

PAULO CESAR FERREIRA

TOXICIDADE E ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO EXTRATO BRUTO DE *Brosimum gaudichaudii* TRÉCUL (MORACEAE) (MAMA-CADELA) NO PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi*.

Uberlândia
2008

PAULO CESAR FERREIRA

TOXICIDADE E ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO EXTRATO BRUTO DE *Brosimum gaudichaudii* TRÉCUL (MORACEAE) (MAMA-CADELA) NO PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende
Co-Orientador: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva
Área de Concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- F383t Ferreira, Paulo Cesar, 1981-
Toxicidade e atividade tripanocida do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* trécul (Moraceae) (Mama-cadela) no pré-tratamento e tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* / Paulo Cesar Ferreira. - 2008.
39 f. : il.
- Orientador: Elmiro Santos Resende.
Co-orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde.
Inclui bibliografia.
1. Chagas, Doença de - Tratamento - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. I. Resende, Elmiro Santos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.937.3-08

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	09
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS	21
3.2	MATERIAL VEGETAL	21
3.3	<i>Trypanosoma cruzi</i>	21
3.4	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Brosimum gaudichaudii</i>	21
3.5	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	22
3.5.1	Determinação da DL₅₀	22
3.5.2	Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	23
3.6.	DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>T. cruzi</i>	23
3.7	PRODUÇÃO DA INFECÇÃO CHAGÁSICA	24
3.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Brosimum gaudichaudii</i> , POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA (GAVAGEM), NA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.8.1	Tratamento com diferentes doses do Extrato Bruto de <i>B. gaudichaudii</i>	25
3.8.2	Pré-Tratamento com dose fixa do extrato bruto de <i>B. gaudichaudii</i>, iniciado em diferentes dias antes da infecção por <i>T. cruzi</i>	25
3.8.3	Seguimento evolutivo da infecção	26
3.9	TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS	26
4	RESULTADOS	27
4.1	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	27
4.1.1	Determinação da DL₅₀	27
4.1.2	Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	27
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Brosimum gaudichaudii</i> , POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA (GAVAGEM), NA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.2.1	Avaliação do efeito do tratamento com diferentes doses do extrato bruto de <i>Brosimum gaudichaudii</i>, por intubação gástrica (gavagem), na parasitemia de camundongos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.2.2	Avaliação do efeito do pré-tratamento com extrato bruto de <i>Brosimum gaudichaudii</i> a partir de diferentes dias antes da infecção, por intubação gástrica (gavagem), na parasitemia de camundongos infectados por <i>T. cruzi</i>	30
4.3	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. gaudichaudii</i> , ADMINISTRADO POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS	31
5.	DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÃO	35
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado filho Thor e à minha querida esposa Juliana, pelas incontáveis horas que abriram mão de minha companhia para que este objetivo fosse alcançado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, os mais sinceros agradecimentos, pois sem suas contribuições teóricas e sua permanente orientação, amizade e incentivo, este trabalho não teria se realizado.

Ao Prof. Dr. Elmiro Santos Resende pela oportunidade a mim concedida e por doar muito do tempo que lhe é valioso, à minha orientação para concretização deste projeto.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, em especial à pessoa do Dr. Dirceu Deocleciano Pacheco, pelo incentivo e por permitir livre acesso e a execução prática de grande parte dos experimentos deste trabalho nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Saúde do UNIPAM.

Aos colegas de laboratório: Gustavo, Henrique, Maicon Maeda, Fábio, Karla entre outros que em algum momento forneceram auxílio indispensável à execução prática dos experimentos.

Aos membros da banca: Dra. Luciana, Dr. Aguinaldo e Dr. Luiz Ricardo, por terem aceitado tão gentilmente fazerem parte do processo final de concretização deste trabalho, e por nos brindar com seus conhecimentos, ajudando a lapidar, como a uma pedra bruta, esta dissertação.

À minha esposa Juliana e meu filho Thor, por abriram mão de minha companhia por incontáveis horas em prol da execução deste, e cujo amor me manteve inabalável no caminho.

À meus pais, João e Maria Helena, e minhas irmãs pelo apoio e incentivo à realização deste sonho.

À Deus e Seus Domínios!

EPÍGRAFE

"A natureza é um livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas."

Johann Wolfgang Von Goethe (1749-1842)
Escritor, Cientista, Botânico e Filósofo Alemão

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e a atividade tripanocida do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae), também conhecida como “mamacadela”, no pré-tratamento e tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Para o pré-tratamento, os animais receberam 100mg/Kg do extrato bruto de *B. gaudichaudii* iniciando em três diferentes momentos: 7 dias (GBg7), 3 dias (GBg3) e 1 dia (GBg1) antes da infecção. Para o tratamento, os animais receberam diariamente, após a infecção, diferentes quantidades do extrato bruto de *B. gaudichaudii*: 100 mg/kg (G100), 200 mg/kg (G200) e 400 mg/kg (G400). Em ambos experimentos havia um grupo controle composto de animais submetidos às mesmas condições de estresse, tratados apenas com água. Os ensaios para toxicidade executados foram a determinação da DL₅₀ (*in vivo*) e o bioensaio com *Artemia salina* (*in vitro*). Em ambos ensaios para toxicidade, o extrato bruto não demonstrou resultados estatisticamente significantes. No tratamento experimental, um resultado positivo ocorreu no grupo G100 (100 mg/kg) onde houve redução na parasitemia em cerca de 30%. No pré-tratamento, os resultados mostraram que em condições experimentais, o extrato bruto de *B. gaudichaudii* provocou um atraso no aparecimento da parasitemia e reduziu sua intensidade nos grupos: GBg1 (redução de 50%), GBg3 (redução de 12%) e GBg7 (redução de 73%). Baseando nestes resultados, é possível concluir que o extrato bruto de *B. gaudichaudii* não apresenta atividade tóxica aguda, e contém componentes capazes de interferir na infecção por *T. cruzi* em camundongos pré-tratados e tratados com tal extrato.

