993); *Entamoeba histolytica* (Cedillo-Rivera et al., 1992); trofozoítos de *Giardia duodenalis* (Ponce-Macotela et al., 1994); *Tetrahymena pyriformis* (Hegyesi & Csaba 1997) e epimastigotas de *T. cruzi* (Muelas-Serrano et al., 2000).

Além do sucesso encontrado em algumas substâncias tripanocidas, é importante analisar onde exatamente essa poderá atuar. Algumas apresentam como ação principal, reduzir a alimentação do parasito no citosol de eritrócitos do hospedeiro, como aquelas que tem atividade sobre plasmódios. Outras, como por exemplo, as diamidinas aromáticas se associam de modo não-covalente e não-intercalante à fenda menor do DNA (em sítios ricos em AT). Outras substâncias ainda inibem a síntese de ácidos nucleicos nos tripanosomas, pela intercalação entre os pares de base do DNA (Ginsburg & Krugliak 1992).

Essa intercalação no DNA já foi observada em algumas substâncias, como por exemplo, a esquizontocidal 4-aminoquinolina para malária (Ginsburg & Krugliak 1992) e dois tripanocidas fenantridina: ISM (*isometamidium chloride hydrochloride*) e EBr (*ethidium bromide*) para *T. brucei* (Boibessot et al., 2002).

A substância isolada da *Tabebuia* sp. (ipê) – β -lapachona - testada em epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* apresentou alterações na morfologia e estrutura dos parasitos, incluindo retração do corpo, ou achatamento flagelar. Além disso, pode-se observar aumento do tamanho das mitocôndrias, desorganização dos vacúolos e condensação anormal das cromatinas (Menna-Barreto et al., 2005).

1.14) Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos

Os macrófagos são um dos primeiros componentes do sistema imunológico e as primeiras células a serem ativadas para participarem de uma resposta imunológica propriamente dita quando o organismo é confrontado por fatores exógenos, como por exemplo, bactérias, vírus, venenos e células cancerígenas (Hampton et al., 1998). São eles também uma das primeiras células a serem invadidas por *T. cruzi* (Carneiro 1963, Rey 2001).

As técnicas utilizadas na determinação da citotoxicidade de um agente químico normalmente avaliam viabilidade ou condições funcionais celulares. Testes colorimétricos versáteis e quantitativos foram idealizados utilizando leitores de ELISA (espectrofotômetro multicanais) que medem um grande número de substâncias com alto grau de precisão. Esses testes utilizam um substrato incolor, que é modificado para produto corado pelas células vivas, mas não por células mortas ou através de uma modificação em constituintes de meio de cultivo (Barile et al., 1994).

A técnica colorimétrica do MTT, desenvolvida por Mosmann em 1983, também tem sido muito empregada na avaliação *in vitro* de citotoxicidade, utilizando macrófagos de camundongos endogâmicos (Ferrari et al., 1990; Hoft et al., 1993), que após aproximadamente 20 gerações, apresentam seqüências de ácidos nucleicos idênticas em qualquer parte de seus cromossomos. Ou seja, camundongos endogâmicos ou isogênicos são homozigotos em todos os locus genéticos e toda linhagem é geneticamente idêntica (singênica) a qualquer outro camundongo da mesma linhagem (Abbas et al., 1995).

Diferentes cepas (linhagens) de camundongos isogênicos podem apresentar variações quanto à susceptibilidade ao *T. cruzi*. Camundongos Balb/c são relativamente susceptíveis a infecção pelo parasito, desenvolvendo uma alta parasitemia que pode levar à mortalidade em larga escala após a infecção. Neste grupo, também se encontram os camundongos C3H/HeJ e o CBA/N. Por outro lado, alguns camundongos são relativamente resistentes ao *T. cruzi*, como o C57/Black e o DBA/2J (Wrightsmann et al., 1982; Hoft et al., 1993).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivos realizar a padronização do método colorimétrico para a avaliação da atividade tripanocida de diferentes substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae em *T. cruzi*. Aquelas substâncias que apresentaram atividade foram avaliadas em testes de intercalação no DNA, com o intuito de se obter informações sobre algum possível mecanismo de ação, além de verificar modificações morfológicas sofridas pelos parasitos após tratamento com as substâncias, analisados em microscopia de contraste de fase e, finalmente, avaliar a citotoxicidade dessas substâncias em macrófagos de camundongos isogênicos (Balb/c e C57/Black/6, respectivamente, suscetíveis e resistentes à infecção ao *T. cruzi*).

Objetivos

2) OBJETIVOS

- 2.1) Padronizar o método colorimétrico utilizando MTT;
- 2.2) Avaliar, pela mesma metodologia, a atividade tripanocida de substâncias extraídas de plantas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de cepa Y;
- 2.3) Avaliar a atividade tripanocida das substâncias mais ativas da Família Piperaceae nas formas epimastigotas das cepas NCS e Bolívia de *T. cruzi*;
- 2.4) Avaliar a citotoxicidade dessas substâncias, na presença de macrófagos peritoneais das linhagens Balb/c e C57/Black/6 de camundongos isogênicos;
- 2.5) Analisar se ocorre intercalação de alguma substância em DNA circular (plasmídeo) e DNA genômico de *Trypanosoma cruzi*;
- 2.6) Analisar por microscopia de contraste de fase as modificações morfológicas dos parasitos quando na presença de alguma substância;

**Materiais e
Métodos**

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) MATERIAIS

3.1.1) Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Y, NCS e Bolívia.

3.1.2) Extratos, frações e substâncias isoladas da Família Piperaceae

Os extratos, frações e substâncias isoladas foram cedidas pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais) do Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara, em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Maysa Furlan. As substâncias foram enviadas secas e, no momento do uso, dissolvidas em DMSO 100% na concentração desejada.

Na Tabela 1 estão listadas todas as substâncias da Família Piperaceae testadas na cepa Y de *T. cruzi* pelo método colorimétrico, incluindo também a substância controle benzonidazol.

Tabela 1: Extratos, frações e substâncias testadas com a cepa Y de *T. cruzi*

1	Benzonidazol
2	Extrato bruto do caule de <i>Piper aduncum</i>
3	Fração acetato de etila do caule de <i>P. aduncum</i>
4	Fração hexânica do caule de <i>P. aduncum</i>
5	Fração hidroalcoólica do caule de <i>P. aduncum</i>
6	Extrato bruto do fruto de <i>P. aduncum</i>
7	Fração acetato de etila do fruto de <i>P. aduncum</i>
8	Fração hexânica do fruto de <i>P. aduncum</i>
9	Fração hidroalcoólica do fruto de <i>P. aduncum</i>
10	Extrato bruto do caule de <i>Piper arboreum</i>
11	Fração acetato de etila do caule de <i>P. arboreum</i>
12	Fração hexânica do caule de <i>P. arboreum</i>
13	Fração hidroalcoólica do caule de <i>P. arboreum</i>
14	Extrato bruto da folha de <i>P. arboreum</i>
15	Fração acetato de etila da folha de <i>P. arboreum</i>
16	Fração hexânica da folha de <i>P. arboreum</i>
17	Fração hidroalcoólica da folha de <i>P. arboreum</i>
18	Extrato bruto do fruto de <i>P. arboreum</i>
19	Fração acetato de etila do fruto de <i>P. arboreum</i>
20	Fração hexânica do fruto de <i>P. arboreum</i>
21	Fração hidroalcoólica do fruto de <i>P. arboreum</i>
22	Extrato bruto da folha de <i>Piper crassinervium</i>

23	Fração acetato de etila da folha de <i>P. crassinervium</i>
24	Fração hexânica da folha de <i>P. crassinervium</i>
25	Fração hidroalcoólica da folha de <i>P. crassinervium</i>
26	Extrato bruto do fruto de <i>P. crassinervium</i>
27	Fração acetato de etila do fruto de <i>P. crassinervium</i>
28	Fração hexânica do fruto de <i>P. crassinervium</i>
29	Fração hidroalcoólica do fruto de <i>P. crassinervium</i>
30	Extrato bruto etanólico de caule de <i>Piper fuliginum</i>
31	Extrato bruto etanólico de folha de <i>P. fuliginum</i>
32	Fração hexânica da folha de <i>P. fuliginum</i>
33	Fração acetato de etila 2 da folha de <i>P. fuliginum</i>
34	Fração clorofórmio da folha de <i>P. fuliginum</i>
35	Fração hidroalcoólica da folha de <i>P. fuliginum</i>
36	Fração hexânica do fruto de <i>P. fuliginum</i>
37	Fração acetato de etila 2 de fruto de <i>P. fuliginum</i>
38	Fração clorofórmio do fruto de <i>P. fuliginum</i>
39	Fração hidroalcoólica do fruto de <i>P. fuliginum</i>
40	Extrato bruto da folha de <i>Piper gaudichaudianum</i>
41	Fração acetato de etila da folha de <i>P. gaudichaudianum</i>
42	Fração hexânica da folha de <i>P. gaudichaudianum</i>
43	Fração hidroalcoólica da folha de <i>P. gaudichaudianum</i>
44	Extrato bruto do fruto de <i>P. gaudichaudianum</i>
45	Fração acetato de etila do fruto de <i>P. gaudichaudianum</i>
46	Fração hexânica do fruto de <i>P. gaudichaudianum</i>
47	Fração hidroalcoólica do fruto de <i>P. gaudichaudianum</i>
48	Cromeno isolado do caule de <i>P. gaudichaudianum</i>
49	Cromeno do caule de <i>P. gaudichaudianum</i> com modificação estrutural – metilação
50	Extrato bruto do caule de <i>Piper tuberculatum</i>
51	Fração acetato de etila do caule de <i>P. tuberculatum</i>
52	Fração hexânica do caule de <i>P. tuberculatum</i>
53	Extrato bruto da folha de <i>P. tuberculatum</i>
54	Fração acetato de etila da folha de <i>P. tuberculatum</i>
55	Fração hexânica da folha de <i>P. tuberculatum</i>
56	Extrato bruto do fruto de <i>P. tuberculatum</i>
57	Fração acetato de etila do fruto de <i>P. tuberculatum</i>
58	Fração hexânica do fruto de <i>P. tuberculatum</i>
59	Pipltartina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
60	Tetraidropipltartina – Derivado hidrogenado da pipltartina (Substância semi-sintética)
61	Piperina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
62	Diidropiperina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
63	Tetraidropiperina – Derivado hidrogenado da diidropiperina (Substância semi-sintética)
64	4,5-diidropiperlonguminina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
65	Tetraidropiperlonguminina (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
66	Fagaramida (amida) de folha de <i>P. tuberculatum</i>
67	Mistura pipltartina e diidropipltartina (amidas) de <i>P. tuberculatum</i>
68	Mistura pipltartina e cis-pipltartina (amida) de <i>P. tuberculatum</i>
69	Pelitorina (amida) de semente de <i>P. tuberculatum</i>
70	Ácido carboxílico aromático de <i>P. tuberculatum</i>

71	Ácido carboxílico aromático de <i>P. tuberculatum</i>
72	Ácido carboxílico aromático de <i>P. tuberculatum</i>
73	Peperomina (lignana) de <i>Peperomia blanda</i>
74	Peperomina (lignana) de <i>P. blanda</i>
75	Proctoriona C (policetídeo) de <i>P. blanda</i>
76	Extrato bruto etanólico do caule de <i>Peperomia obtusifolia</i>
77	Fração acetato de etila do extrato bruto etanólico do caule de <i>P. obtusifolia</i>
78	Fração acetato de etila do caule de <i>P. obtusifolia</i>
79	Fração hexânica do extrato bruto etanólico do caule de <i>P. obtusifolia</i>
80	Peperobtusina A (cromeno) isolado da fração hexânica do caule de <i>P. obtusifolia</i>
81	Fração hidroalcoólica do extrato bruto etanólico do caule de <i>P. obtusifolia</i>
82	Fração n-butanólica do extrato bruto etanólico do caule de <i>P. obtusifolia</i>
83	Extrato bruto etanólico da folha de <i>P. obtusifolia</i>
84	Fração acetato de etila do extrato bruto etanólico da folha de <i>P. obtusifolia</i>
85	Fração acetato de etila da folha de <i>P. obtusifolia</i>
86	Fração hexânica do extrato bruto etanólico da folha de <i>P. obtusifolia</i>
87	3,4 diidro-5-hidroxi-2,7-dimetil-8 (-2-metil-2-butenil)-2-(4metil-1,3- pentadienil)-2H-1-benzopirano-6- ácido carboxílico (cromeno) da fração hexânica da folha de <i>P. obtusifolia</i>
88	Fração hidroalcoólica do extrato bruto etanólico da folha de <i>P. obtusifolia</i>
89	Fração hexânica acetato de etila da folha de <i>P. obtusifolia</i>
90	Substância pura da fração hexânica de <i>P. obtusifolia</i> , em fase de determinação estrutural
91	Substância pura da fração hexânica de <i>P. obtusifolia</i> , em fase de determinação estrutural
92	Substância pura da fração hexânica de <i>P. obtusifolia</i> , em fase de determinação estrutural
93	Substância pura da fração hexânica de <i>P. obtusifolia</i> , em fase de determinação estrutural
94	Extrato bruto etanólico da folha de <i>Peperomia trineura</i>
95	Fração hexânica do extrato bruto etanólico da folha de <i>P. trineura</i>
96	Fração hexânica partição da folha de <i>P. trineura</i>
97	Fração hidroalcoólica do extrato bruto etanólico da folha de <i>P. trineura</i>

3.1.3) Camundongos isogênicos

Foram utilizados 5 camundongos C57/Black/6 e 8 camundongos Balb/c, fêmeas, com 6 semanas, não infectados por *T. cruzi*, produzidos pelo CEMIB (Biotério Central da UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar).

3.1.4) Meios, Soluções e Reagentes

Para cultivo de *Trypanosoma cruzi*

- Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

NaCl 68,4mM; KCl 5,4mM; Na₂HPO₄ 56,3mM; Dextrose 111mM; *Liver Infusion Broth* 0,3%; *Tryptose* 0,5%; *Haemin* 25mg/L. Água q.s.p 900mL. Incubar a 68°C por 1 hora e acertar o pH para 7,2. Filtrar em membrana de 0,22µm. Adicionar 10% de Soro Fetal

Bovino estéril.

Para cultivo de bactéria

- Meio LB (Luria-Bertani)

Tryptone 1%; *Yeast Extract* 0,5%; NaCl 1%. Autoclavar a 121 °C/ 1 atm por 30 min.

Para método colorimétrico (MTT)

- Solução MTT/PMS

MTT 2,5 mg/mL e PMS 0,22 mg/mL

- Solução 10% (SDS) – HCl 0,01N

Para extração de DNA genômico

- Reagente *DNAzol* (Invitrogen)

Para extração de DNA plasmidial (miniprep)

- Ampicilina [50 ug/ml]

- Solução I: glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM. Autoclavar por 15 min.

- Solução II: NaOH 0,2 M; SDS 1%

- Solução III: Acetato de potássio 3M; Ácido acético glacial 11,5%

- Fenol/Clorofórmio

- Etanol 100% e 70%

- TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM (pH 8,0).

- RNase A 10 mg/mL

Para gel de agarose

- TAE 50X

Tris-base 2 M, Ácido acético glacial 5,7%, EDTA 50mM (pH 8), água q.s.p 100mL. O tampão foi diluído para atingir a concentração de 1X para uso.

- Gel de agarose 1,0%

Dissolver a agarose em tampão TAE 1X, adicionar 1,5µL de brometo de etídio [5mg/mL]. Montar o gel em cuba eletroforética.

Para a reação de intercalação no DNA, a agarose foi gelificada sem brometo de etídio. Depois da corrida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio.

- Dye Front (tampão de amostra)

0,25% Azul de bromofenol; 0,25% Xylene Cianol FF.

- Solução de Brometo de Etídio [5mg/mL]

Para avaliação da citotoxicidade

- Solução de Tioglicolato de Sódio 3%

- Tampão Fosfato Estéril (PBS) 10X

- 80g NaCl

- 2g KCl

- 11,5g Na₂HPO₄

- 2g KH₂PO₄

- Completar para 1L com água destilada

No momento do uso, acertar a concentração para 1X e o pH em 7,2.

- Meio RPMI – 1640 Completo

- 10,4g de RPMI (um envelope) e acrescentar 1L de Água Mili-Q

- 2,38g de HEPES 10mM

- 2g de Bicarbonato de Sódio

Acertar o pH em 7,0 – 7,2.

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

No momento do uso, para cada 1mL de Meio RPMI, adicionar 1µL dos seguintes constituintes:

- Penicilina 100U/mL
- Estreptomicina 100ug/mL
- β-mercaptoetanol 5×10^{-2} M
- Soro Fetal Bovino a 5%

- Estreptomicina 100ug/mL

Fazer a diluição da estreptomicina e esterilizar por filtração.

- Penicilina 100U/mL

Fazer a diluição de 10mg de penicilina para cada 1mL de Água Mili-Q. Esterilizar por filtração.

- β -mercaptoetanol (2-ME) 5×10^{-2} M

Para cada 14,32M de 2-ME (35 μ L), adicionar 9,965mL de Água Mili-Q (Concentração ideal para a técnica de cultura de macrófagos) e esterilizar por filtração.

- Corante vital líquido de Lázarus

- 2mL de Violeta de Genciana 1% (em água destilada)

- 3mL de Ácido Acético Glacial

Água destilada q.s.p. 100mL

- Isopropanol**3.2) MÉTODOS****3.2.1) 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 foram cultivados em meio LIT (Fernandes & Castellani, 1966) a 28 °C, com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório.

Para os testes de atividade tripanocida, utilizou-se culturas na fase log de crescimento (cultura de 7 dias).

3.2.2) Padronização do método colorimétrico utilizando MTT

O teste colorimétrico utilizando MTT foi padronizado por Muelas-Serrano et al. (2000), com formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Para a padronização dessa reação em nosso laboratório, foi utilizada a fração acetato do extrato da folha da planta *Piper tuberculatum* da Família Piperaceae, uma vez que, em prévias contagens, essa substância se mostrou com alta atividade tripanocida. Posteriormente, essa padronização foi confirmada com o benzonidazol.