Palavras-Chave: *Brosimum gaudichaudii*, Plantas Medicinais, *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, *Artemia salina*, Toxicidade.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the toxicity and the trypanocidal activity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) crude extract, also known as “mamacadela”, in pre-treatment and treatment of mice infected by *Trypanosoma cruzi*. For the pre-treatment, the animals received 100 mg/kg of *B. gaudichaudii* crude extract starting in three different moments: 7days (GBg7), 3 days (GBg3) and 1 day (GBg1) before infection. For the treatment, animals were given, after infection, different quantities of *B. gaudichaudii* crude extract: G100 (100 mg/kg), G200 (200 mg/kg) and G400 (400 mg/kg). In both cases there was a control group composed by animals submitted to the same stress conditions, but treated with water only. The toxicity assays carried out were DL₅₀ test (*in vivo*) and the *Artemia salina* bioassay (*in vitro*). On both toxicity assays, the crude extract do not demonstrated statistically significant results for toxicity. On the experimental treatment, a positive result occurred on group G100 (100 mg/kg) where the reduction on parasitemia was about 30%. On the pre-treatment, the results showed that in experimental conditions, the *B. gaudichaudii* crude extract delayed the parasitemia and reduced its intensity on GBg1 (reduction of 50%), GBg3 (reduction of 12%) and GBg7 (reduction of 73%) groups. Based on these results, it is possible to conclude that the *B. gaudichaudii* crude extract do not present acute toxic activity and contain components capable to interfere on *T. cruzi* infection in mice pre-treated and treated with it.

Keywords: *Brosimum gaudichaudii*, Medicinal Plants, *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, *Artemia salina*, Toxicity.

1. INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase americana é uma parasitose causada por um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomidae, *Trypanosoma cruzi*, e transmitida ao homem e a outros animais geralmente através de triatomíneos hematófagos (barbeiros) que atuam como vetores. Sua descoberta se deu em um episódio raro na história da medicina, onde somente um pesquisador, o cientista mineiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, estabeleceu simultaneamente a etiologia, as características patológicas e a prevenção de uma doença, a qual se tornou popularmente conhecida como Doença de Chagas (NACRUTH, 1991; NEVES, 2005).

A Doença de Chagas se destaca entre todas as demais endemias por constituir um grave problema médico-social, não só no Brasil, mas em grande parte do continente americano, onde é encontrada desde o sul dos E.U.A. até a província de Chuhut na Argentina, em virtude da sua alta prevalência, morbidade e letalidade (FILHO *et al.*, 1994).

Dados da OMS indicam que nas Américas do Sul e Central onde esta protozoose é endêmica, há cerca de 90 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença, havendo de 16 a 18 milhões de infectados, afetando principalmente populações pobres que residem em condições precárias (IANNI e MADY, 1998). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estima-se que existam cerca de 8 a 9 milhões de infectados, 60% dos quais vivendo em cidades de médio e de grande porte, em consequência da urbanização da doença (FILHO *et al.*, 1994).

Considerada uma doença infecto-parasitária de grande impacto no Brasil, onde admite-se que mais de 75.000 trabalhadores infectados sejam portadores de cardiopatia crônica, gerando um absenteísmo de 2.250.000 dias de trabalho perdidos por ano. Por outro lado, apenas o custo direto do tratamento das arritmias da cardiopatia crônica poderia

alcançar US\$ 46 milhões por ano, se todos os pacientes que necessitassem dele fossem adequadamente tratados. Já com a implantação de marcapassos e a realização de cirurgias complexas para as formas digestivas avançadas, o custo subiria a US\$ 250 milhões (CIMERMAN e CIMERMAN, 2002).

De acordo com a OMS, a Doença de Chagas é uma das principais causas de morte súbita, que ocorre freqüentemente na fase de vida mais produtiva do cidadão. Além disso, o chagásico é um indivíduo marginalizado pela sociedade, discriminado até mesmo na obtenção de um emprego, mesmo que este se adapte à sua condição clínica, a qual, na maioria das vezes, nem mesmo é suficientemente avaliada. Por isso a Doença de Chagas constitui um grave problema médico e social, uma sobrecarga para os órgãos de previdência social com um montante de aposentadorias precoces, nem sempre necessárias (NEVES, 2005).

Nos países da área endêmica, onde as estratégias de controle não foram adotadas ou são deficientes, a principal via de transmissão ainda é a vetorial. Além desta, outras formas de transmissão ocorrem sob diferentes circunstâncias e situações como, por exemplo, pela via transplacentária, pelo leite materno, pela via oral (digestiva), pelo transplante de órgãos, em acidentes de laboratório e por transfusão sanguínea (SILVA, 1996).

Quanto ao ciclo biológico do *T. cruzi*, ele apresenta uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos) e extracelular, no inseto vetor. Os triatomíneos se infectam a partir do hospedeiro definitivo, ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória, durante o hematofagismo. As formas tripomastigotas sofrem modificações ao longo do seu tubo digestivo. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, sendo, portanto, responsáveis pela manutenção da infecção no vetor. No reto, os epimastigotas se diferenciam em

tripomastigotas infectantes, sendo eliminados nas fezes e urina. (CIMERMAN e CIMERMAN, 2002; NEVES, 2005).

Desde o início de suas pesquisas, Carlos Chagas identificou duas fases na doença: uma fase aguda, que pode ser aparente ou inaparente, e a fase crônica, que pode ser indeterminada, cardíaca, digestiva ou neural (NACRUTH, 1991).

A fase aguda é inicial e efêmera na maior parte dos indivíduos. A lesão cardíaca é resultante de invasão direta das células miocárdicas pelos parasitos, com as alterações inflamatórias conseqüentes. Em alguns casos, os pacientes *T. cruzi* positivo na fase aguda apresentam-se com alta parasitemia, febre ou dilatação cardíaca progressiva com insuficiência sistólica, geralmente com linfadenopatia generalizada ou esplenomegalia. Na fase crônica sintomática, que ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes infectados, geralmente 5 a 15 anos após a infecção inicial, a lesão cardíaca e do trato digestivo parece resultar de uma resposta auto-imune induzida pelos *T. cruzi*. Neste momento, pode não haver parasitemia detectável, mas ocorre infiltrado inflamatório intenso do miocárdio, desproporcional ao escasso número de parasitos presentes (MURRAY *et al.*, 2000; NEVES, 2005).

Além do homem, um grande número de mamíferos, como animais domésticos, silvestres e de laboratório, podem ser infectados pelo *T. cruzi* e muitos deles tem sido utilizados como modelos experimentais para o estudo dos diversos aspectos da infecção (FILHO *et al.*, 1994). Dentre os modelos experimentais, os camundongos destacam-se por apresentarem maior nitidez no desenvolvimento das fases características da doença. Na fase aguda, sua parasitemia descreve uma típica curva, semelhante à que ocorre no homem, e na fase crônica, as lesões cardiovasculares são intensas e também semelhantes às que ocorrem no homem, quando se desenvolve a cardiopatia grave (SILVA, 1996)

O tratamento da Doença de Chagas, de forma geral, ainda é parcialmente ineficaz e vários aspectos encontram-se em fase de investigação, apesar do real progresso alcançado nos últimos anos. As drogas utilizadas até o presente momento possuem efeitos supressivos sobre o parasito, mas não curativos. Isto é, podem diminuir muito ou mesmo suprimir a parasitemia no curso do tratamento e reduzi-la apreciavelmente no pós-tratamento mas isto não garante o sucesso terapêutico (SILVA, 1998).

Dentre as numerosas drogas que foram empregadas em tentativas de tratamento da Doença de Chagas, destacam-se pelo menos três: o Nifurtimox (Lampit[®]), que é um nitrofurânico, o 349-C-59, um derivado 8-aminoquinoleínico cujo efeito teratogênico restringiu a continuidade de seu uso em pesquisas, e o Benzonidazol (Rochagan[®]), um derivado nitroimidazólico, que possui extensos efeitos colaterais, o que restringe sua comercialização, apesar de ser amplamente utilizado por pesquisadores e clínicos (SILVA, 1998).

Além disso, nenhuma das drogas desenvolvidas para o tratamento da Doença de Chagas possui um efeito terapêutico significativo na fase crônica sintomática, sendo indicadas apenas durante a fase aguda ou por curtos períodos pós-infecção, pois atuam bem como antiparasitárias. Para as complicações crônicas, a medicação é sintomática, como em outras cardiopatias e distúrbios gastrintestinais (REY, 1991).

Até então, o objetivo básico dos pesquisadores é manter a ação supressiva da droga durante o maior período possível (no mínimo 60 dias). Desse modo, a extinção na corrente sanguínea de todos os *T. cruzi* provenientes dos tecidos, em repetidos ciclos, terminaria evitando a invasão de novas células e, assim, pouco a pouco, conteria a infecção (SILVA, 1998).

Apesar das extensas investigações, nenhum novo fármaco tornou-se disponível para o tratamento da doença de Chagas desde 1970 (COURA e CASTRO, 2002; CROFT *et al*, 2003).

Sobretudo, o tratamento dos pacientes chagásicos enfrenta também o problema da marginalização econômica da grande parcela da população em que estão inseridos estes pacientes, o que muitas vezes impossibilita o tratamento. Em um estudo, a ABIFARMA (Associação Brasileira de Indústrias Farmacêuticas) divulgou que 15 milhões de famílias brasileiras com renda menor que um salário mínimo consomem, por ano, em medicamentos, o equivalente a US\$42,50 por pessoa. Porém estes valores não estão relacionados com uma melhoria na saúde do povo brasileiro, mas revelam a falta de um programa de saúde efetivo, bem como o alto custo de medicamentos alopáticos no Brasil (CARVALHO e RODRIGUES, 2001).

Os dados tornam-se mais alarmantes quando se compara o perfil anual de consumo de medicamentos entre países desenvolvidos e aqueles em desenvolvimento, revelando que nestes últimos, concentram-se apenas cerca de 30% da população mundial, mas estes gastam mais de 80% dos 49,5 milhões de dólares dispendidos mundialmente por ano com medicamentos. Nos países desenvolvidos, concentra-se cerca de 70% da população mundial e estes representam apenas 20% da arrecadação mundial no comércio de medicamentos por ano (CARVALHO e RODRIGUES, 2001).

Entre tantos fatores, nota-se a necessidade de reformulação no tipo de vida destes povos em desenvolvimento, por meio da aquisição de novos valores naturais, ecológicos, científicos, políticos, de conservação, de desenvolvimento e de práticas de utilização dos recursos naturais. Desta maneira, cada vez mais vem ganhando impulso a pesquisa com plantas medicinais como potencial fonte de novas terapêuticas para uma saúde melhor e

sustentável das camadas sociais mais carentes nos países em desenvolvimento (CARVALHO e RODRIGUES, 2001).

Apesar do Brasil possuir uma gama diversificada de espécies de plantas que cobrem sua extensa área territorial, o número de plantas registradas na Farmacopéia Brasileira com poder terapêutico comprovado ainda é muito reduzido, em comparação ao número de plantas utilizadas pela medicina popular (SILVA, 1996).

Nos estudos científicos que buscam novas drogas para tratar ou mesmo amenizar as complicações causadas pela infecção por *T. cruzi*, a etnofarmacologia destaca-se por ser uma ferramenta segura e promissora na busca de novos e potentes fármacos. A etnofarmacologia se baseia nas informações obtidas tradicionalmente incorporando produtos naturais em suas práticas voltadas à sobrevivência e manejo do meio ambiente, ou seja, é a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem, processo pelo qual se cria a medicina folclórica ou popular que é mantida por tradições culturais passadas de geração para geração (SIMÕES *et al.*, 2000).

Durante a investigação por novas drogas, a ciência acadêmica pode utilizar quatro critérios principais para seleção das plantas a serem estudadas: coleta aleatória (randomizada), coleta orientada pela quimiotaxonomia, coleta bi-racional (guiada pela ecologia química) e coleta baseada no conhecimento tradicional, que é o foco da etnofarmacologia. Os critérios usados pelas pessoas que possuem o chamado conhecimento tradicional, são baseados em quatro tipos de pensamentos: (a) similar à coleta randomizada, eles usam a “tentativa e erro” como estratégia na busca por novas drogas aliadas às chamadas “pistas sensoriais”, (b) do mesmo modo que a coleta bi-racional, o povo da floresta se põe a observar o comportamento de certos animais após o consumo de determinada planta e, a princípio, essas observações servem como pistas a serem seguidas

quando eles decidem experimentar uma planta em particular. Os outros dois critérios se diferenciam daqueles utilizados na ciência acadêmica: (c) estímulo sensorial (obtido ainda na infância, enquanto brincam na floresta com flores, folhas, e animais, dissecando, cheirando, e esmagando as plantas em um empenho para entender como elas funcionam) aliado à curiosidade inata destas pessoas. Iniciou-se assim, uma elaboração de uma correlação entre particularidades (morfológicas e organolépticas) de uma planta e seu uso potencial. Quando eles sentem a necessidade de um novo remédio, é quando eles consultam seu “banco de dados sensorial” para correlacionar a necessidade de uma particularidade específica de alguma planta. A curiosidade inata e a observação, aliadas a uma rica fonte de material vegetal, permite que novas prescrições sejam testadas assim que se mostrem necessárias. Ao testar uma planta “randomicamente”, a população utiliza essa “informação sensorial”. Este raciocínio é universal e segue os princípios da Doutrina das Assinaturas advogada por Paracelso (1493–1541) que especifica que é possível reconhecer as peculiaridades e virtudes de cada erva por sua “assinatura” (formato, aspecto, cor). (d) Finalmente, a intuição é de extrema importância na seleção de novas fontes a serem testadas: esses indivíduos são parte de um ambiente constituído de seres biologicamente interconectados (RODRIGUES, 2007).