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, em fluxo laminar.

Após diluições em DMSO, 3 μ L de cada substância (concentrações finais de 100, 50,

25, 10, 5, 2,5 e 1µg/mL, respectivamente), foram adicionados a 97µl de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (fase log). Para os extratos, as concentrações das substâncias extrapolaram até os valores de 200, 300, 400 e 500µg/mL. A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 72 horas.

A seguir, adicionou-se 10µL 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 tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, *formazan*, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta et al., 2005).

O PMS foi utilizado como um carregador intermediário de elétron para o realce do rendimento *formazan* e, a redução do período de incubação (Dutta et al., 2005).

Adicionou-se 100µL da solução 10% SDS-0,01N HCl, para dissolver os cristais de *formazan*, 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 abaixo (Muelas-Serrano et al., 2000).

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

$$G_c = A_c - A_m$$

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

Sendo que, G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controles 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) com parasitos; A_m representa ao valor da 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, um na ausência do parasito para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência desta, mas contendo parasitos.

Durante a padronização da técnica, preparou-se uma placa com diferentes concentrações de parasitos na fase log de crescimento – 5×10^6 parasitos/mL, 8×10^6 parasitos/mL, 1×10^7 parasitos/mL – na presença das diferentes concentrações da substância, para escolha da concentração ideal de parasitos capaz de ser detectada por esta metodologia.

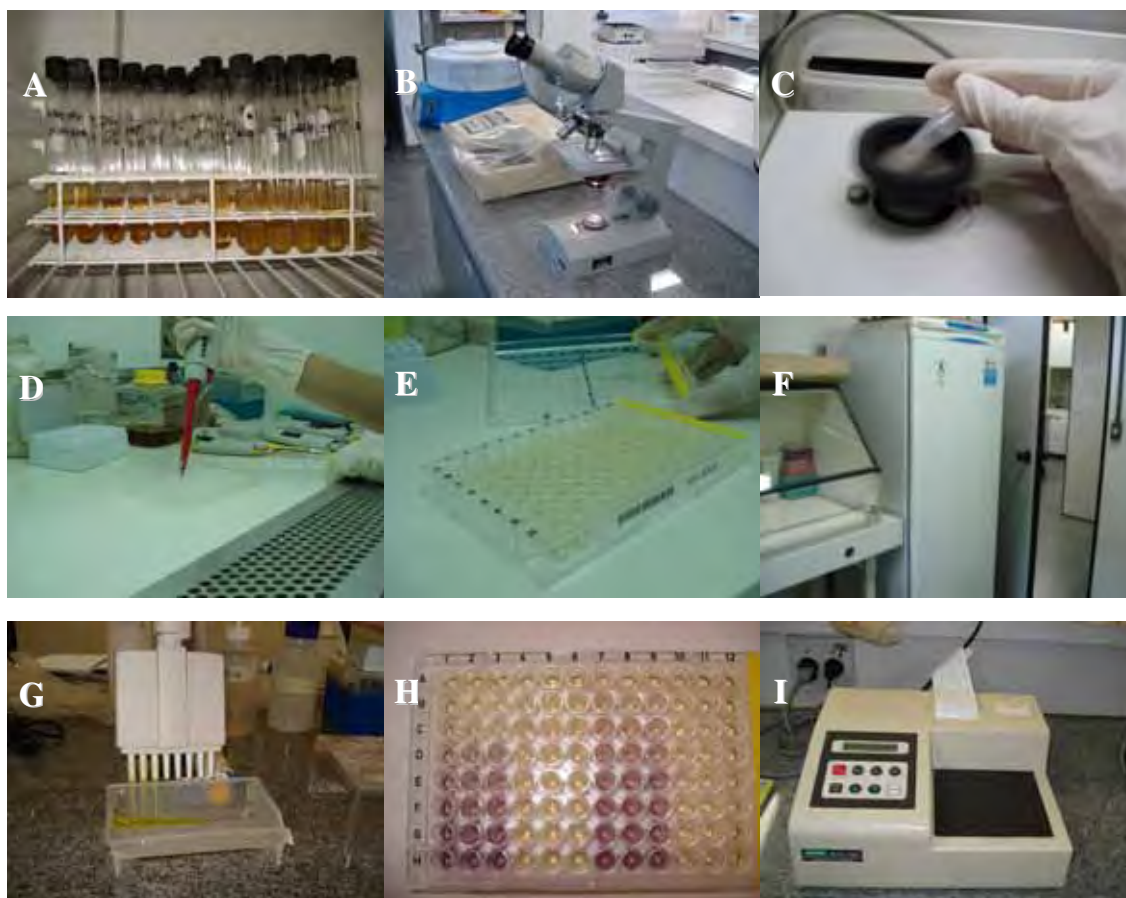


Figura 4: Teste colorimétrico (MTT). **A**-Meio LIT com forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*; **B**-Microscópio para contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer; **C**-Homogeneização das substâncias em DMSO; **D**-Diluição das substâncias; **E**-Montagem da placa (parasito + substância); **F**-Incubação da placa de 96 poços por 72 horas em BOD; **G**-Aplicação do MTT/PMS; **H**-Visualização final da placa após a adição de SDS-HCl; **I**-Leitura da absorbância no espectrofotômetro (Leitor de placa de ELISA).

Arquivo pessoal

3.2.3) Confirmação da sensibilidade do método

Paralelamente, foi montada outra placa idêntica para a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para a confirmação da sensibilidade do método colorimétrico.

Para a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer foi feita uma diluição de 1:20, em meio LIT, que também foi realizada em triplicata, fazendo-se a média, para o cálculo da porcentagem de parasitos mortos (%C) e comparação com o método colorimétrico. Para a isso, foi utilizada a equação a seguir:

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

Sendo T a média do número de parasitos contados em cada concentração do teste em triplicata e C a média do número de parasitos contado na triplicata do controle.

Os resultados foram plotados em gráfico no Microsoft Excel 2000, onde as curvas se mantiveram dentro do desvio padrão.

3.2.4) Avaliação da atividade tripanocida de substâncias extraídas de plantas

Após a padronização (verificação de sensibilidade e reprodutibilidade), outros extratos brutos, frações, substâncias puras e semi-sintéticas da Família Piperaceae, além do benzonidazol, foram testados pelo método colorimétrico do MTT na cepa Y.

As substâncias que se mostraram mais ativas (IC_{50} próximo ao do benzonidazol – 9,01 $\mu\text{g/mL}$) foram testadas também nas cepas NCS e Bolívia.

O IC_{50} de cada substância analisada foi determinado por regressão linear.

3.2.5) Determinação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo

Camundongos (Balb/c e C57/Black/6) foram inoculados, intraperitonealmente, com 3mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Três dias após, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 . Após a morte e exposição do peritônio, abrindo-se a pele do animal, injetou-se 5mL 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 200g durante 5 min. à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 Completo (RPMI - 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 5×10^{-2} M de β -mercaptoetanol).

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 de citotoxicidade.

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 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Como controle foi utilizado o mesmo volume de RPMI Completo.

A incubação da placa foi feita durante 24 horas (37 °C, 7,5% de CO_2). 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 CO_2). Após a incubação, retirou-se 100 μL do sobrenadante e

adicionou-se 100µL de isopropanol para solubilizar os cristais de *formazan*.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540nm (Leitor de ELISA – BioRad).

Essas análises foram realizadas em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros do Departamento de Ciências Biológicas - FCF - UNESP - Campus Araraquara, SP.

3.2.6) Cálculo do índice de citotoxicidade (IC₅₀)

50% da concentração inibitória das substâncias (IC₅₀), isto é, concentrações dos agentes que reduz em 50% a viabilidade celular tanto dos parasitos quanto dos macrófagos, foram quantificadas graficamente a partir de uma curva dose-resposta (concentração versus viabilidade celular), obtida através de análise de regressão linear com limite de confiança próximo a 95% e o IC₅₀ definido através de equação da reta gerada (software Origin 7.0).

3.2.7) Cálculo do *Safety index* (Si)

Baseado nos resultados de IC₅₀ dos macrófagos (1) e dos parasitos (2), a relação IC₅₀ 1/ IC₅₀ 2 foi calculada para cada uma das substâncias. Essa relação é conhecida como *Safety index* (índice de segurança) (Largeron et al., 1999).

3.2.8) Extração de DNA genômico

O DNA de uma cultura de 50mL de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em meio LIT (10⁸ – 10⁹ parasitos/mL) foi extraído com o reagente *DNAzol* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. A quantidade de DNA genômico presente na solução foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1,0%) com 1,5µL de brometo de etídio. Para tanto, 3µL (100ng/µL) do DNA com 1,5µL de Dye Front, foram aplicados no gel. Para a quantificação, utilizou-se 2µL de Low DNA Mass Ladder. Após a corrida, em tampão TAE 1X, a imagem do gel foi capturada através de um sistema de fotodocumentação (Multi-Analyst - Bio Rad).

3.2.9) Extração de DNA plasmidial (miniprep)

As bactérias recombinantes foram repicadas em 5mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, “overnight”, sob agitação.

A cultura de 5mL foi centrifugada a 16.000g, 4 °C por 2 min. Removeu-se o

sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão em 100µL da Solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA). Depois de ressuspender em vórtex, incubou-se por 5 min. a temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL da Solução II (0,2 M NaOH; 1% SDS), misturou por inversão 5X e incubou a temperatura ambiente por 10 min. 150µL da Solução III (3M acetato de potássio; 11,5% ácido acético glacial) foi adicionada, homogeneizando através de inversão e incubou-se por 5 min. em gelo.

Os tubos foram centrifugados a 16.000g por 10 min. a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Adicionou-se 1mL de etanol 100% gelado ao sedimento e incubou-se por 10 min. a – 80 °C. Centrifugou-se por 10 min. a 4 °C, 16.000g. Em seguida, o sedimento foi lavado com 500µL de etanol 70% gelado, centrifugando a 4°C por 5 min., 16.000g.

O sedimento foi seco a vácuo e ressuspensão em 98µL de TE e 2µL de RNase A 10 mg/mL. Incubou-se a 37 °C por 1 hora.

As amostras foram extraídas com 100µL de fenol/clorofórmio, centrifugando por 5 min., 14.000rpm a temperatura ambiente. A fase superior foi retirada e colocada em um novo tubo.

Adicionou-se 40µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 300µL de etanol 100% gelado. Homogeneizou-se por inversão e incubou-se por 10min a –80 °C.

Centrifugou-se a 16.000g por 10 min. a 4 °C.

Lavou-se o sedimento com 750µL de etanol 70% gelado, centrifugando por 5 min. a 4 °C, 16.000g.

Secou-se o sedimento a vácuo e esse foi ressuspensão em 45µL de água Mili-Q.

A quantidade de DNA plasmidial presente na solução foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1,0%) com 1,5µL de brometo de etídio. Para tanto, 3µL do DNA com 1,5µL de Dye Front, foram aplicados no gel. Após a corrida, em tampão TAE 1X, a imagem do gel foi capturada através de um sistema de fotodocumentação (Multi-Analyst - Bio Rad).

3.2.10) Intercalação das substâncias no DNA genômico e plasmidial

Para essa análise, selecionaram-se as substâncias com atividade próxima ao benzonidazol, observada pela metodologia do MTT.

Para a reação ocorrer, 5µL do DNA genômico diluído em água Mili-Q (2:3) foi colocado em contato com 5µL de cada substância (concentração final de 166,67µg/mL – diluição já existente em nosso laboratório). A concentração inicial da substância estoque era 16,67µg/mL. Fez-se uma diluição 1:100 para se chegar à concentração utilizada. Incubou-se

por 20 min. a temperatura ambiente.

Como controle positivo, foram utilizados 10µL do DNA genômico diluído em água Mili-Q (1:0,9), sendo 9,5µL desse mesmo DNA misturados com 0,5µL de brometo de etídio, atuando este como um intercalador no DNA. Para o controle negativo, utilizou-se 10µL DNA genômico diluído em água Mili-Q na concentração 1:1.

O mesmo procedimento foi seguido para o DNA plasmidial (circularizado).

As reações foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1,0%). Para tanto, 5µL da mistura com 1,5µL de Dye Front, foram aplicados no gel. Após a corrida, em tampão TAE 1X, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio e a imagem capturada através de um sistema de fotodocumentação (Multi-Analyst - Bio Rad).

3.2.11) Modificações morfológicas dos parasitos

As mesmas substâncias utilizadas na intercalação foram analisadas quanto à atividade sobre a modificação morfológica dos parasitos das cepas Y, NCS e Bolívia e comparadas com os controles (sem substância).

A quantidade das substâncias testada foi a equivalente ao IC₅₀ de cada uma delas, em um volume final de 2mL de meio e concentração de parasitos de 5×10^5 parasitos/mL.

Os tubos foram incubados na estufa BOD e as lâminas convenientemente preparadas analisadas por microscopia de contraste de fase em microscópio Leica - Leitz DMRXE em tempos previamente determinados. Essas análises foram realizadas em colaboração com o grupo do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, do Departamento de Ciências Biológicas – FCF - UNESP - Campus Araraquara, SP.

Esse projeto foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com o parecer nº 16/2008.

Resultados e Discussões

4) RESULTADOS E DISCUSSÕES

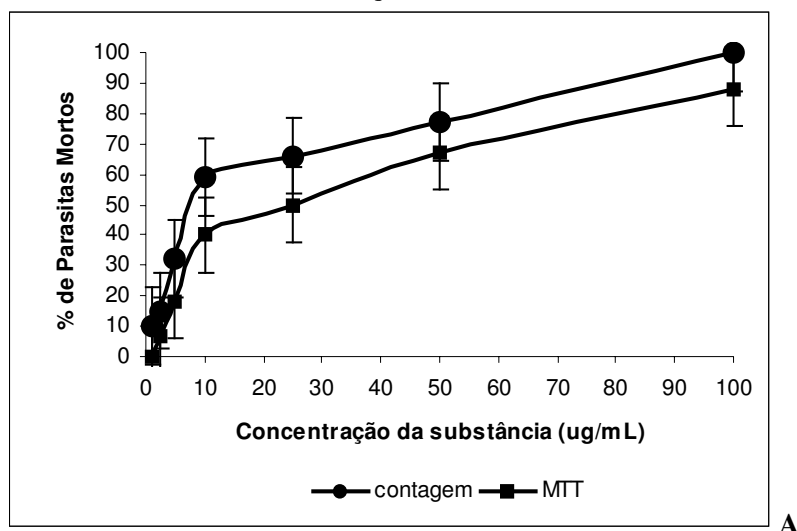
4.1) Padronização do método colorimétrico

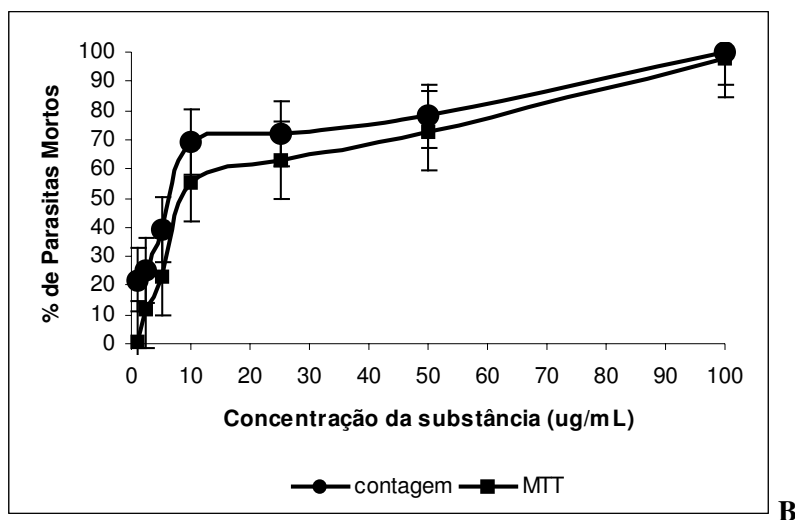
Inicialmente, estabeleceu-se qual a concentração mínima de parasitos necessária para a detecção utilizando o MTT. Para isso, foram testadas diferentes concentrações de parasitos (5×10^6 , 8×10^6 e 1×10^7 parasitos/mL), com diferentes concentrações finais da substância escolhida (fração acetato de etila da folha de *P. tuberculatum* – 100, 50, 25, 10, 5,0, 2,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$).

Observou-se que no ensaio com 1×10^7 parasitos/mL, a porcentagem de parasitos vivos obtida em cada concentração da substância foi diminuindo gradualmente conforme se aumentava sua concentração e não se encontrou nenhuma concentração em que o número de parasitos fosse maior do que no controle. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a concentração 1×10^7 parasitos/mL. O experimento foi repetido e se apresentou reprodutível.

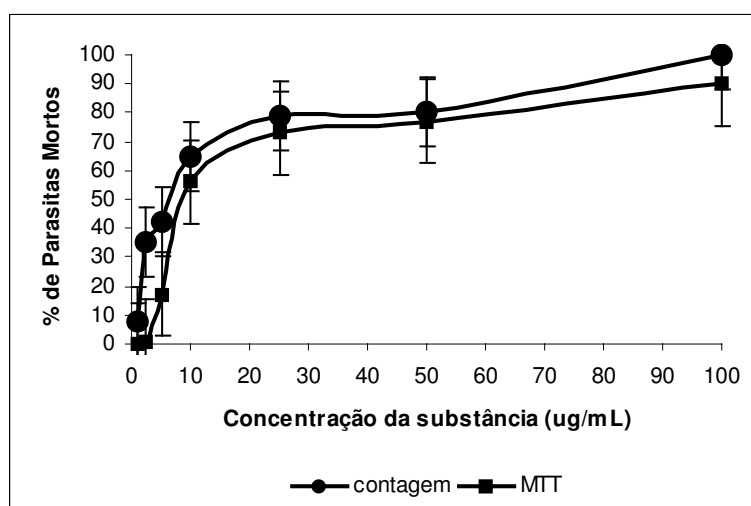
As porcentagens de inibição encontradas foram analisadas através de gráficos para obtenção das curvas de atividade como se pode observar no Gráfico 1 (A, B e C), cujos experimentos foram realizados em diferentes momentos.