A extensa informação sobre o uso de plantas medicinais em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem avaliar cientificamente o valor terapêutico das espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o é o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em se garantir o registro deste saber (SIMÕES *et al.*, 2000).

As camadas sócio econômicas mais baixas da população mundial possuem o conhecimento da medicina tradicional, o qual é extensivamente utilizado como a principal fonte de informações. Isto permitiu a descoberta da maioria dos medicamentos de origem natural disponíveis na medicina moderna. No entanto, o modelo econômico global não retorna a esta população os benefícios de uma farmacopéia tão grande como esta que temos disponível. Outro aspecto que deve ser apontado está no fato incontestável de que a maioria das espécies vegetais de interesse terapêutico está sendo exaustivamente utilizada sem controle e sustentabilidade provocando, em certos casos, um sério desequilíbrio ambiental. Esta alteração ambiental traz uma conseqüente diminuição das fontes de renda e perda do conhecimento popular, o que agrava ainda mais as condições desta população em relação ao acesso à assistência médica e à aquisição de medicamentos (DI STASI, 1996).

Os produtos naturais de origem vegetal são responsáveis pela riqueza de metabólitos ativos capazes de atuar nas mais variadas doenças. Os metabólitos naturais são divididos em primários, essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 2000), e secundários, que são necessários ao consumo intracelular e no decurso do processo evolutivo. Esses metabólitos secundários são fundamentais para a sobrevivência e interação adaptativa às mudanças do ambiente natural e para a reprodução e perpetuação da espécie (WILLIAMS *et al.*, 1989; DEMAIN, 1999).

Os produtos naturais continuam a ser procurados pelas indústrias agroquímicas e farmacêuticas como fontes de novas substâncias ativas principalmente para a utilização no tratamento de doenças crônicas e degenerativas (HARVEY, 2000; VERDINE, 1996).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças parasitárias é uma prática antiga (MESIA *et al.*, 2008). Muitas substâncias naturais e sintéticas apresentam atividade tripanocida em *T. cruzi*, mas a maior parte destas plantas foi testada *in vitro*, sem considerar seus efeitos no indivíduo como um todo, pois drogas com ação antiparasitária, em sua

maioria, apresentam efeitos colaterais consideráveis à saúde humana e animal (SEPÚVELDA-BOZA e CASSELS, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1998; KHABNADIDEH *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2001; CROFT *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; URBINA *et al.*, 1999).

Entre os complexos ecossistemas brasileiros, o cerrado destaca-se por contribuir com 10.000 espécies das 60.000 fanerógamas distribuídas pelo país. Esta vegetação, que ocupa 1/5 do território brasileiro, esconde um valioso tesouro terapêutico composto por ervas rasteiras, raízes, árvores e flores que podem ajudar no tratamento de inúmeras doenças. Estando o cerrado situado em regiões de maior desenvolvimento do Brasil Central, é natural que as espécies que compõem essa vegetação exerçam forte influência na medicina popular. (CARVALHO e RODRIGUES, 2001)

Assim, as plantas medicinais, utilizadas na forma de infusos, tinturas e extratos alcoólicos na medicina popular, são objeto de estudo dignos de respeito e são bastante promissores na descoberta de novas drogas. (SILVA, 1996)

Como modelos experimentais para estudos envolvendo a avaliação de atividade tripanocida de produtos naturais, os camundongos Swiss tem sido descritos como um modelo ideal devido ao desenvolvimento característico da infecção por *T. cruzi*, o que inclui uma típica curva parasitêmica na fase aguda, similar à que ocorre no homem. Porém, há a diferença de que o desenvolvimento da infecção nos camundongos ocorre em um curto intervalo de tempo, tornando-se ideal para propósitos de pesquisa. (SILVA, 1996).

Brosimum gaudichaudii (Moraceae), é uma planta do cerrado amplamente utilizada como medicinal no Brasil. Pozetti (1969) isolou duas substâncias (furocumarinas): psoraleno e bergapteno das raízes de *B. gaudichaudii* que são bem conhecidas por suas atividades fotosensibilizadoras. Essa planta é utilizada de várias maneiras por populações brasileiras no tratamento de vitiligo: a raiz é usada como chá, em forma de banhos, e o suco

da raiz triturada é adicionado como componente de pomadas e loções. Os frutos são usados como uma espécie de goma de mascar (VARANDA *apud* RIZZINI and MORS, 2002, p. 258). As plantas do gênero *Brosimum sp*, têm sido utilizadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios, anti-reumáticos (TORRES *apud* BERG, 1997, p. 347) e bebidas tônicas (ALCÂNTARA *et al.*, 2000; SHIROTA *et al.*, 1998). Na região do cerrado do Alto Paranaíba (Minas Gerais - Brasil) a *B. gaudichaudii* têm sido utilizada, na forma de extrato bruto, como tratamento antiparasitário, principalmente contra a Doença de Chagas.

As plantas utilizadas para fins medicinais podem apresentar uma ação terapêutica ou tóxica de acordo com a utilização, modo de preparo e tempo de tratamento, sendo de suma importância o controle dos possíveis efeitos adversos que o uso agudo pode acarretar ao organismo. Para tanto, os testes de toxicidade aguda são elaborados com o objetivo de prever os efeitos tóxicos ou averiguar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994).

O bioensaio de letalidade com *Artemia salina* (BST-Brine Shrimp Test), uma espécie de microcrustáceo marinho da ordem Anostraca, consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte (CAVALCANTE *et al.*, 2001). Este bioensaio de toxicidade aguda apresenta vantagens pela alta sensibilidade, fácil manipulação, semelhança dos limites dos efeitos tóxicos produzidos em *A. salina* com aqueles produzidos no homem e capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, deste modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismos-teste (KLASSEN *et al.*, 2001; BAROSA *et al.*, 2003).

Frente à deficiência de drogas para o controle e tratamento da Doença de Chagas e à necessidade de minimizar os prejuízos sócio-econômicos decorrentes desta doença, torna-se

necessário intensificar os estudos em busca de novos fármacos que se mostrem realmente seguros e eficazes no tratamento da tripanossomíase americana.