Gráfico 1: Curva da porcentagem de parasitos mortos (eixo Y) em relação a diferentes concentrações da substância (eixo X), realizadas em dias diferentes (A, B e C), obtidas por contagem em câmara de Neubauer (círculo) e teste colorimétrico com MTT (quadrado).





B



C

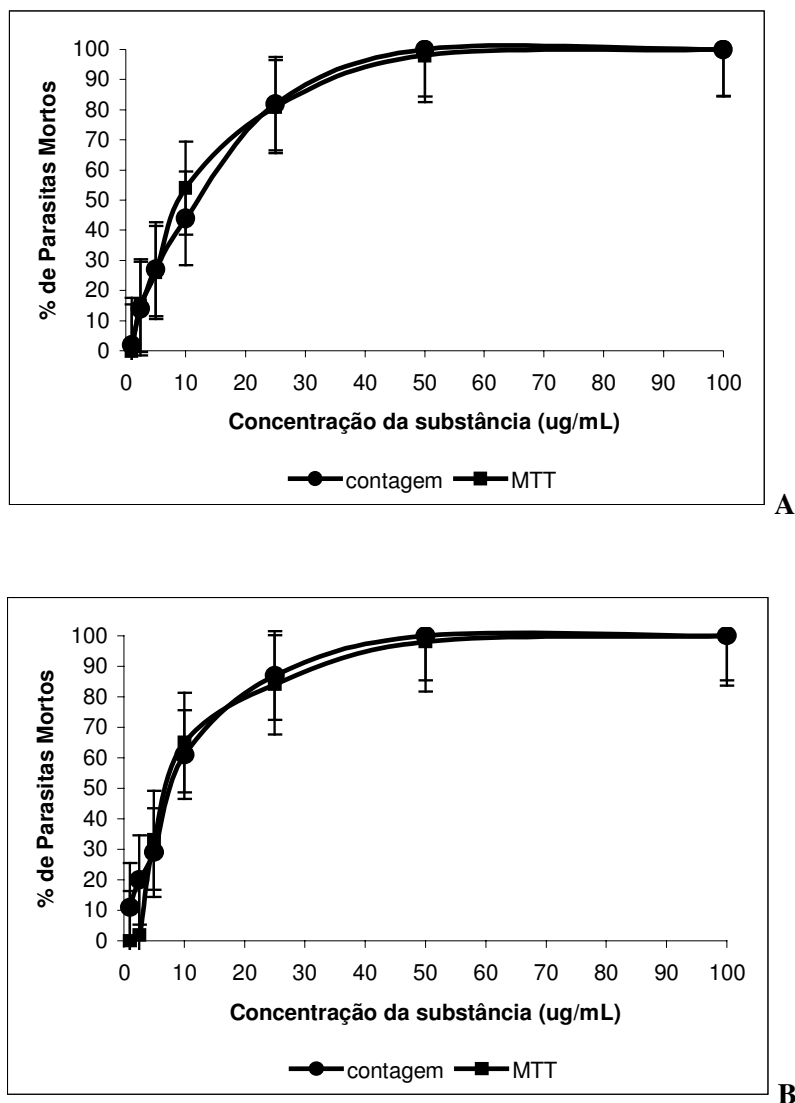
Os resultados obtidos mostraram a reprodutibilidade dos testes por ambos os métodos, contagem e colorimétrico, apresentando uma mesma dose-resposta de citotoxicidade.

Foi observada alguma variação nos valores de porcentagem de parasitos mortos, em relação ao método colorimétrico (MTT), que pode ser explicada pelo erro humano na contagem, ou devido a pequenas variações na preparação das placas e diferenças na sensibilidade de cada um dos métodos. Embora tenha ocorrido esta variação, a mesma não foi significativa; essas variações também foram observadas nas análises realizadas por Muelas-Serrano et al. (2000), utilizando o fármaco benzonidazol comercialmente usado para a terapia da doença de Chagas. Além disso, as curvas se mostraram dentro do desvio padrão.

Para uma maior confiabilidade, a padronização foi repetida com o benzonidazol em

dois momentos diferentes, como se pode observar no Gráfico 2 (A e B).

Gráfico 2: Curva da porcentagem de parasitos mortos (eixo Y) em relação a diferentes concentrações do fármaco (eixo X), realizadas em dias diferentes (A e B), obtidas por contagem em câmara de Neubauer (círculo) e teste colorimétrico com MTT (quadrado).



4.2) Avaliação da atividade tripanocida

Todas as substâncias citadas na Tabela 1 foram avaliadas pelo método colorimétrico (MTT) padronizado frente à forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*.

A atividade tripanocida de cada substância testada pode ser analisada a partir do seu resultado de IC₅₀ (concentração de substância que mata 50% dos parasitos), comparativamente com o resultado do benzonidazol, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Cálculo do IC₅₀ dos extratos, frações e substâncias puras testadas em cepa Y de *T. cruzi*

Substância	IC₅₀ (µg/mL)	Substância	IC₅₀ (µg/mL)	Substância	IC₅₀ (µg/mL)
1	9,01	34	52,29	67	4,54
2	439,39	35	153,19	68	6,76
3	76,62	36	61,84	69	13,28
4	164,99	37	281,15	70	176,78
5	292,52	38	27,84	71	145,37
6	162,53	39	576,36	72	535,07
7	71,76	40	325,96	73	229,45
8	56,56	41	62,69	74	440,13
9	554,94	42	20,03	75	8,32
10	743,92	43	198,13	76	317,91
11	248,97	44	105,26	77	423,89
12	402,38	45	578,92	78	72,55
13	209,07	46	47,10	79	33,30
14	192,45	47	508,85	80	6,45
15	59,78	48	29,86	81	135,00
16	13,15	49	40,21	82	36,68
17	53,46	50	387,35	83	170,65
18	77,24	51	169,78	84	101,45
19	95,15	52	78,57	85	270,00
20	30,30	53	44,65	86	66,75
21	345,48	54	51,31	87	8,64
22	126,37	55	22,20	88	47,87
23	63,45	56	177,44	89	222,51
24	40,38	57	38,78	90	353,19
25	165,19	58	58,31	91	493,57
26	36,79	59	8,71	92	84,34
27	23,04	60	345,47	93	100,00
28	16,60	61	63,39	94	122,65
29	454,93	62	122,50	95	111,09
30	50,60	63	91,24	96	161,72

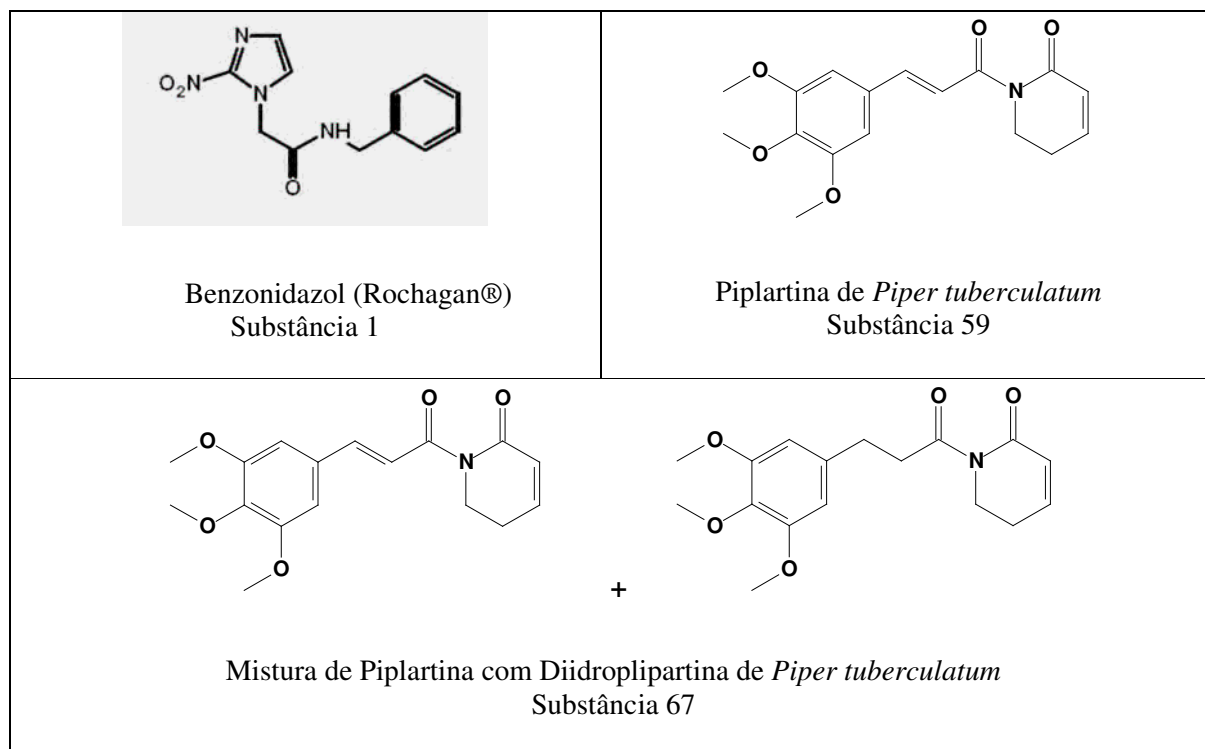
31	32,63	64	85,06	97	618,36
32	73,08	65	306,32		
33	226,81	66	115,29		

Das 96 substâncias (extratos, frações e substâncias puras e semi-sintéticas) da Família Piperaceae testadas, algumas apresentaram um IC_{50} muito próximo ao benzonidazol (substância 1 - 9,01 $\mu\text{g/mL}$), com um valor de no máximo 15,00 $\mu\text{g/mL}$ e outras com um valor menor do que o encontrado no controle.

Das frações e extratos que não apresentaram praticamente nenhuma atividade frente ao *T. cruzi*, destacam-se principalmente as frações hidroalcoólicas de diferentes espécies, além de frações acetato de etila e extratos brutos de caule.

Duas substâncias puras (74 e 91) também não apresentaram nenhuma atividade frente ao *T. cruzi*.

Na figura abaixo estão relacionadas as estruturas moleculares das substâncias puras de *Piper* e *Peperomia* que apresentaram uma alta atividade tripanocida, além do benzonidazol (Figura 5).



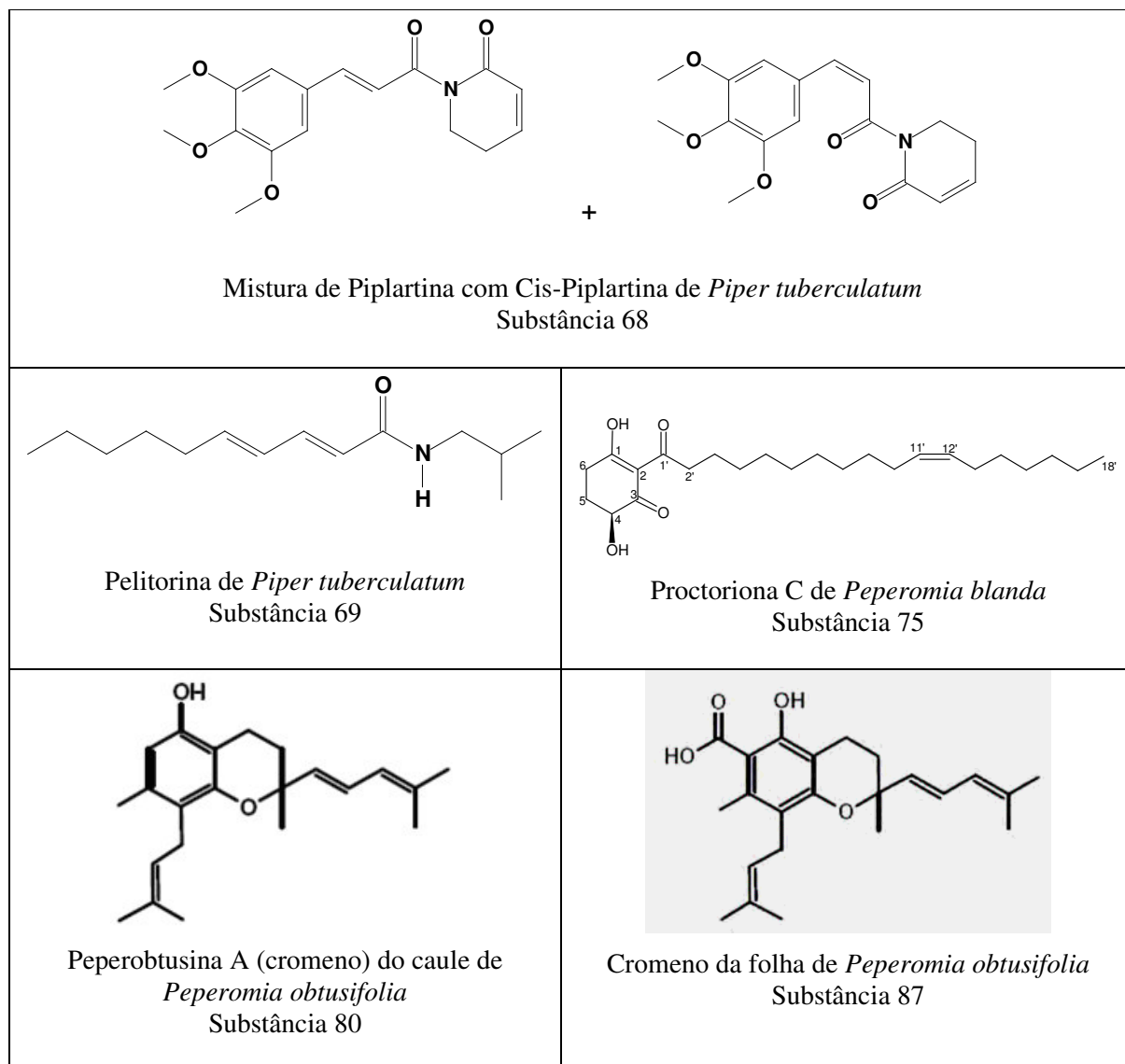


Figura 5: Estruturas moleculares das substâncias puras de *Piper* e *Peperomia* com atividade tripanocida e benzonidazol. Estão assinalados os adutos de Michael (vide texto).

As amidas piplartina, diidropiplartina e cis-piplartina (substâncias 59, 67 e 69) apresentaram uma pronunciada atividade, o que pode estar relacionada com a presença do adutos de Michael, principalmente quando esse se encontra nas extremidades da molécula. A internalização de adutos de Michael em lactonas mostraram-se essenciais para a ação anti-chagásica de estirilpironas naturais, consagrando-se como o grupo farmacofórico desta classe de substâncias (Fátima et al., 2006).

A substância Proctoriona C (75) isolada de *P. blanda* também já foi encontrada em *Peperomia proctorii* (Seeram et al., 2000) e *Peperomia sui* (Cheng et al., 2003), nas quais foram observadas significante citotoxicidade dessa contra células cancerígenas HONE-1 e

NUGC-3 *in vitro*.

Quando se comparam as estruturas moleculares dos cromenos, elas são praticamente idênticas, com exceção de uma ligação de um grupo carboxila, o que deixou a molécula com uma atividade tripanocida um pouco mais baixa.

As substâncias puras com atividade tripanocida, além do benzonidazol e da fração hexânica da folha de *P. arboreum* (substância 16) foram testadas pelo método colorimétrico do MTT e o IC₅₀ calculado por regressão linear (software Origin 7.0), também com as cepas NCS e Bolívia, como observado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Resultados de IC₅₀ das substâncias testadas nas cepas NCS e Bolívia de *T. cruzi*

Substância	IC ₅₀ (µg/mL) NCS	IC ₅₀ (µg/mL) Bolívia
1	16,40	25,00
16	14,91	74,77
59	7,45	6,65
67	13,48	7,76
68	8,90	8,34
69	25,09	18,09
75	16,21	14,58
80	7,15	7,22
87	21,30	22,72

Na Tabela 4, estão comparados os valores de IC₅₀ calculados para as três cepas.

Tabela 4: Resultados de IC₅₀ das substâncias testadas nas cepas Y, NCS e Bolívia

Substância	IC ₅₀ - Y		IC ₅₀ - NCS		IC ₅₀ - Bolívia	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
1	9,01	34,62	16,40	63,01	25,00	96,06
16	13,15	ND	14,91	ND	74,77	ND
59	8,71	27,45	7,45	23,48	6,65	20,95
67	4,54	ND	13,48	ND	7,76	ND
68	6,76	21,30	8,90	28,04	8,34	26,28

69	13,28	60,04	25,09	112,84	18,09	81,36
75	8,32	18,30	16,21	41,40	14,58	37,24
80	6,45	19,76	7,15	21,90	7,22	22,12
87	8,64	23,32	21,30	57,49	22,72	61,33

ND – Não Determinado

Nenhuma relação comparativa quanto ao IC₅₀ encontrado para as espécies testadas ou a região de extração da planta foi possível ser feita para as diferentes cepas. No entanto, as substâncias que apresentaram IC₅₀ mais baixo, inclusive algumas menores que o controle benzonidazol, foram de substâncias puras, principalmente amidas e cromenos.

Devido ao fato da substância 16 ser uma fração, não foi possível calcular sua molaridade. A molaridade da substância 67 também não foi calculada por ser uma mistura e não se saber a concentração de cada uma das substâncias componentes. Já a 68, apesar de ser também mistura, foi possível se calcular sua molaridade, pois as substâncias presentes possuem a mesma molécula com diferentes estruturas.

As substâncias 59 e 68 (amidas), 75 (policetídeo) e 80 (cromeno) apresentaram uma atividade muito próxima quanto comparada as cepas NCS e Bolívia.

As substâncias testadas apresentaram uma maior atividade, quando comparados o IC₅₀, na cepa Y e uma atividade menor na cepa Bolívia, inclusive o controle, benzonidazol (Tabela 4, substância 1). A fração hexânica da folha de *P. arboreum* (substância 16) apresentou resultado muito diferente quando comparado as outras substâncias na cepa Bolívia, com um IC₅₀ muito maior do que o encontrado em todas as outras substâncias nas três cepas.

Isto pode ser devido às características diferentes entre as cepas e sua resposta a ação da substância testada, apresentando-se os parasitos mais resistentes à ação de algumas substâncias do que de outras. Entretanto, mais estudos serão necessários para avaliar melhor esses resultados.

4.3) Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade verificou-se que tanto os camundongos Balb/c (mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*), quanto os C57/Black/6 (resistentes ao *T. cruzi*), apresentaram padrões distintos de resposta frente às substâncias.

Os valores de IC₅₀ para os macrófagos após 24 horas de exposição às substâncias estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: IC₅₀ das substâncias em macrófagos de camundongos Balb/c e C57/Black/6

Substâncias	IC ₅₀ Balb/c		IC ₅₀ C57 Black/6	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
1	296,55	1139,48	116,49	447,61
16	160,01	ND	138,29	ND
59	97,04	305,79	42,09	132,63
67	100,03	ND	47,23	ND
68	104,40	328,98	65,39	206,06
75	161,17	411,62	126,83	323,92
80	130,48	399,68	68,83	210,84
87	149,24	402,84	109,45	335,26

ND – Não Determinado

Todas as substâncias testadas, inclusive o benzonidazol, se mostraram mais tóxicas para os macrófagos de C57/Black/6.

A substância 59 (piplartina) foi a que apresentou maior citotoxicidade para os macrófagos das duas linhagens de camundongos, seguido das substâncias 67 (mistura piplartina e diidropiplartina) e 68 (mistura piplartina e cis-piplartina), todas amidas de *P. tuberculum*.

Os cromenos de *P. obtusifolia* (substâncias 80 e 87) também apresentaram citotoxicidade para duas linhagens de camundongos, sendo que a primeira se mostrou mais tóxica.

As substâncias 75 (proctoriona C), 16 (fração hexânica da folha de *P. arboreum*) e o benzonidazol (1) apresentaram um padrão de atividade relativamente semelhante, apresentando-se como as substâncias menos tóxicas para os macrófagos.

A substância 69 não foi analisada porque não foi possível conseguir massa suficiente para os experimentos.

Devido ao fato da substância 16 ser uma fração, não foi possível calcular sua molaridade. A molaridade da substância 67 também não foi calculada por ser uma mistura e não se saber a concentração de cada uma das substâncias componentes. Já a 68, apesar de ser também mistura, foi possível se calcular sua molaridade, pois as substâncias presentes possuem a mesma molécula com diferentes estruturas.

Estes resultados demonstram que os macrófagos de camundongos mais resistentes à

infecção crônica pelo *T. cruzi* (C57/Black/6) foram os mais sensíveis à atividade tóxica das substâncias testadas, sem que se tenha, até o momento, uma explicação adequada para essa constatação. Maiores estudos serão necessários para melhor compreensão desses achados.

Tabela 6: Cálculo do Si (*Safety index*)

	Substâncias	Balb/c	C57/Black/6
Cepa Y	1	32,91	12,93
	16	12,17	10,52
	59	11,14	4,83
	67	22,03	10,40
	68	15,44	9,67
	69	-	-
	75	19,37	15,24
	80	20,23	10,67
	87	17,27	12,67
Cepa NCS	1	18,08	7,10
	16	10,73	9,27
	59	13,02	5,65
	67	7,42	3,50
	68	11,73	7,35
	69	-	-
	75	19,94	7,82
	80	18,25	9,63
	87	7,01	5,14
Cepa Bolívia	1	11,86	4,66
	16	2,14	1,85
	59	14,59	6,33
	67	12,89	6,09
	68	12,52	7,84
	69	-	-
	75	11,05	8,70
	80	18,07	9,53
	87	6,57	4,82

Os índices de segurança (*Safety index*) das substâncias da Família Piperaceae e do controle benzonidazol foram calculados relativamente à atividade tripanocida. Índices com valores maiores que 10 sugerem que o uso da substância pode ser considerado seguro e interessante para a realização de novos testes.

Desse modo, para os camundongos da linhagem C57/Black/6, quando testados com as cepas NCS e Bolívia, todas as substâncias, inclusive o benzonidazol, podem ser consideradas tóxicas. Diferentemente, com a cepa Y, apenas as substâncias 59 e 68 apresentaram um valor menor que 10, sugerindo toxicidade. Entretanto, as outras substâncias podem ser promissoras, pois apresentaram Si acima de 10.

Em relação aos camundongos da linhagem Balb/c, nenhuma substância apresentou-se tóxica com a cepa Y. Por outro lado, com a cepa NCS, somente as substâncias 67 e 87 mostraram-se tóxicas, enquanto que com a cepa Bolívia, as substâncias 16 e 87 foram mais tóxicas.

Embora ainda preliminares, estes dados sugerem que várias moléculas poderão ser avaliadas para atividade tripanocida. Mais estudos dessa natureza deverá ser realizado utilizando as outras formas do *Trypanosoma cruzi*.

4.4) Extração de DNA genômico

Seguindo as especificações do fabricante, o DNA genômico das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen).

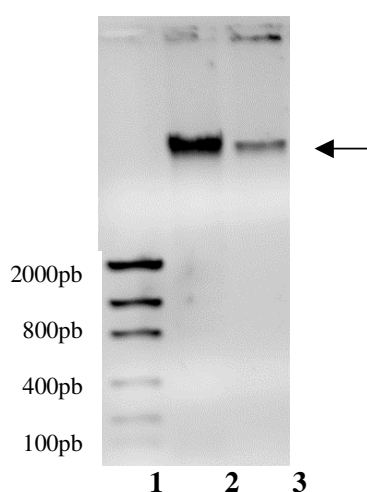
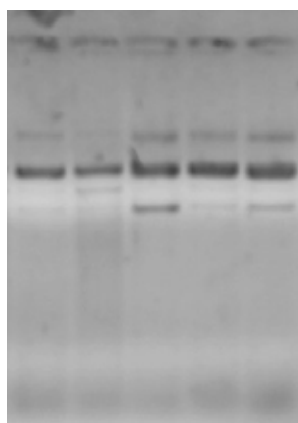


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio. 1 – Low DNA Mass Ladder (2000pb – 100ng); 2 – Extração de DNA genômico de *T. cruzi* (cepa Y) pelo reagente DNAzol (Invitrogen); 3 - Controle positivo (DNA genômico previamente extraído).

4.5) Extração de DNA plasmidial (pGEM-T)

Realizou-se miniprep de cinco culturas diferentes de bactérias.

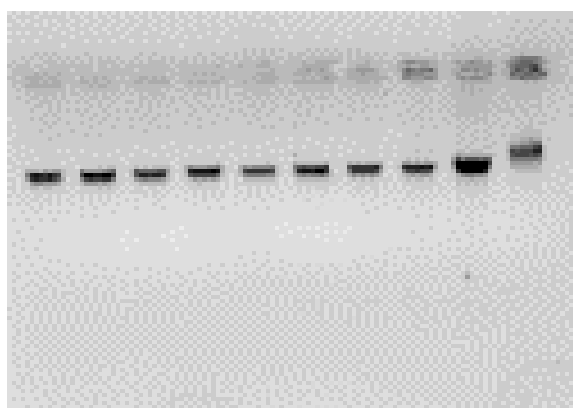


1 2 3 4 5

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio. 1-5 - Extração de DNA plasmidial de diferentes culturas.

4.6) Intercalação das substâncias no DNA genômico e circular

Para a observação da intercalação nos DNAs genômico e plasmidial, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,0% com as substâncias que apresentaram uma atividade tripanocida alta quando comprada ao benzonidazol. Nesse experimento, também se observou o comportamento do benzonidazol frente aos DNAs, além dos controles positivo e negativo, como mostrado nas Figuras 8 e 9.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de DNA genômico da cepa Y de *T. cruzi* incubados com diferentes substâncias (ver Material e Métodos).

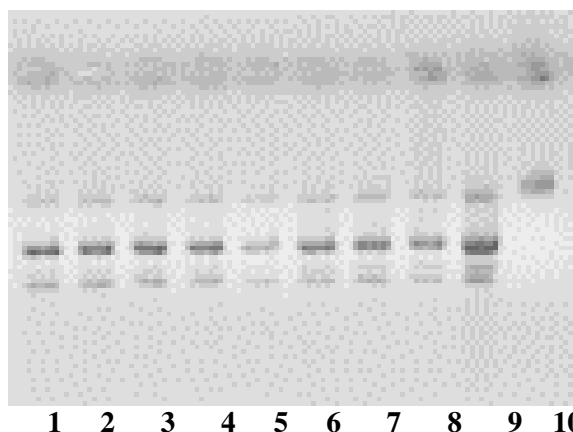


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de DNA plasmidial da cepa Y de *T. cruzi* incubados com diferentes substâncias (ver Material e Métodos).

Legenda das Figuras 8 e 9:

- 1) Benzonidazol (1)
- 2) Piplartina (amida) de folha de *P. tuberculatum* (59)
- 3) Mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *P. tuberculatum* (67)
- 4) Mistura de piplartina e cis-piplartina (amida) de *P. tuberculatum* (68)
- 5) Pelitorina (amida) da semente de *P. tuberculatum* (69)
- 6) Proctoriona C (policetídeo) de *P. blanda* (75)
- 7) Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de *P. obtusifolia* (80)
- 8) Cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia* (87)
- 9) Controle negativo: DNA genômico ou DNA plasmidial + Água
- 10) Controle positivo: DNA genômico ou DNA plasmidial + Brometo de Etídio

Nos controles com brometo de etídio (controles positivos), observou-se que a corrida foi mais lenta tanto para o DNA genômico quanto para o plasmidial, uma vez que o brometo atua como um intercalador no DNA. Também pode ser observada para os dois DNAs uma pequena quantidade retida no poço.

O cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia* (87) (canaleta 8 nas duas figuras) também mostrou uma retenção do DNA no poço, tanto no DNA genômico (Fig. 7) como plasmidial (Fig. 8), sugerindo uma intercalação nas fitas de DNA.

A fração hexânica da folha de *P. arboreum* (substância 16) não pode ser testada, pois não havia mais massa suficiente.

4.7) Modificações morfológicas

Algumas substâncias foram também analisadas nas cepas Y, NCS e Bolívia em tempos pré-determinados de 2, 6, 24, 48 e 72 horas por microscopia de contraste de fase no microscópio Leica - Leitz DMRXE, aumento 100X, para verificar possíveis modificações morfológicas.

A quantidade das substâncias testada foi a equivalente ao IC_{50} de cada uma delas, em um volume final de 2mL de meio e concentração de parasitos de 5×10^5 parasitos/mL.

Os resultados estão apresentados nas Figuras 10 - 39 a seguir.

4.7.1-) Experimentos de modificação morfológica em *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y)

4.7.1.1-) Controle (ausência de substância):

Em todas observações, os parasitos se mostraram com atividade e morfologia normal.



2 horas – parasito vivo



6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo

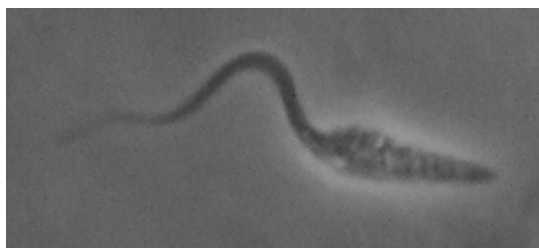


72 horas - parasito vivo

Figura 10: *T. cruzi* (cepa Y), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas. Aumento 100X

4.7.1.2-) Benzonidazol (1):

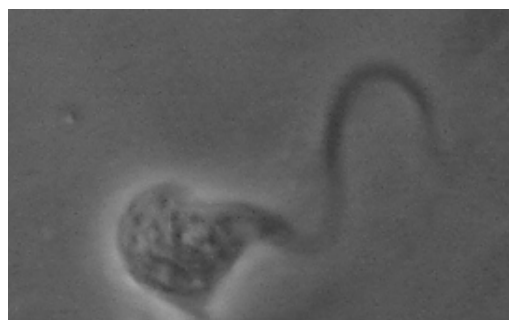
As modificações morfológicas se intensificaram em 72 horas de incubação, onde todos os parasitos observados se apresentaram mortos.



2 horas - parasito vivo



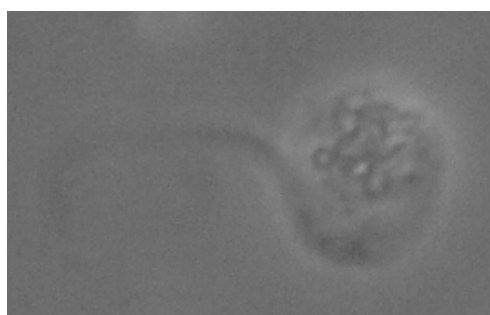
6 horas - parasito morto



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto



72 horas - parasito morto

Figura 11: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.3-) Fração hexânica da folha de *Piper arboreum* (16):

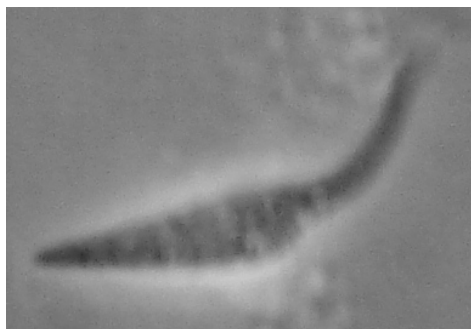
Apenas com 48 horas de incubação com a substância, os parasitos começaram a apresentar alguma modificação em sua estrutura morfológica. Neste momento, muitos se encontravam mortos.



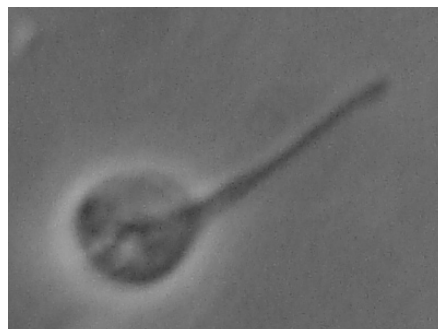
2 horas - parasito vivo



6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto

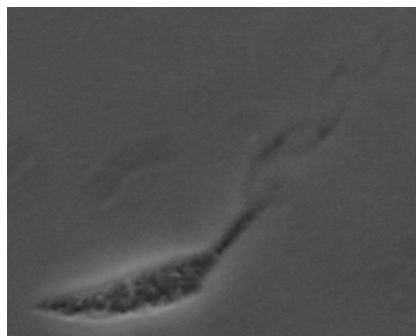


72 horas - parasito morto

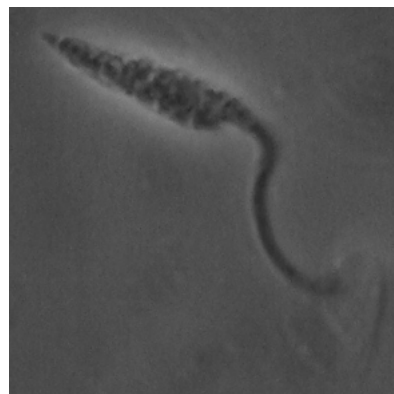
Figura 12: *T. cruzi* (cepa Y), na presença da fração hexânica da folha de *P. arboreum*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.4-) Piplartina (amida) da folha de *Piper tuberculatum* (59):

Nas primeiras horas não foram observadas alterações no padrão de comportamento dos parasitos na presença da substância. Entretanto, com o passar do tempo, os parasitos em sua maioria morreram, apresentando-se completamente modificados quanto a sua morfologia.



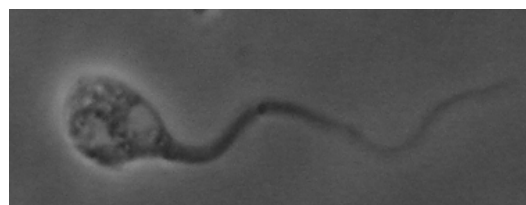
2 horas - parasito vivo



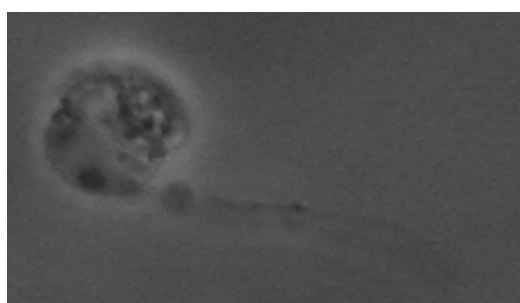
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo

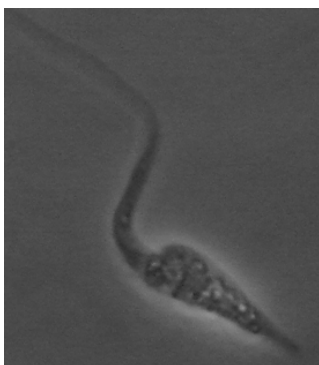


72 horas - parasito morto

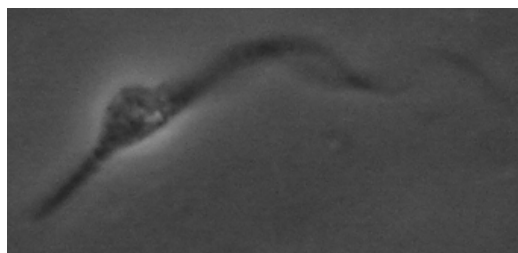
Figura 13: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de piplartina (amida) da folha de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.5-) Mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (67):

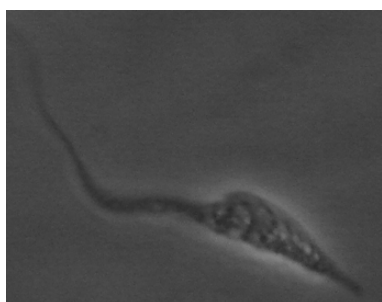
Até 24 horas, os parasitos não apresentaram nenhuma modificação morfológica visível. Com 48 horas em contato com a substância, apesar de vivos, eles já se apresentaram diferentes morfológicamente. Com 72 horas, todos estão modificados (perda de flagelo, presença de vacúolos e arredondamento) e mortos.