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* na infecção experimental de camundongos pelo hemoparasita *Trypanosoma cruzi*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade de diferentes doses do extrato bruto de *B. gaudichaudii* na infecção por *T. cruzi*, em camundongos, por meio da obtenção e análise das curvas parasitêmicas;

Avaliar a toxicidade aguda do extrato bruto de *B. gaudichaudii*, frente ao bioensaio com *Artemia salina* e determinação da DL50;

Investigar possíveis efeitos colaterais do extrato de *B.gaudichaudii*, administrado por intubação gástrica em camundongos;

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos da raça Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 8 semanas de idade, pesando em torno de 40 gramas, fornecidos pelo Biotério do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

3.2. MATERIAL VEGETAL

Foram coletadas amostras de *Brosimum gaudichaudii* no cerrado da região do Alto Paranaíba - MG. A identificação da espécie foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, da Faculdade de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP. As folhas foram processadas e armazenadas para preparação dos extratos.

3.3. *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa “Y” do *Trypanosoma cruzi*, fornecida pelo Biotério do UNIPAM e mantida por repiques semanais em camundongos.

3.4. PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Brosimum gaudichaudii*

As folhas de *B. gaudichaudii* foram selecionadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foram secas em estufa à temperatura de 40°C até atingirem nível de umidade de

10%. Logo após, foram pulverizadas em moinho de bolas e imersas durante 24 horas, sob agitação mecânica, em uma solução de etanol a 70%, na proporção de 100g de pó para cada 100mL de solução. Após este período, o extrato foi separado dos fragmentos da planta por filtragem à vácuo e levado ao evaporador rotatório, para retirada completa do álcool. A solução aquosa resultante foi armazenada à temperatura de 20°C.

3.5. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

3.5.1. Determinação da DL₅₀

Um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) após um jejum de 12 horas, foram tratados com uma dose oral de 500 mg/kg de peso corpóreo da solução de extrato vegetal. Caso não houvesse sinais de toxicidade, a substância não seria classificada em nenhuma das categorias mencionadas a seguir. Caso houvesse manifestação de toxicidade sem morte, a substância seria classificada como nociva. Se houvesse morte, proceder-se-ia a novo teste, agora com a dose de 50 mg/kg de peso corpóreo. A substância seria classificada como tóxica nos casos em que, com a dose menor, embora fossem detectados sinais de toxicidade, não se observasse mortalidade entre os animais. Se com esta dose, houvesse mortalidade entre os animais, a substância seria novamente testada na dose de 5 mg/kg de peso corpóreo. Neste caso, se fossem observados sinais de toxicidade e/ou mortalidade, a substância seria classificada como muito tóxica.

Por outro lado, se com a dose de 500 mg/kg de peso corpóreo não fossem observados sinais de toxicidade, seria necessário que se testasse a dose de 2.000 mg/kg de peso corpóreo, para avaliação total de riscos (OGA, 2003).

3.5.2. Bioensaio com *Artemia salina*

Os cistos (10mg) de *A. salina* foram incubados em um pequeno aquário contendo 100mL de solução salina pH 9,0 (cloreto de sódio – 34,2g, sulfato de magnésio – 1,425g, bicarbonato de sódio – 4,75g e água destilada, completando 1000mL de solução). Foi mantida à temperatura de 28°C e o estado de saturação de oxigênio foi obtido com auxílio de uma bomba. Após 24 horas, as larvas (náuplio) foram filtradas, recolocadas no aquário e mantidas em incubação por mais 24 horas, nas mesmas condições de temperatura e oxigênio. Após estas incubações as larvas atingiram o estágio de metanáuplio do microcrustáceo (cultura pura), que é mais sensível ao tratamento (McLAUGHLIN, 1982; VINATEA, 1994). Neste estágio, as larvas (n=10) foram colocadas em placas de cultura na presença de concentrações graduais do extrato de *Brosimum gaudichaudii* em triplicata. A análise foi feita comparativamente ao controle positivo e negativo após 24h e 48h de incubação na ausência de luminosidade. O controle negativo foi estabelecido com apenas larvas e solução salina. E o controle positivo, com as larvas e cloreto de sódio a 1% (NaCl 1%). O efeito tóxico da planta foi testado pelo Método de Meyer (1982) modificado para se adequar às condições do laboratório. Foi calculado o percentual de mortalidade para cada uma das concentrações testadas e controles. Foram consideradas larvas mortas, todas que não apresentassem qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação. Foram observadas: morte inferior a 50%, próximo a 50% e superior a 50%.

3.6. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *T. cruzi*.

A parasitemia foi determinada por meio de exame de sangue à fresco realizada do 5º ao 11º dia após a infecção segundo o método descrito por Brener (1962), e adaptado às condições do laboratório. A avaliação da infecção foi determinada individualmente pela contagem do número de parasitos presentes em 10 µL de sangue dos animais. O número de tripomastigotas (formas sangüíneas do *T.cruzi*) observados por campo foi multiplicado pelo fator de correção de 50.000 para calcular a quantidade de parasitas presentes em 1,0 mL de sangue circulante nos camundongos. (SILVA, 1996)

3.7. PRODUÇÃO DA INFECÇÃO CHAGÁSICA

Os camundongos foram infectados por injeção intraperitoneal de aproximadamente 50.000 formas sangüíneas do *Trypanosoma cruzi*. O inóculo desejado foi preparado a partir do sangue fresco, coletado por punção cardíaca em animal previamente infectado, com seringa heparinizada. Os animais assim infectados foram separados aleatoriamente para formar os grupos controles e experimentais. Cada animal infectado submetido à punção cardíaca foi previamente sacrificado por deslocamento cervical.

3.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Brosimum gaudichaudii*, POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA (GAVAGEM), NA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*.

O extrato foi administrado por meio de soluções de diferentes concentrações e administrado por gavagem aos animais. Os camundongos foram mantidos no Biotério do UNIPAM e alimentados com ração *ad libitum* e serragem de cama autoclavadas. As demais

condições, como iluminação e temperatura (ambiente), foram controladas para serem as mais uniformes possíveis.

Quarenta camundongos machos jovens, pesando aproximadamente 40 gramas, foram inoculados, intraperitonealmente (i.p.), com 5×10^4 formas sangüíneas de *T. cruzi* (cepa Y), e divididos em oito grupos, cada um deles composto por cinco animais. Quatro desses grupos foram destinados ao experimento de tratamento e quatro ao experimento de pré-tratamento.

3.8.1. Tratamento com diferentes doses do Extrato Bruto de *B. gaudichaudii*

Os grupos experimentais foram determinados de acordo com a concentração de extrato administrada no tratamento e o grupo controle consistia de camundongos chagásicos nos quais foi administrado por gavagem somente água. Os animais foram tratados com as seguintes concentrações de *Brosimum gaudichaudii* por intubação gástrica: G100 (100mg/kg), G200 (200mg/kg) e G400 (400mg/kg); e um grupo controle (GC - animais infectados administrados somente com água). Os valores obtidos na parasitemia foram utilizados para construir curvas parasitêmicas. A parasitemia foi determinada diariamente, por meio de microscopia óptica em 10 μ L de sangue coletados na cauda de cada animal (BRENER, 1962).

3.8.2. Pré-Tratamento com dose fixa do extrato bruto de *B. gaudichaudii*.

Para o pré-tratamento, os animais ingeriram 100mg/kg do extrato de *B. gaudichaudii* por intubação gástrica, em: 1 (GBg1), 3 (GBg3) e 7 (GBg7) dias antes da infecção e o grupo controle (GC) consistiu de animais infectados administrados somente com água. Os valores obtidos na parasitemia foram usados para construir curvas parasitêmicas. A parasitemia foi

determinada diariamente, por meio de microscopia óptica em 10 µL de sangue coletados na cauda de cada animal (BRENER, 1962).

3.8.3. Seguimento evolutivo da infecção

O acompanhamento para verificação da ocorrência de possíveis efeitos colaterais provenientes do uso do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* foi executado diariamente, durante 60 dias, a partir do início da administração do extrato por gavagem nos camundongos infectados por *T. cruzi* e no grupo controle (SILVA, 1996).

3.9. TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do Software SISVAR disponibilizado gratuitamente pela Universidade Federal de Lavras (UFLA, Lavras-MG, Brasil). Os dados foram inicialmente submetidos à análise de variância de duas vias (two-way ANOVA): quando as interações foram significativas, o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os valores das médias. O teste Kolmogorov–Smirnov foi empregado para comparar a parasitemia entre os grupos tratados e não tratados/infectados. Análise de variância de uma via ou teste Mann–Whitney U foi utilizado para comparar valores do período pré-patente, do período patente e parasitemia máxima, e o dia de parasitemia máxima, entre os diferentes grupos. Diferenças nos valores das médias foram consideradas significativas ao nível de $p < 0.05$ (ARANTES *et al*, 2007).

4. RESULTADOS

4.1. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

4.1.1. Determinação da DL₅₀

Foi testada a dose de 500 mg/kg, porém, não houve sinal de toxicidade. O teste para avaliação total de riscos, com a dose de 2000 mg/kg não foi executado, devido ao fato de que, neste caso, tal quantidade de extrato excederia a capacidade gástrica máxima dos animais experimentais.

4.1.2. Bioensaio com *Artemia salina*

A avaliação toxicológica por meio do bioensaio com *Artemia salina*, apresentou em todos os testes morte inferior a 50%, mesmo na dosagem mais alta.

4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Brosimum gaudichaudii*, POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA (GAVAGEM), NA PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*.

4.2.1. Avaliação do efeito do tratamento com diferentes doses do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii*, por intubação gástrica (gavagem), na parasitemia de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.

A avaliação da infecção foi determinada individualmente pela contagem do número de parasitos presentes em 10µL de sangue, coletado com micropipeta em uma secção na

cauda do animal e levado à contagem segundo o método de Brener (1962). Tal procedimento foi realizado entre o 5º. e o 11º. dias após a infecção, quando então foram obtidos os seguintes resultados.

Tabela 1 - Médias parasitêmicas da infecção por *T. cruzi* (cepa Y) obtidas do 5º. ao 11º. dias após a infecção em camundongos *Swiss* tratados com 100 mg/kg (G100), 200 mg/kg (G200) e 400 mg/kg (G400) de extrato bruto de *B. gaudichaudii* e grupo controle (GC).

Dias após a Infecção	G100	G200	G400	GC
5	5,8	25,4	12,4	17,6
6	8,4	44,2	36,4	35,4
7	215,8*	880,6*	584,4	501,6
8	591,8*	1200,0*	879,8	896,6
9	135,0	153,4	121,4	278,6
10	64,2	83,8	80,2	159,0
11	32,0	46,2	39,8	79,0

Nota: * significativo ao nível de $p < 0.05$

Os dados coletados foram utilizados para a construção das curvas parasitêmicas, como se segue:

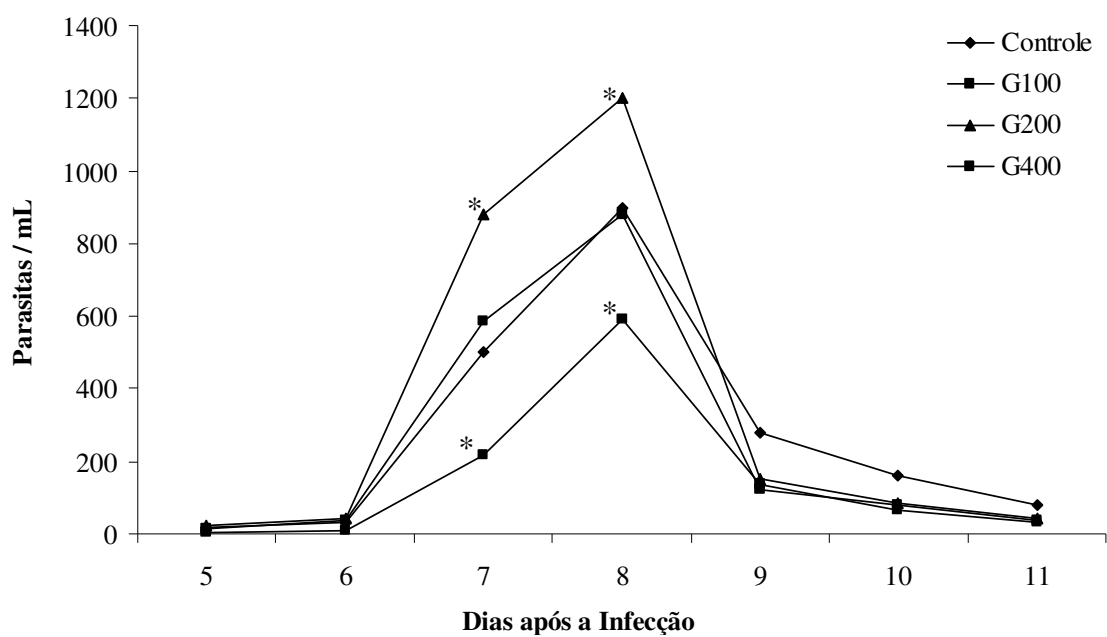


Figura 1 – Curvas parasitêmicas da infecção por *T. cruzi* (cepa Y), determinadas do 5º. ao 11º. dias após a infecção em camundongos *Swiss* tratados com 100 mg/kg (G100), 200 mg/kg (G200) e 400 mg/kg (G400) de extrato bruto de *B. gaudichaudii* e grupo controle. * significativo ao nível de $p < 0.05$

4.2.2. Avaliação do efeito do pré-tratamento com extrato bruto de *B. gaudichaudii* a partir de diferentes dias antes da infecção, por intubação gástrica (gavagem), na parasitemia de camundongos infectados por *T. cruzi*.