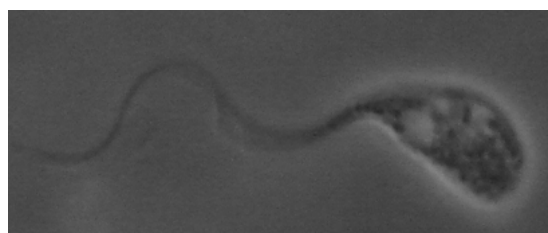
2 horas - parasito vivo



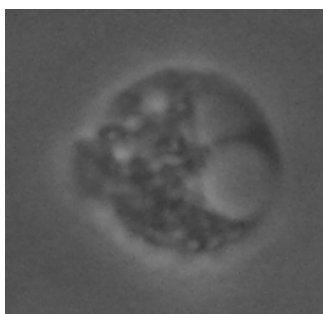
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo



72 horas - parasito morto

Figura 14: *T. cruzi* (cepa Y), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.6-) Mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (68):

Até 24 horas os parasitos não apresentaram nenhuma modificação morfológica visível e em sua maioria, todos estavam vivos. A partir das 48 horas em contato com a substância, os parasitos apresentaram alguns vacúolos e praticamente todos estavam mortos.



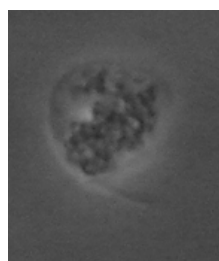
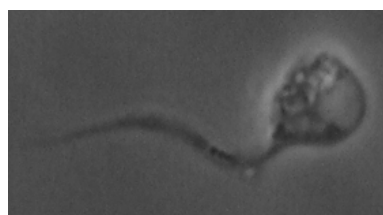
2 horas - parasito vivo



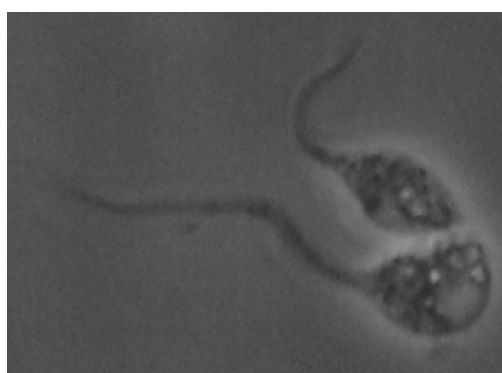
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasitos mortos

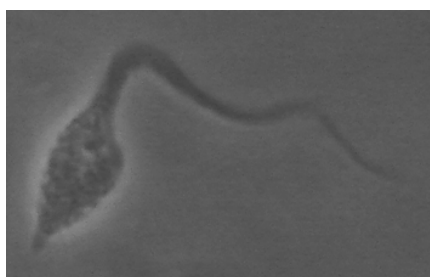


72 horas – parasitos mortos

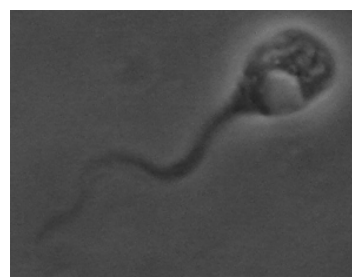
Figura 15: *T. cruzi* (cepa Y), na presença da mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.7-) Pelitorina (amida) da semente de *Piper tuberculatum* (69):

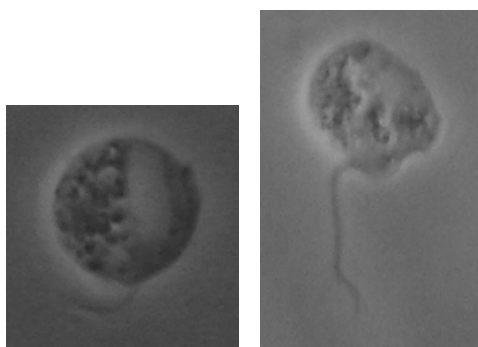
Nas primeiras horas de contato com a substância, os parasitos já apresentavam alguma modificação, embora ainda vivos. A mortalidade começou a ocorrer nas 24 horas, mas mesmo assim foram observados alguns parasitos vivos. Após 72 horas não foi observado nenhum parasito vivo.



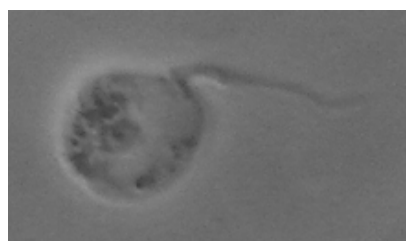
2 horas - parasito vivo



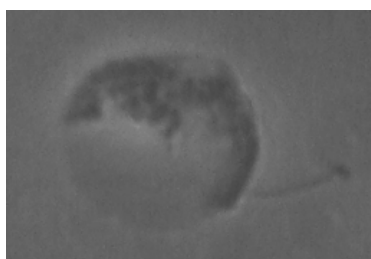
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasitos mortos



48 horas - parasito morto



72 horas - parasito morto

Figura 16: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de pelitorina (amida) da semente de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.8-) Proctoriona C (policetídeo) de *Peperomia blanda* (75):

As modificações apareceram em 48 horas de contato com a substância, com a perda de flagela em alguns casos e a presença de grânulos. Neste momento, ainda encontravam-se parasitos vivos e sem modificação. Em 72 horas, todos os parasitos observados encontravam-se mortos e com modificação morfológica.



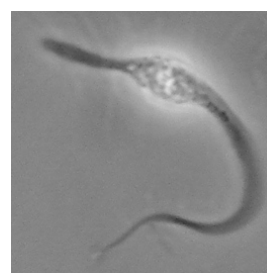
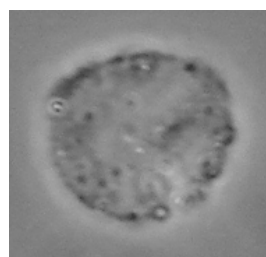
2 horas - parasito vivo



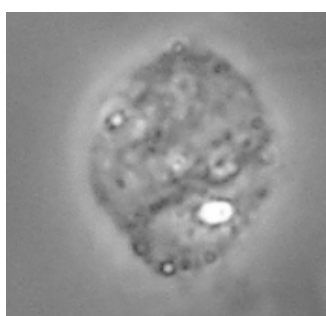
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto e parasito vivo

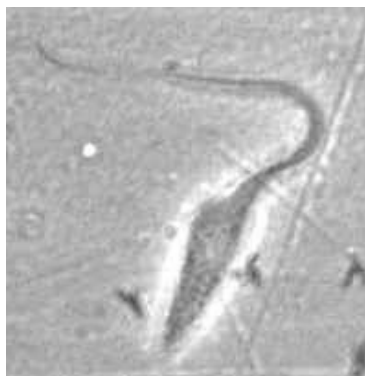


72 horas - parasito morto

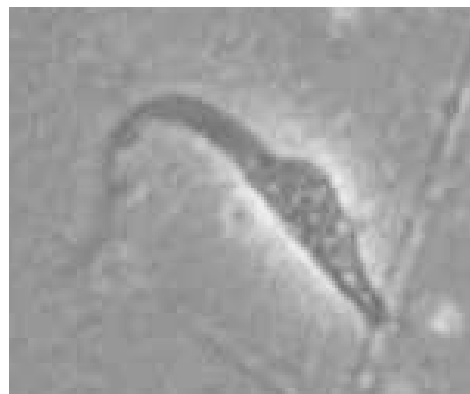
Figura 17: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de proctoriona C (policetídeo) de *P. blanda* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.9-) Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de *Peperomia obtusifolia* (80):

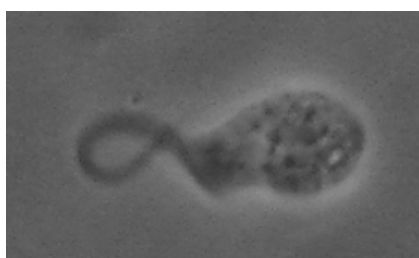
A partir de 24 horas em contato com a substância, os parasitos começaram a apresentar modificações, mas continuavam vivos. Em 72 horas, todos os parasitos observados encontravam-se mortos e com modificação morfológica.



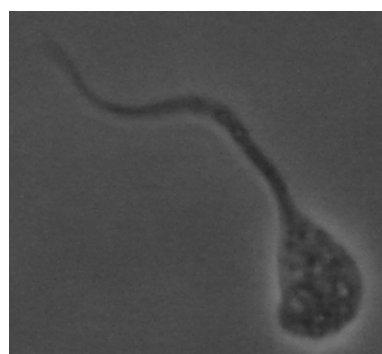
2 horas - parasito vivo



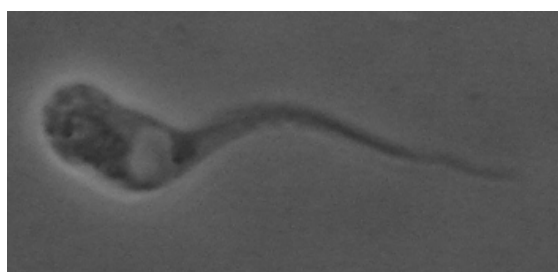
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto

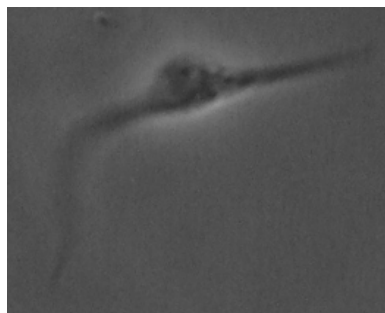


72 horas - parasito morto

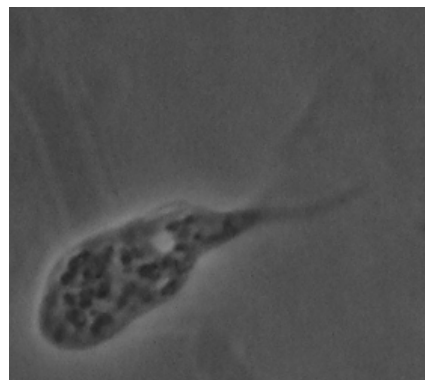
Figura 18: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.1.10-) Cromeno isolado da folha de *Peperomia obtusifolia* (87):

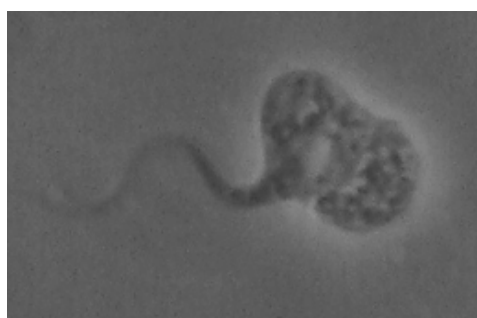
A partir de 6 horas em contato com a substância os parasitos começaram a apresentar modificações, mas continuavam vivos. Em 48 horas alguns já se encontram mortos e após 72 horas, todos os parasitos observados encontravam-se mortos e com modificação morfológica.



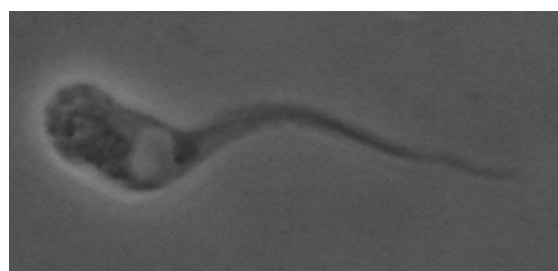
2 horas - parasito vivo



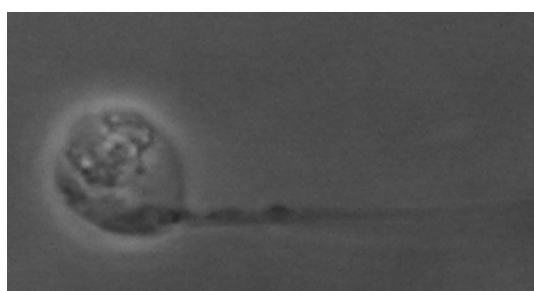
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto



72 horas - parasito morto

Figura 19: *T. cruzi* (cepa Y), na presença de um cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2-) Experimentos de modificação morfológica em *Trypanosoma cruzi* (Cepa NCS)

4.7.2.1-) Controle (ausência de substância):

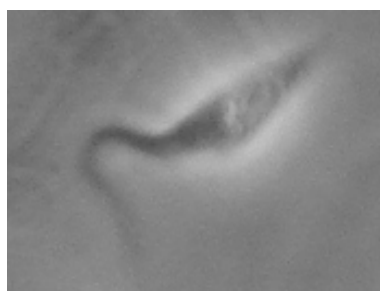
Em todas observações, os parasitos se mostraram com atividade e morfologia normal.



2 horas - parasito vivo



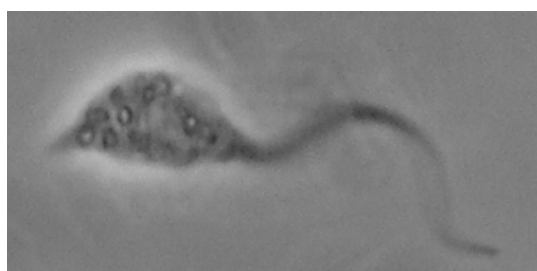
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo

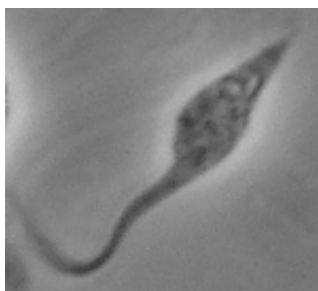


72 horas - parasito vivo

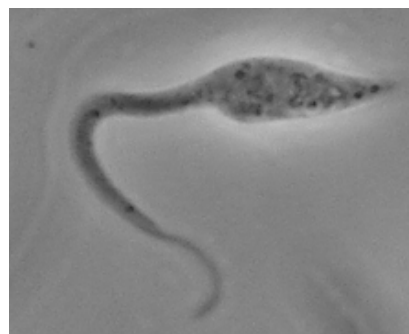
Figura 20: *T. cruzi* (cepa NCS), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas. Aumento 100X

4.7.2.2-) Benzonidazol (1):

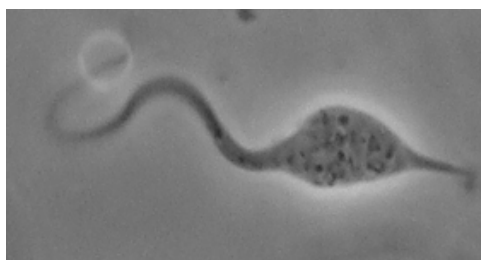
Em até 24 horas de contato, os parasitos se apresentavam ativos e sem modificações. A partir de 48 horas, as modificações observadas foram extremas, mas mesmo assim, ainda se encontravam alguns parasitos vivos. Dentre as modificações, podemos observar a perda total do flagelo ou seu encurtamento e a presença de grânulos e grandes vacúolos.



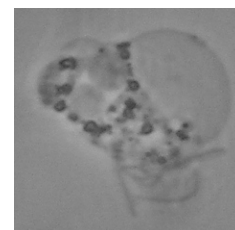
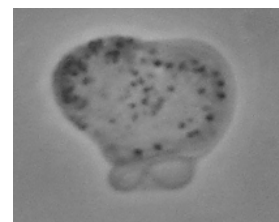
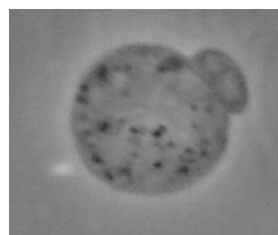
2 horas - parasito vivo



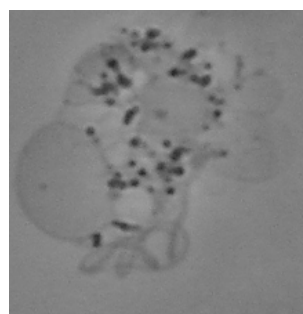
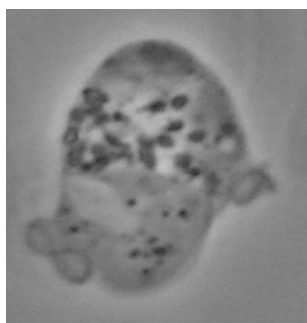
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasitos vivos

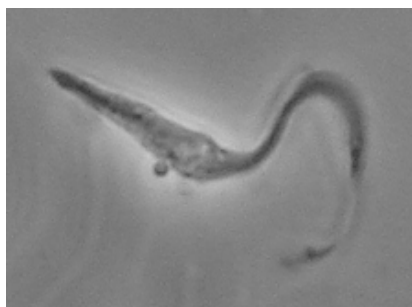


72 horas - parasitos mortos

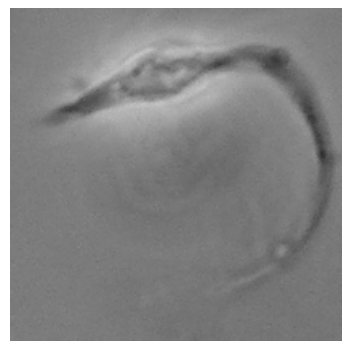
Figura 21: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.3-) Fração hexânica da folha de *Piper arboreum* (16):

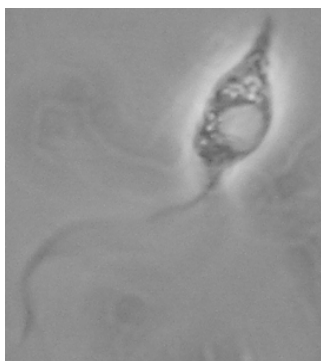
A partir de 24 horas em contato com a substância, os parasitos passaram a apresentar alguma modificação, mas até as 72 horas ainda foi possível observar parasitos vivos.



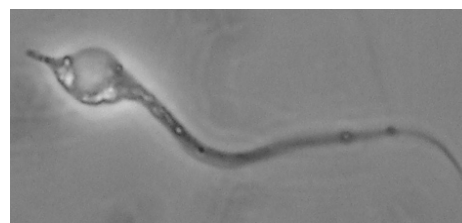
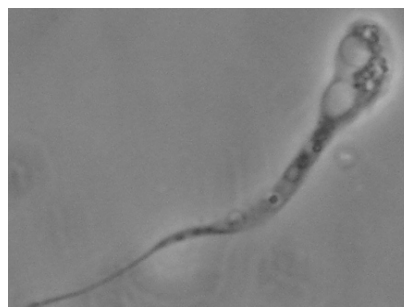
2 horas - parasito vivo



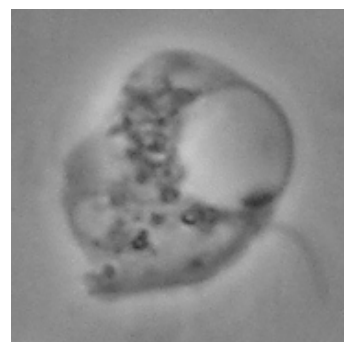
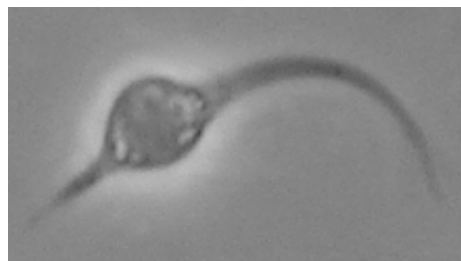
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasitos mortos

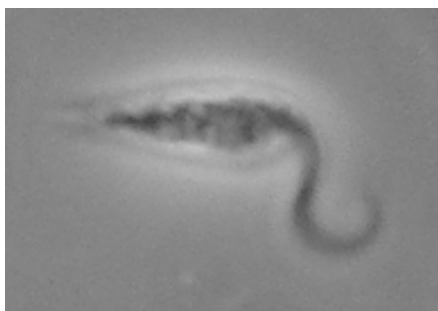


72 horas - parasito vivo e parasito morto

Figura 22: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença da fração hexânica da folha de *P. arboreum*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.4-) Piplartina (amida) da folha de *Piper tuberculatum* (59):

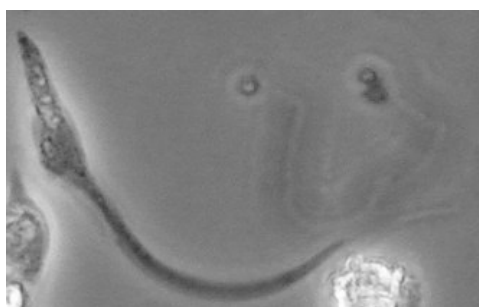
Os parasitos apresentaram características semelhantes tanto para a cepa NCS como para Y, sem alterações. Com o passar do tempo foram se apresentando mortos, em sua maioria, e completamente modificados quanto à morfologia, com a perda de flagelo e a presença de grânulos (48 horas) e de vacúolos (72 horas).



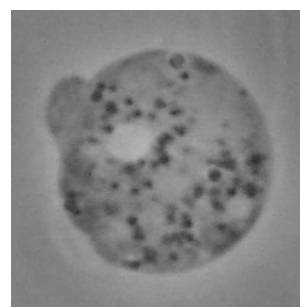
2 horas - parasito vivo



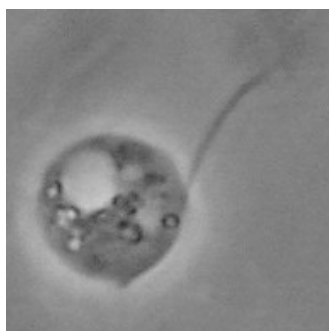
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto

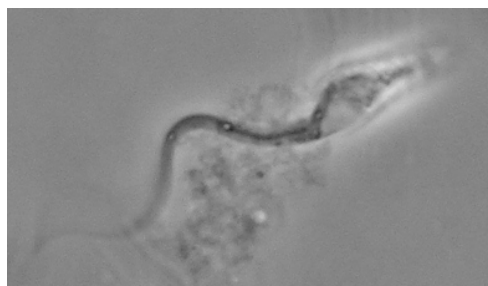


72 horas - parasito morto

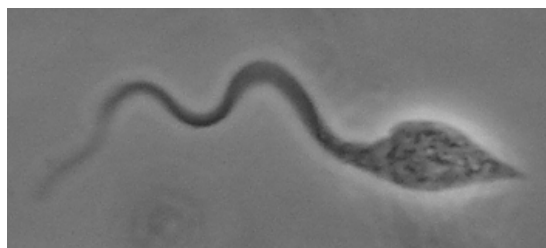
Figura 23: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de piplartina de *P. tuberculatum*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.5-) Mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (67):

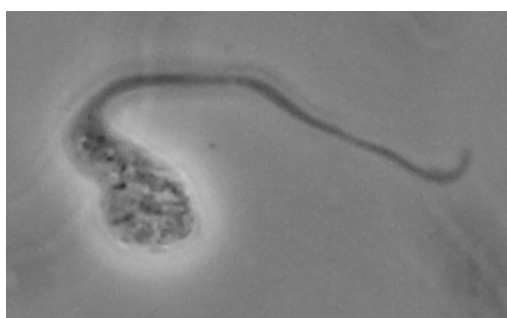
Os parasitos só apresentaram grandes modificações nas 72 horas, onde a maioria também se encontrava morta.



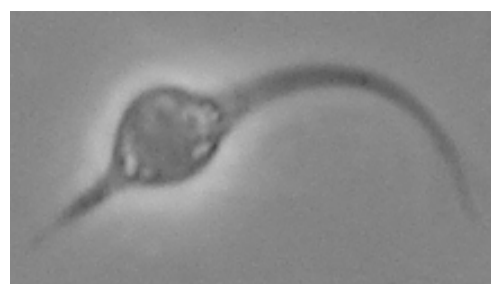
2 horas - parasito vivo



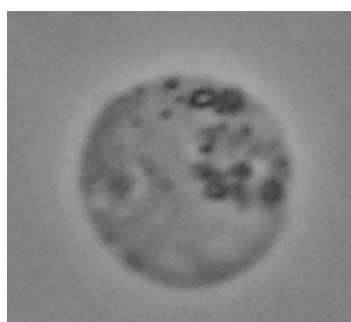
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo



72 horas - parasito morto

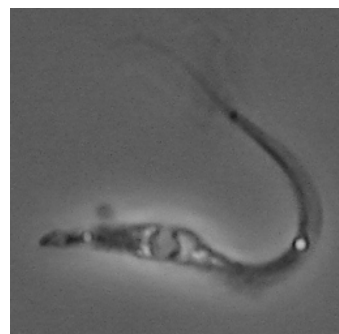
Figura 24: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.6-) Mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (68):

Essa substância não causou grandes modificações morfológicas nos parasitos, apesar de todos estarem mortos com 72 horas.



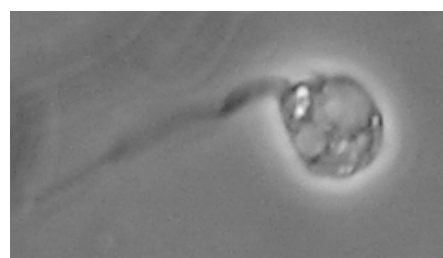
2 horas - parasito vivo



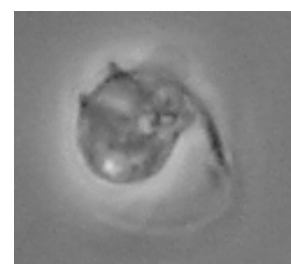
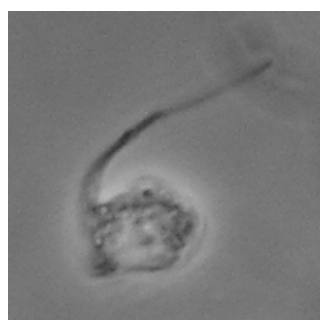
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo

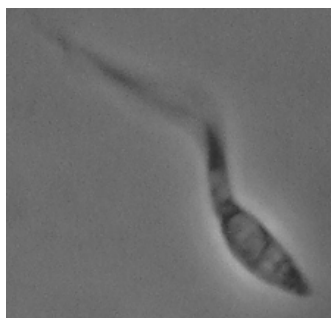


72 horas - parasitos mortos

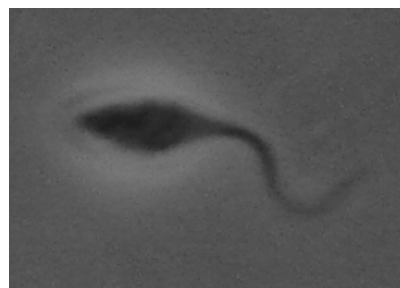
Figura 25: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença da mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.7-) Pelitorina (amida) da semente de *Piper tuberculatum* (69):

Em 48 horas alguns parasitos já se apresentavam mortos, mas sem muitas modificações morfológicas.



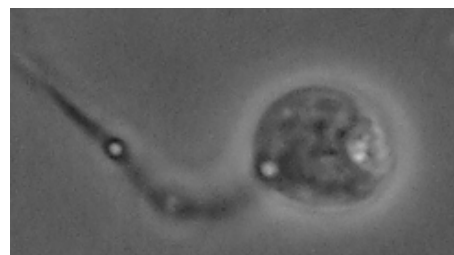
2 horas - parasito vivo



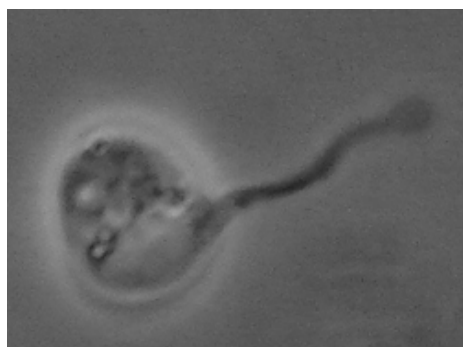
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto



72 horas - parasito morto e parasito vivo

Figura 26: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de pelitorina (amida) da semente de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.8-) Proctoriona C (policetídeo) de *Peperomia blanda* (75):

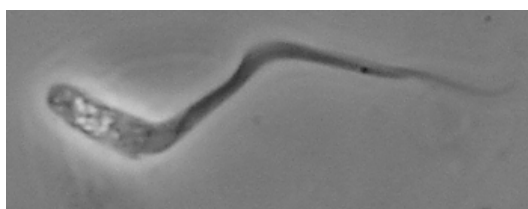
Em 48 horas, muitos parasitos se encontravam modificados, podendo ser observada a formação de rosetas. Em 72 horas, pode-se observar parasitos com a perda de flagelo.



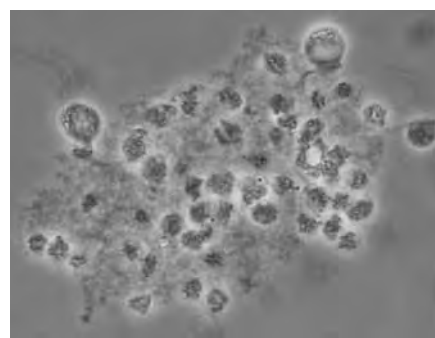
2 horas - parasito vivo



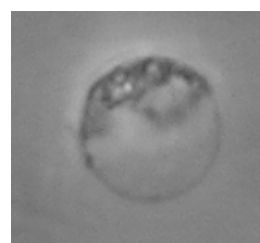
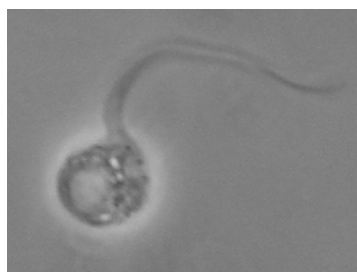
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas – parasitos mortos



72 horas – parasitos mortos

Figura 27: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de proctoriona C (policetídeo) de *P. blanda* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.9-) Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de *Peperomia obtusifolia* (80):

Em 2 horas os parasitos se apresentam normal e muitos continuam se dividindo (reprodução assexuada). Entretanto, após 24 horas, eles já começam a sofrer modificações e estão todos mortos.



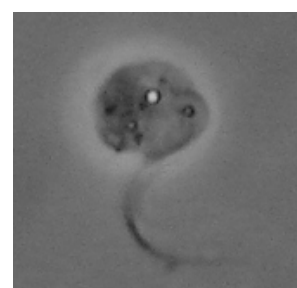
2 horas - parasito vivo



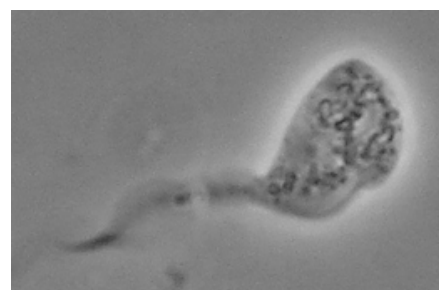
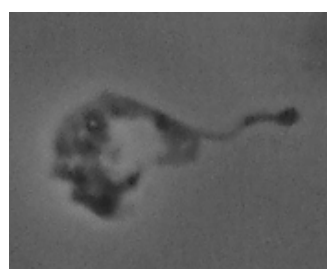
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasitos mortos



48 horas - parasitos mortos

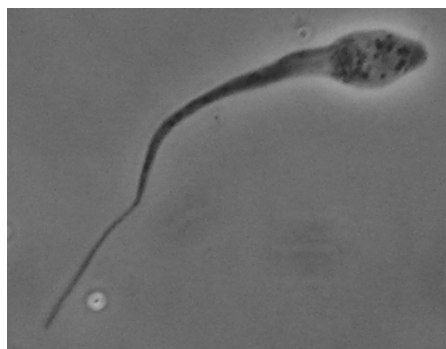


72 horas - parasitos mortos

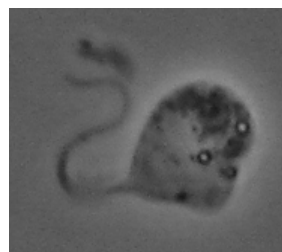
Figura 28: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.2.10-) Cromeno isolado da folha de *Peperomia obtusifolia* (87):

A partir de 6 horas em contato com a substância, os parasitos começaram a apresentar modificações e muitos já estavam mortos em 24 horas.



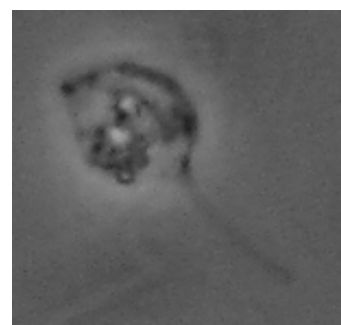
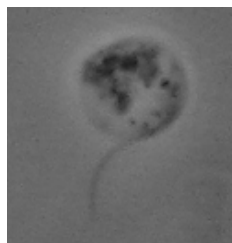
2 horas - parasito vivo



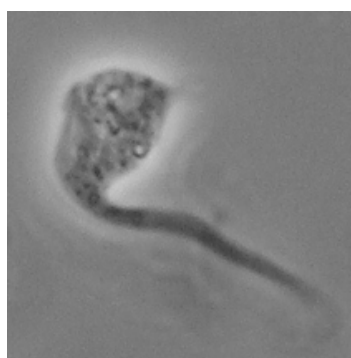
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasitos mortos



48 horas - parasito morto



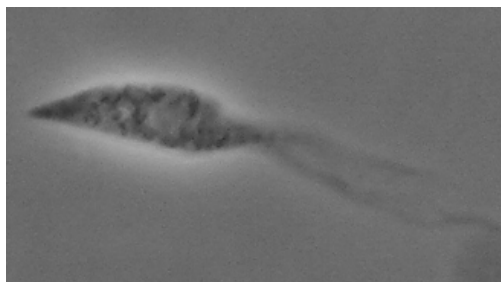
72 horas - parasito morto

Figura 29: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de um cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3-) Experimentos de modificação morfológica em *Trypanosoma cruzi* (Cepa Bolívia)

4.7.3.1-) Controle (ausência de substância):

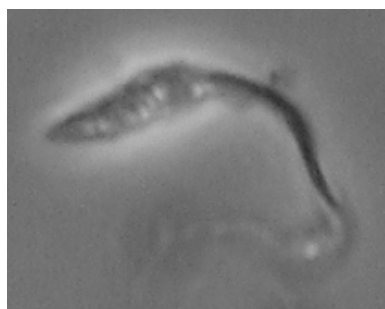
Em todas observações, os parasitos se mostraram com atividade e morfologia normal.



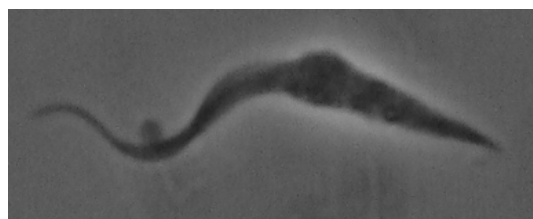
2 horas - parasito vivo



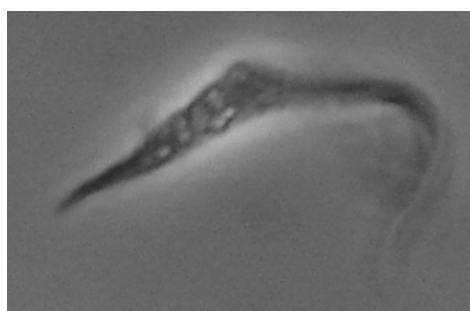
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo

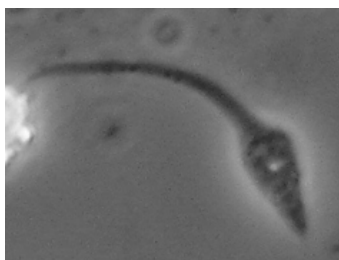


72 horas - parasito vivo

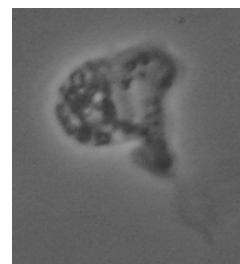
Figura 30: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na ausência de substância, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas. Aumento 100X

4.7.3.2-) Benzonidazol (1):

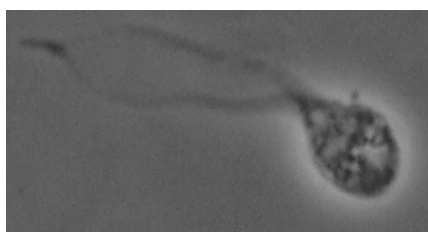
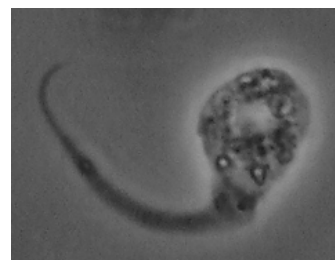
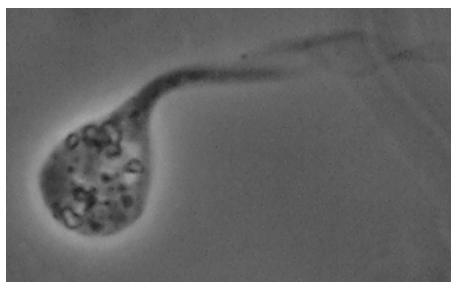
As modificações morfológicas começaram a aparecer após 6 horas em contato com o benzonidazol, mas até 72 horas em contato, apesar das modificações (perda de flagelo, presença de grânulos e vacúolos), alguns parasitos ainda se encontravam vivos. Observar a formação de roseta (48 horas).