Tabela 2 – Médias parasitêmicas obtidas do 5º. ao 19º. dias após a infecção por *T.cruzi*, dos grupos pré-tratados com extrato bruto de *B. gaudichaudii* a partir de diferentes dias (GBg7 – 7 dias, GBg3 -3 dias e GBg1 – 1 dia) antes da infecção e grupo controle (GC).

Dias após a Infecção	GBg7	GBg3	GBg1	GC
5	7,4	5,8	6,2	19,2
6	9,6	7,0	15,4	26,2
7	8,8	6,2	17,4	39,2
8	10,2*	8,2*	26,0*	643,8
9	7,0*	9,2*	38,0*	426,6
10	12,2	11,0	47,4	54,2
11	81,0	38,0	99,6	97,6
12	64,4	391,4*	343,8*	64,4
13	43,0	521,8*	75,6	43,0
14	69,4	142,6	42,4	26,8
15	52,0	64,0	35,2	17,6
16	46,8	42,0	34,0	15,2
17	10,0	25,6	12,4	11,0
18	8,0	22,2	9,0	8,4
19	4,2	12,0	2,0	5,0

Nota: * significativo ao nível de $p < 0.05$

Os dados da tabela foram utilizados para a construção das curvas parasitêmicas, como se segue:

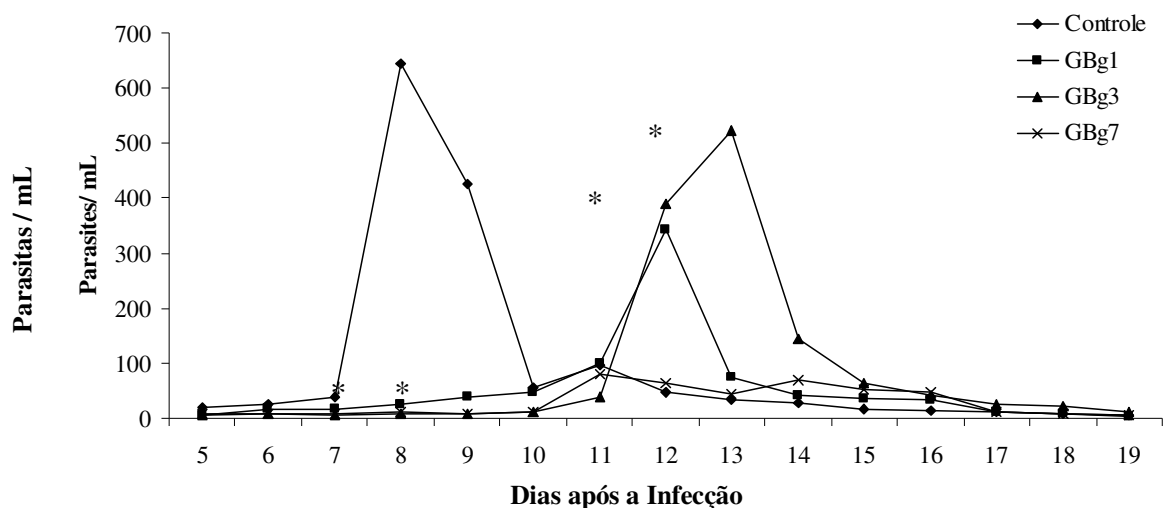


Figura 2 – Curvas parasitêmicas da infecção por *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), determinadas do 5º. ao 19º. dia após a infecção em camundongos *Swiss* pré-tratados com 100 mg/kg de extrato bruto de *B. gaudichaudii*, iniciando-se em diferentes dias antes da infecção (GBg7 – 7 dias, GBg3 – 3 dias e GBg1 – 1 dias) e grupo controle. * significativo ao nível de $p < 0,05$

4.3 - INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS DO EXTRATO BRUTO DE *B. gaudichaudii*, ADMINISTRADO POR INTUBAÇÃO GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS.

Durante o acompanhamento para observação de possíveis efeitos colaterais provenientes do uso do extrato bruto de *B. gaudichaudii*, não foram observadas alterações significativas dos parâmetros comportamentais habituais.

5. DISCUSSÃO

Estudos sobre a toxicidade da *Brosimum gaudichaudii* demonstraram a presença de furanocumarinas, as quais mostraram um potencial tóxico *in vivo* (POZETTI, 1969; VARANDA *et al.*, 2002). Entretanto, o extrato e suas frações avaliados nesses experimentos foram obtidos da parte inferior do caule e das raízes, e o solvente utilizado na extração foi o metanol (POZETTI, 1969). De acordo com Simões *et al.* (2000), diferentes partes de uma mesma planta contém múltiplas variedades e concentrações de princípios ativos, e o uso de diferentes tipos de solventes durante o processo de extração, pode ser bastante seletivo acerca da extração desses princípios, o que está relacionado com a polaridade desses compostos. Em nosso estudo, foram utilizadas as folhas da planta, e a extração realizada utilizou solvente hidro-alcoólico (etanol/água 70:30), o que pode explicar a ausência de efeitos tóxicos agudos. Além do mais, Leão *et al.* (2005) realizaram ensaios toxicológicos clínicos de um produto farmacológico chamado Viticromin[®], produzido com a parte inferior do caule e das cascas das raízes de *B. gaudichaudii*, e para a metodologia aplicada, não houve indícios de sinais de toxicidade. O potencial toxicológico do uso crônico do extrato hidro-alcoólico da *B. gaudichaudii* não foi avaliado em nosso estudo.

Os psoralenos são metabólitos secundários encontrados em muitas plantas e vegetais. Furanocumarinas, bergapteno e psoraleno são os principais componentes (60%) do extrato metanólico de *B. gaudichaudii* (VARANDA *et al.* 2002), o que indica que a atividade tripanocida observada pode ter sido induzida por esses agentes devido à sua capacidade de produzir radicais óxidos e superóxidos que são importantes no processo de eliminação dos parasitos (VESPA *et al.*, 1994).