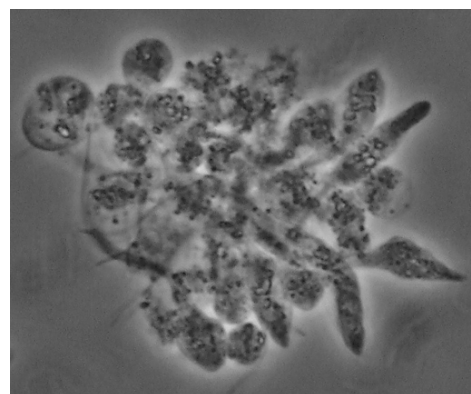
2 horas - parasito vivo



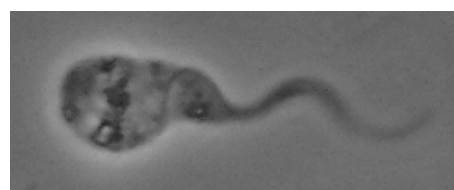
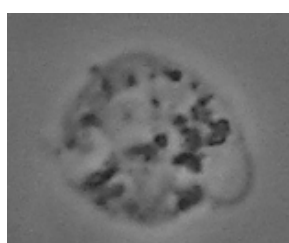
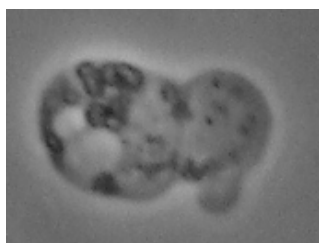
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasitos vivos



48 horas – parasitos mortos

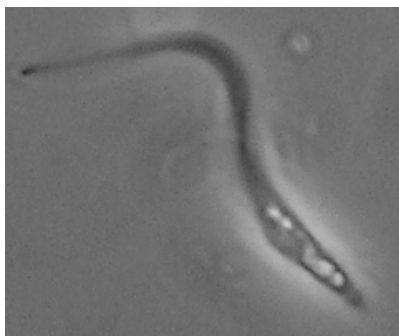


72 horas – parasitos mortos e parasito vivo (último)

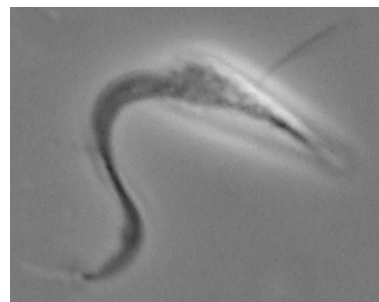
Figura 31: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença de benzonidazol, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.3-) Fração hexânica da folha de *Piper arboreum* (16):

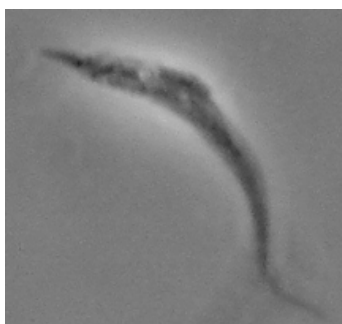
Diferentemente das outras cepas, com a cepa Bolívia, essa fração não mostrou nenhuma modificação morfológica nos parasitos e todos estavam vivos e com atividade normal.



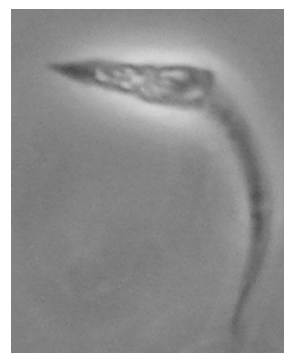
2 horas - parasito vivo



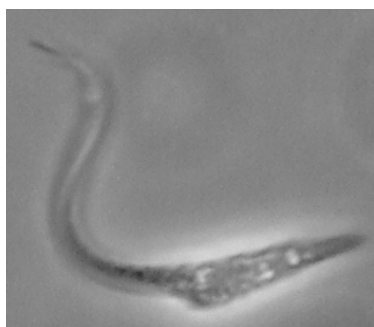
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito vivo



72 horas - parasito vivo

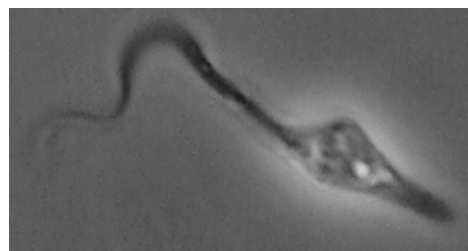
Figura 32: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença da fração hexânica da folha de *P. arboreum*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.4-) Piplartina (amida) da folha de *Piper tuberculatum* (59):

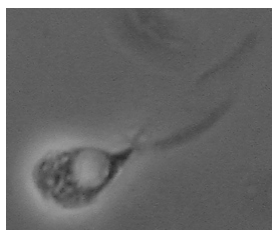
Após 2 horas, os parasitos se apresentavam bastantes ativos. Essa atividade foi diminuindo com o passar do tempo e os parasitos começaram a apresentar pequenas modificações em 24 horas de contato. Com o passar do tempo foram se apresentando mortos, em sua maioria, e modificados quanto à morfologia.



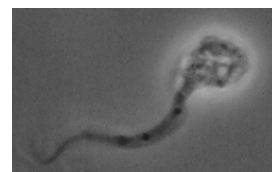
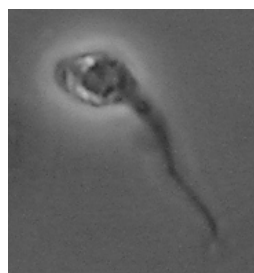
2 horas - parasito vivo



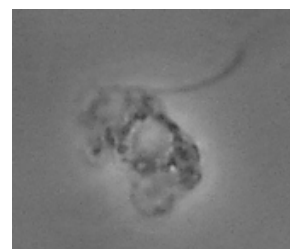
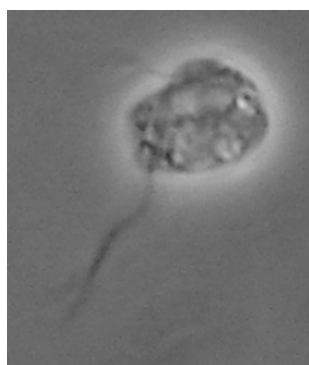
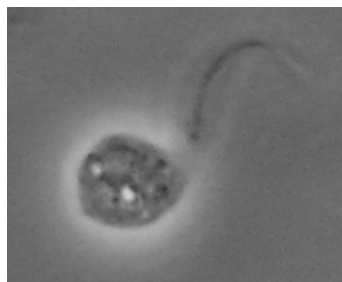
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasitos vivos



48 horas - parasitos vivos

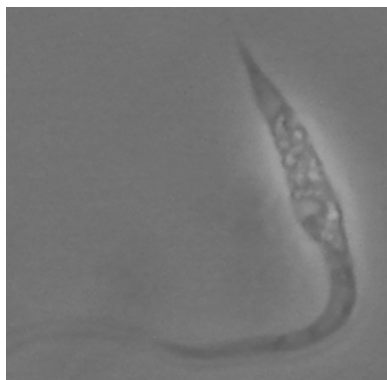


72 horas – parasitos mortos

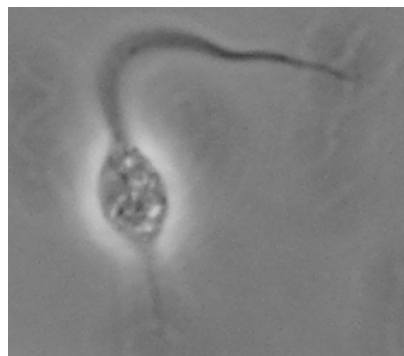
Figura 33: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença de piplartina de *P. tuberculatum*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.5-) Mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (67):

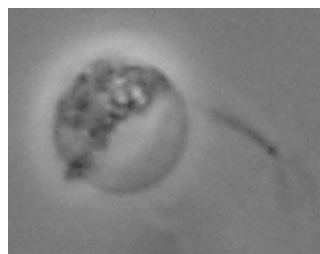
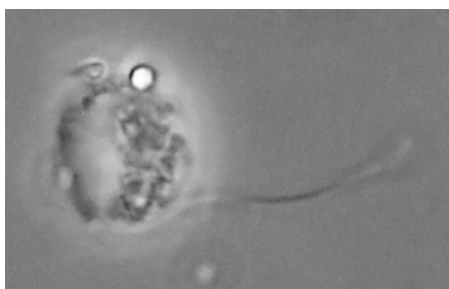
Praticamente todos os parasitos estavam mortos após 24 horas em contato com a substância e se apresentavam modificados morfologicamente, com a presença de muitos grânulos.



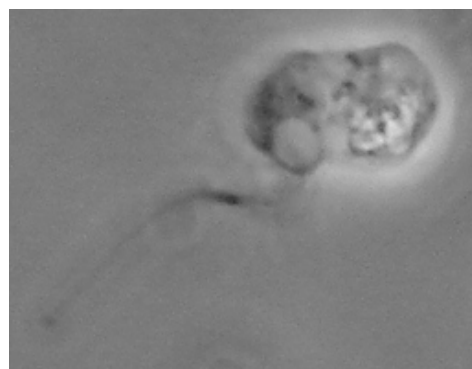
2 horas - parasito vivo



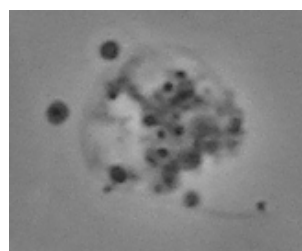
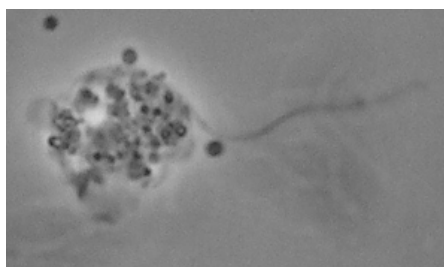
6 horas - parasito vivo



24 horas – parasitos mortos



48 horas - parasito morto

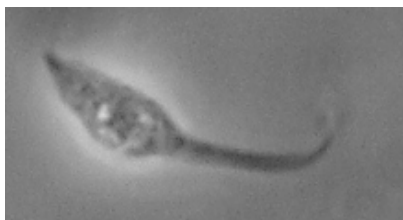


72 horas – parasitos mortos

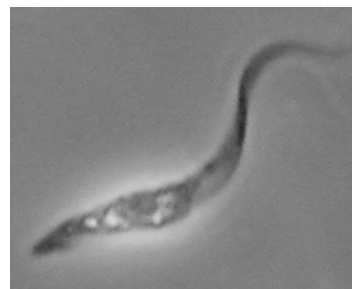
Figura 34: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença da mistura de piplartina e diidropiplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.6-) Mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *Piper tuberculatum* (68):

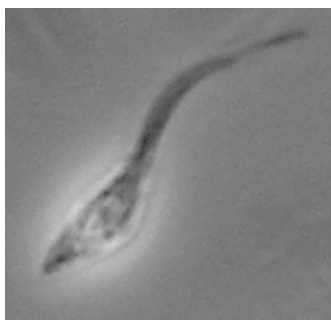
A partir de 48 horas em contato com a substância, os parasitos se apresentaram praticamente todos mortos e modificados, com a perda de flagelo em alguns casos, além da presença de muitos grânulos e vacúolos.



2 horas - parasito vivo



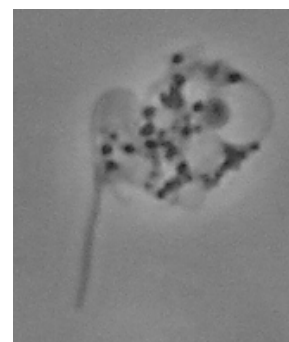
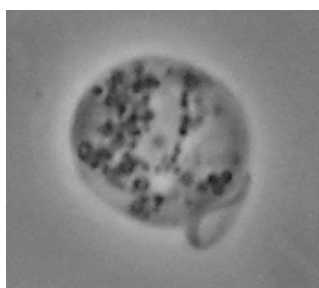
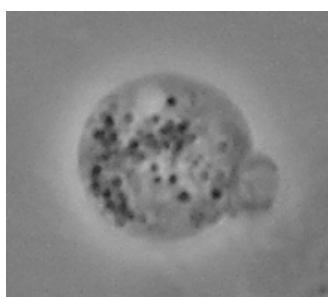
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto

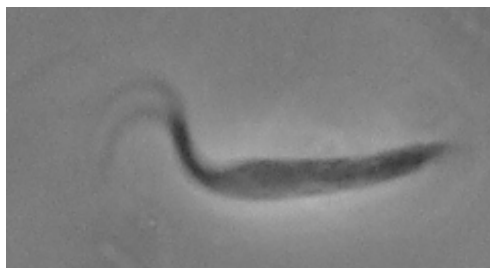


72 horas - parasitos vivos

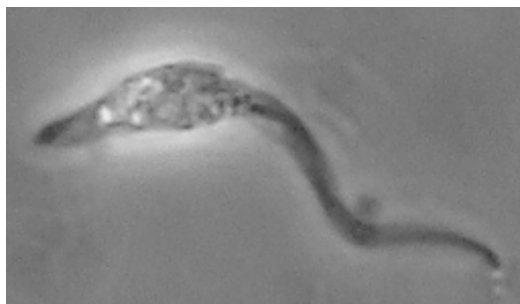
Figura 35: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença da mistura de piplartina e cis-piplartina (amidas) de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.7-) Pelitorina (amida) da semente de *Piper tuberculatum* (69):

Em 24 horas, alguns parasitos se apresentavam mortos, mas sem modificações morfológicas, que passaram a aparecer em pequena quantidade em 48 horas. A partir desse momento, a maioria se encontrava morto.



2 horas - parasito vivo



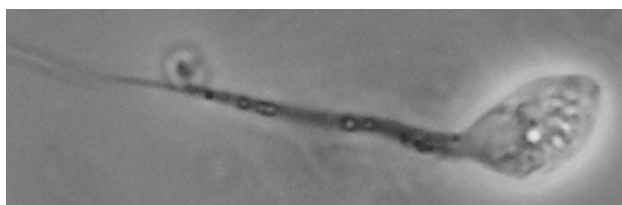
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto

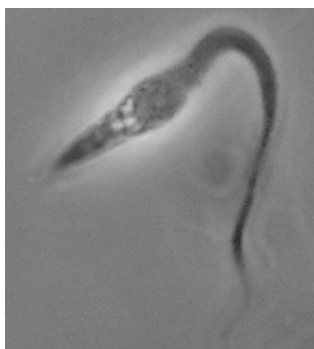


72 horas - parasito morto

Figura 36: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença de pelitorina (amida) da semente de *P. tuberculatum* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.8-) Proctoriona C (policetídeo) de *Peperomia blanda* (75):

Em 24 horas, os parasitos já começaram a aparecer mortos. Porém, em 72 horas ainda foi possível observar alguns parasitos vivos e sem modificações.



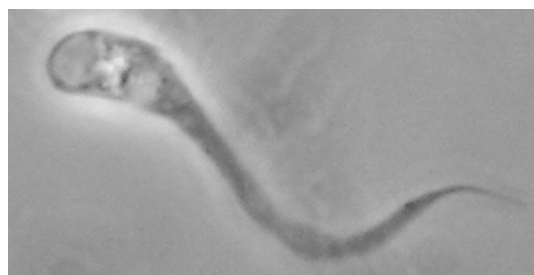
2 horas - parasito vivo



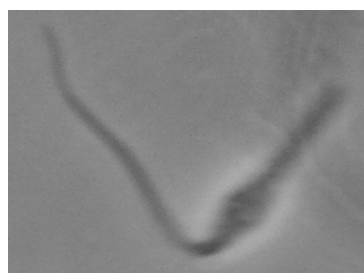
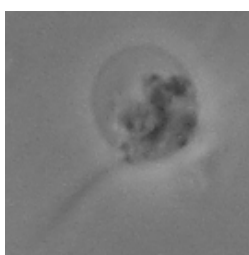
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito morto



48 horas - parasito morto

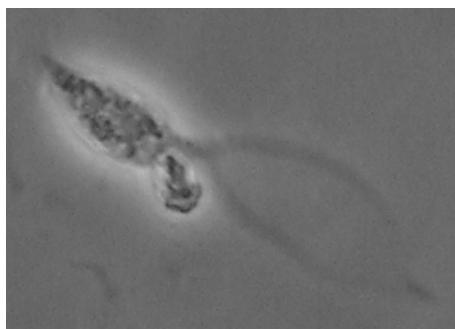


72 horas - parasito morto e parasito vivo

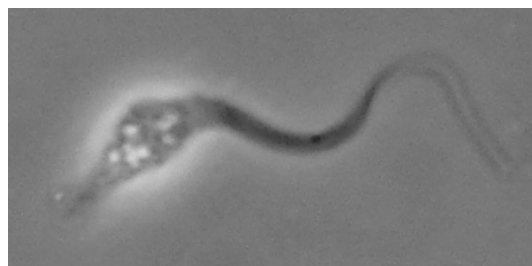
Figura 37: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença de proctoriona C (policetídeo) de *P. blanda* observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.9-) Peperobtusina A (cromeno) isolado do caule de *Peperomia obtusifolia* (80):

Após 24 horas, os parasitos praticamente não apresentaram nenhuma alteração. Após esse período, as alterações foram pequenas e os parasitos estavam mortos.



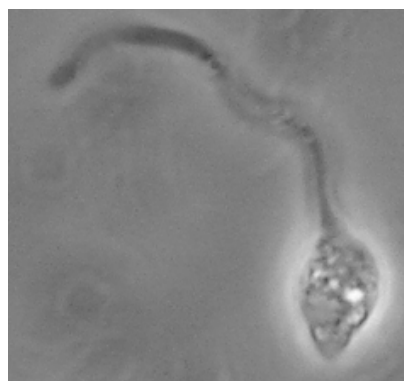
2 horas - parasito vivo



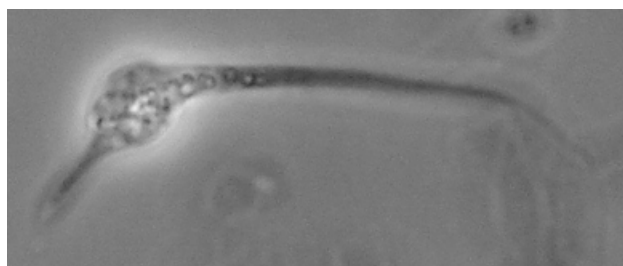
6 horas - parasito vivo



24 horas - parasito vivo



48 horas - parasito morto



72 horas - parasito morto

Figura 38: *T. cruzi* (cepa Bolívia), na presença de peperobtusina A (cromeno) do caule de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

4.7.3.10-) Cromeno isolado da folha de *Peperomia obtusifolia* (87):

As maiores modificações morfológicas foram encontradas nas primeiras horas de contato com a substância, apesar de todos os parasitos ainda se encontrarem vivos. Com o passar do tempo, observaram-se parasitos mortos, porém sem muitas modificações.

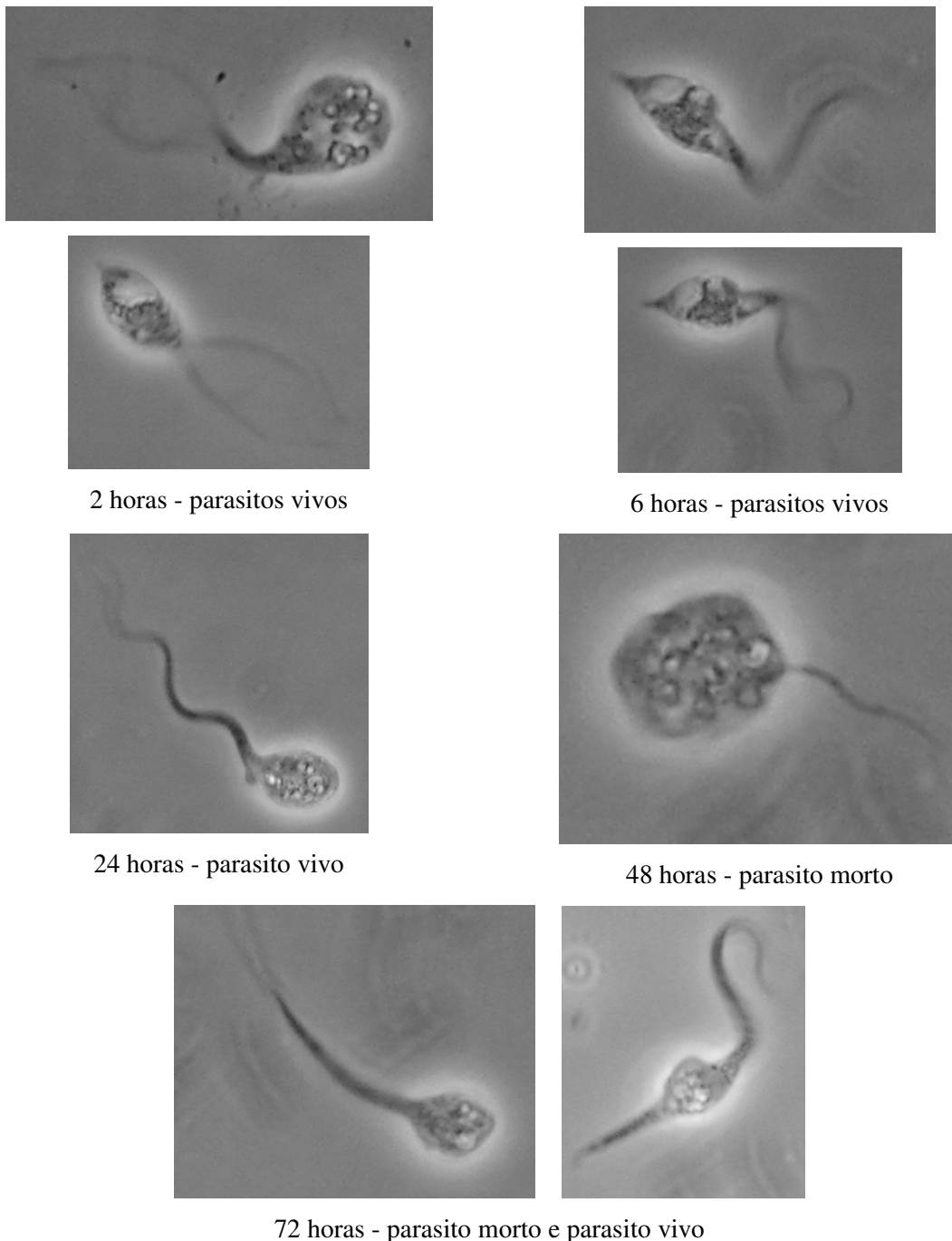


Figura 39: *T. cruzi* (cepa NCS), na presença de um cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia*, observados por microscopia de contraste de fase após 2, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação. Aumento 100X

Em todos os casos, os parasitos apresentaram uma preservação da membrana plasmática, porém com citoplasma de aparência rugosa e formação de vacúolos. Em alguns momentos também se pode observar a perda total ou parcial do flagelo.

A cepa Bolívia, na presença da substância 16 (fração hexânica da folha de *P. arboreum*), não apresentou nenhuma alteração morfológica, e raramente se encontrou parasitos mortos até o tempo máximo de 72 horas. Estes resultados têm uma relação direta com o IC₅₀ (74,77µg/mL) encontrado para essa substância.

As substâncias 59 (piplartina) e a 68 (mistura de piplartina com cis-piplartina) apresentaram nas três cepas (Y, NCS e Bolívia), um IC₅₀ bastante próximo e as modificações morfológicas e mortalidade aconteceram praticamente ao mesmo tempo.

Nas três cepas, a substância 87 (cromeno da folha de *P. obtusifolia*) provocou modificações morfológicas nas primeiras horas em contato com os parasitos. Não foi possível observar um padrão de modificação morfológica das outras substâncias nas diferentes cepas.

Conclusões

5) CONCLUSÕES

As plantas têm se mostrado uma rica fonte de moléculas com atividades contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, e se apresentam como uma alternativa promissora na busca de fármacos eficazes na prevenção e tratamento da doença de Chagas.

O teste colorimétrico pelo MTT utilizado foi eficiente para a análise da atividade tripanocida e de citotoxicidade das substâncias testadas, uma vez que ambos os tipos celulares possuem mitocôndrias.

Modificações estruturais nas moléculas de algumas substâncias, especialmente cromenos e amidas parecem ter favorecido o aumento da atividade tripanocida. Misturas de amidas também potencializaram a atividade tripanocida da piplartina, inferindo um efeito sinérgico. Entretanto, para as células de mamíferos, as amidas mostraram maior citotoxicidade, seguida pelos cromenos.

O índice de segurança (*Safety index*) da substância 59 (piplartina) foi o menor comparativamente às outras substâncias testadas (cepa Y e camundongo Balb/c), embora apresentando Si maior do que 10 (Si= 11,14). Para a cepa NCS, as mais tóxicas foram as substâncias 67 e 87 (Si= 7,42 e 7,01, respectivamente) e para a Bolívia, a 87 (Si= 6,57), uma vez que a 16 não apresentou nenhuma atividade tripanocida.

Estes estudos mostraram uma atividade promissora da proctoriona C (policetídeo) derivada de *P. blanda*, uma vez que apresentou atividade tripanocida elevada e baixa toxicidade frente aos macrófagos de camundongos (Si, cepa Y= 19,37), enfatizando a necessidade de novos estudos com esta molécula.

Uma maior atenção deverá ser dada à fração hexânica da folha de *P. arboreum*, no intuito de se isolar substâncias, uma vez que apresentou ótimos resultados frente ao *T. cruzi* e uma baixa citotoxicidade para macrófagos murinos (Si, cepa Y= 12,17). Essa fração apresentou um comportamento muito diferente frente à cepa Bolívia, uma vez que esta se mostrou muito mais resistente a sua ação.

Todas as substâncias testadas para as cepas NCS e Bolívia apresentaram Si muito baixos quando utilizados camundongos C57/Black/6.

O cromeno isolado da fração hexânica da folha de *P. obtusifolia* (87) parece intercalar de modo inespecífico no DNA; tanto no DNA genômico do *T. cruzi* quanto no DNA plasmidial.

As substâncias mostraram diferentes atividades conforme a cepa de *T. cruzi* utilizada, o que sugere características distintas entre as cepas.

As modificações morfológicas ocorridas nos parasitos quando em contato com as substâncias não apresentaram padrões característicos, porém, sempre houve a formação de vários vacúolos sem rompimento da membrana plasmática e morte dos parasitos a partir de 48 horas.

Mais estudos será necessário para se compreender melhor o mecanismo de ação dessas substâncias sobre o *Trypanosoma cruzi*, a fim de que futuramente possa ser obtido um fármaco mais eficaz no tratamento da doença de Chagas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 1991. 417 p.
- 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, n. 9, p. 1188-1191, 2002.
- AHMAD, F. B.; TAWAN, C. Phytochemical studies on *Piper umbellatum*. **ASEAN Rev. Biodivers. Environ. Conserv.** : ARBEC, p. 1-4, July/Sept. 2002.
- ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 5, p. 637-639, 1998.
- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, S. S.; ANDRADE, J. G. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **The Lancet**, v. 348, n. 23, p. 1407-1413, 1996.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 71-80, 1999. Suplemento 1.
- ANDRADE, A. L. S. S.; MARTELLI, C. M. T.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; AIRES, A. I. S.; SOUSSUMI, L. M. T.; COVAS, D. T.; SILVA, L. S.; ANDRADE, J. G.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C. Short report: Benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 594-597, 2004.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.

BARILE, F. A.; DIERICKY, P. J.; KRISTEN, U. *In vitro* cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 10, n. 3, p. 155-162, 1994.

BARRETT, M. P.; GILBERT, I. H. Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 5, p. 471-482. 2002.

BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 339-343, 1999.

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.

BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origin of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6, p. 1406–1409, 2005.

BOIBESSOT, I.; TURNER, C. M. R.; WATSON, D. G.; GOLDIE, E.; CONNEL, G.; McINTOSH, A.; GRANT, M. H.; SKELLERN, G. G. Metabolism and distribution of phenanthridine trypanocides in *Trypanosoma brucei*. **Acta Tropica**, v.84, n.3, p.219-228, 2002.

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

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431p.

BRIONES, M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two

Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, n. 2, p. 219-232, 1999.

BUAINAIN, A.; BELDA NETO, F. M.; GIAZZI, J. F.; ROSA, J. A.; MARTINI, A. S. Isolamento e caracterização de amostras de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos residentes na região de Araraquara – S.P. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 54-59, 1987. Suplemento 1.

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.

CAMANDAROBA, E. L. P.; LIMA, C. M. P.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CARLIER, Y.; TORRICO, F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 6, p. 767-771, 2003.

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

CASTRO, J. A.; DIAS, E. G. T. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomed. Environ.**, 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.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHEN, C. M.; JAN, F. Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. Peperomins-A, Peperomins-B and Peperomins-C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**, v. 29, n. 3, p. 411-414, 1989.

CHENG, M.; LEE, S.; CHANG, Y.; WU, S.; TSAI, I.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, 2003.

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.

DIAS, J. C. P. Present situation and future of human Chagas disease in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 13-15, 1997.

DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Século XXI**. In: SIMPÓSIO VIRTUAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS, 1., 1999. Disponível em: <<http://www.fac.org.ar/fec/chagas/c12pinto/c12pinto.htm>>. Acesso em: 30 jun. 2008.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 101-102, 2006a.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 4, p. 370-375, 2006b.

DIAS NETO, E. **Projeto genoma de parasitos**. In: VIDEBULAS. 2002. Disponível em: <http://www.videbulas.com.br/dinfo/atualida/021016_05.htm>. Acesso em: 25 ago. 2008.

- DOCAMPO, R.; SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHELOFF, P.; MORENO, S.
Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 251-261, 2005.
- DODSON, C. D.; DYER, L. A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D. K.
Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 51-54, 2000.
- 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.; McODIMBA, F. A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. **Vet. Parasitol.**, v. 50, n. 1-2, p. 143-149, 1993.
- ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.
- FÁTIMA, A.; MARQUISSOLO, C.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO-BRAHÃO, A. A.; PILLI, R. A. Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **Europ. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 1210-1213, 2006.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALÉCIO, M. R. Toxicity of *Piper aduncum* oil to adults of *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 34, n. 3, p. 484-489, 2005.
- FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 445-450, 2008.
- FERNANDES J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966.

- FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. **J. Immunol. Methods**, v. 131, p. 165-172, 1990.
- FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.
- FRAYHA, G. J.; SMYTH, J. D.; GOBERT, J. G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **Gen. Pharmacol.**, v. 28, n. 2, p. 273-299, 1997.
- FUNAYAMA, G. K.; PRADO, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 8, p. 75-81, 1974.
- GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. Quinoline-containing antimalarials – mode of action, drug resistance and its reversal an update with unresolved puzzles. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, n. 1, p. 63-70, 1992.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, 1998.
- HEGYESI, H.; CSABA, G. Time and concentration dependence of the growth-promoting 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.
- HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 151, n. 12, p. 7038-7047, 1993.
- IANNI, B. M.; MADY, C. Como era gostoso o meu caldo de cana... **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 85, n. 6, p. 1-3, 2005.

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

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 88, p. 706-716, 2001.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationship of the perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 165, p. 403-416, 2004.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 73-96.

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.

LI, N.; WU, J. L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; WANG, L. I. Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 2, p. 234-239, 2006.

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.

LUQUETTI, O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 344-378.

MA, J.; JONES, S. H.; MARSHALL, R.; JOHNSON, R. K.; HECHT, S. M. A DNA-damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 7, p. 1162-1164, 2004.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C.; JUZIN, E. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **MEPRA**, v. 28, p. 41-46, 1936.

MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; FANE, P.; STERNER O. Two chromenes from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 799-801, 2002.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A. V.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SOARES, M. J.; CASTRO, S. L. de. Effect of a β -lapachone-derived naphthimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **J. Antimic. Chem.**, v. 56, n. 6, p. 1034-1041, 2005.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MONACHE, F. D.; COMPAGNOSE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1097-1098, 1996.

MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochem. Anal.**, v. 16, n. 4, p. 282-286, 2005.

MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. A chromene from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1075-1077, 1998.

MOREL, C. M. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 3-16, 1999. Suplemento 1.

MORELO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of

Trypanosoma cruzi. **Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 107, n. 3, p. 367-371, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* screening of American plants extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 1-2, p. 101-107, 2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quím. Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; MELO, A. L.; RAPONE, T.; SNELL, T.; RODRIGUES, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). **Hospital**, v. 73, p. 1767-1804, 1968.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 813-818, 1993.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJ, A. P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 596-597, 1997.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1130-1133, 2005.

PONCE-MACOTELE, 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.

POZAS, R.; CARBALLO, J.; CASTRO, C.; RUBIO, J. Synthesis and *in vitro* antitrypanosomal activity of novel nifurtimox analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, n. 5, p. 1417-1421, 2005.

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **J. Biogeogr.**, v. 33, n. 7, p. 1266-1278, 2006.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 731p.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; TOMAZ, J. C.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Biological activities and chemical composition of crude extracts from *Chresta exsucca*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 1, p. 83-90, 2006.

SCHMUÑIS, G. A. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 11-23.

SCHMUÑIS, G. A. Tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-5.

SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione Derivatives from *Pepromia proctorii*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 399-402, 2000.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 38, n. 3, p. 147-166, 1987.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stages of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 4, p. 401-403, 1997.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JÚNIOR, E. R.; LOPES, M. H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

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, n. 11, 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.

SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; NÓLIBOS, H.; MELLO, A. L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 10, p. 265-276, 1968.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper*

tuberculatum. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

SILVEIRA, A. C. da. Profilaxia da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 75-87.

SINGH, Y. N. Kava: an overview. **J. Ethno.**, v. 37, n. 1, p. 13-45, 1992.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, p. 583-587, 2006.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 526-529, 1998.

TRUITI, M. C. T.; FERREIRA, I. C. P.; ZAMUNER, M. L. M.; NAKAMURA, C. V.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 12, p. 1873-1878, 2005.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 51-55, 1999. Suplemento 2.

VALENTE, S. A. S.; PIMENTEL, O. S.; VALENTE, V. C. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 19-20, 2001. Suplemento 1.

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

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the

trnK/matK region (cpDNA). **Plant Biol.**, v. 8, n. 1, p. 93–102, 2006.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales – *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 42, p. 477-497, 2007.

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas' disease. Interruption of transmission. **Weekly Epidemiological Records**, v. 72, p. 1-5, 1997.

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, n. 2, p. 637-644, 1982.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M.; TANG, W.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 5, p. 790-794, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

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.