O extrato concentrado a 100 mg/kg apresentou um resultado positivo (30%) na redução do número de tripomastigotas quando comparado com as doses mais altas. Isso

pode ser explicado pelo metabolismo saturável (farmacocinética não-linear) e, em um nível farmacodinâmico, a capacidade de saturação na interação dos complexos droga-proteínas plasmáticas. Portanto, as concentrações, mais altas do extrato não atingiram um resultado positivo possivelmente devido à superdosagem (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Entretanto, a multiplicação do parasito, na forma amastigota (NEVES, 2005), deve ter sido afetada pelos componentes do extrato, o que explica o aparecimento de picos parasitêmicos em diferentes dias após a infecção nos grupos pré-tratados. De acordo com Vespa et al. (1994), a resposta imune relacionada à infecção por *T. cruzi* está diretamente relacionada à produção endógena de reativos de oxigênio, principalmente, o óxido nítrico (NO). Portanto, as respostas obtidas no pré-tratamento em diferentes dias podem estar relacionadas à ativação da resposta imune. No grupo GBg1, os componentes do extrato reduziram a parasitemia em 50% devido à ativação da resposta imune, levando a um aumento inicial nos níveis de NO, que modulam a resposta específica à infecção parasitária. O grupo GBg3 apresentou um resultado menos expressivo na redução da parasitemia (12%), provavelmente devido aos mecanismos de compensação no organismo do hospedeiro, em resposta à acidose metabólica causada pelo aumento inicial nos níveis de NO (KENGATHARAN *et al.*, 1996). Por outro lado, o grupo GBg7 apresentou um resultado bastante expressivo na redução da parasitemia (73%) supostamente ocasionado tanto pela estabilização dos níveis do extrato na corrente sanguínea (atingido após 5 tempos de meia-vida) quanto pela estabilização da resposta imune contra o parasito (GOODMAN e GILMAN, 2003).

No entanto, há a presença de componentes ativos no extrato bruto de *B. gaudichaudii* capazes de diminuir o número de *T. cruzi* na corrente sanguínea, retardando a infecção em camundongos pré-tratados. Desta forma, atrasando a parasitemia, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) permanecem disponíveis na corrente sanguínea por um período mais

prolongado, tornando mais fácil sua eliminação neste estágio, além do que, as drogas utilizadas no tratamento farmacológico da Doença de Chagas tornam-se aptas a agir com um maior sucesso terapêutico (SILVA, 1996; GOODMAN e GILMAN, 2003), evitando a migração do *T. cruzi* para os tecidos e o desenvolvimento de seu próximo estágio, a formação dos ninhos de amastigotas. A invasão tecidual é a causa das principais manifestações clínicas do sistema digestivo (megaesôfago e megacólon) e circulatório (cardiomegalia) típicas dos pacientes portadores da Doença de Chagas (NEVES, 2005).

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o extrato hidro-alcoólico bruto das folhas de *B. gaudichaudii* não apresenta efeitos tóxicos agudos de acordo com as análises realizadas, e inibiu e retardou o desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi* no tratamento e pré-tratamento de camundongos chagásicos. Esses resultados parcialmente dão suporte ao uso tradicional da *B.gaudichaudii* como tratamento para a Doença de Chagas e incitam mais estudos visando a análise dos princípios ativos contidos no extrato bruto de suas folhas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, A. F. C.; SOUZA, M. R.; PILÓ-VELOSO, D. Constituents of *Brosimum potabile*. **Fitoterapia**, São Paulo, v.71 , p.613-615, 2000.
- ARANTES, J.M.; PEDROSA, M.L.; MARTINS, H.R.; VELOSO, V.M.; LANA, M.; BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; CARNEIRO, C.M. Trypanosoma cruzi: Treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v.117, p.43–50, 2007.
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. SOUSA, I. Teste de toxicidade do íon cobre para *Artemia salina*. **Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente**, Rio de Janeiro, 2003. p.17.
- BERG, M. E. Van den (1982) *Plantas Mediciniais da Amazônia. Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático*, 2ª. ed., Belém, 1982, p.97
- BRENER, Z., Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p.389–396, 1962.
- CARVALHO, D.A, RODRIGUES, V.E.G. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 180 p.
- CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, Á. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Química Nova**, São Paulo, vol.23, 2001.
- CIMERMAN, B; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ºed, Atheneu, São Paulo, 2002. 390 p.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p. 165-172, 2003.
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.18, p.26-31, 2000.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.
- DI STASI, C. L. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudos interdisciplinar. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.
- FILHO, G.B.; PITELLA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. **Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 1103.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. **Ecotoxicology in Theory and Practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. p.247.

GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. In: HARDMAN, J.G. LIMBIRD, L.E. (eds.), 10. ed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2003. p.1-35.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drugs Discovery Today**, v.5, p.294-300, 2000.

IANNI, B.M., MADY, C. Terapêutica da forma crônica da Doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico? **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 1, p. 59-60, 1998.

KENGATHARAN, K.M., DE KIMPE, S.J. & THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. **British Journal of Pharmacology**, n119, p.1411–1421, 1996.

KHABNADIDEH, S.; TAN, C. L.; CROFT, S. L.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; GILBERT, I. H. Squalamine analogues as potencial anti-trypanosomal and leishmanial compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 1237-1239, 2000.

KLASSEN, C.O.; WATKINS, J.B. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**. 5 ed., Lisboa: McGraw-Hill, 2001. 187 p.

LEÃO, A.R.; CUNHA, L.C.; PARENTE, L.M.L.; CASTRO L.C.M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H.E.; RODRIGUES, V.B.; BASTOS, M.A. Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin[®] em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2 n. 1, p.15-23, 2005.

McLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumors on potato discs and Brine shrimp lethally. Two simple bioassay for higher plants screening and fraction. **Methods in Plants Biochemistry**. V.6, p. 2-27, 1982.

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

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. n.45 (v.5), p. 31-34, 1982.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER; M.A. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 51, 510, 530.

NACRUTH, R.S. **Doença de Chagas**. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 1991. 239 p.

NEVES, D. P; **Parasitologia Humana**. 11^oed. São Paulo: Atheneu, 2005. 428 p.

OLIVEIRA, R. B.; PASSOS, A. P. F., ALVES, R.O.; ROMANHA, A.; PRADO, M. A. F.; FILHO, J. D. S.; ALVES, R. J. *In vitro* evaluation of the activity of aromatic nitric compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.141-144, 2003.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 2ª ed, São Paulo: Atheneu, 2003. p. 62-63.

POZETTI, G.L. Contribuição ao estudo químico do *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 1. Isolamento e identificação do bergapteno e do psoraleno das raízes do *Brosimum gaudichaudii* Trécul. **Revista Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, v.3, p.215-223, 1969.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 150-151.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. Botânica Econômica Brasileira. FPU-EDUSP, São Paulo, 1976, p. 12.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.295-302, 2007.

RODRIGUEZ, J. B.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R.; WIMMER, Z.; GROS, E. G. Growth inhibitory effect of juvenile hormone analogues on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medical Chemistry Letters**, v.8, p.3257-3260, 1998.

SEPÚVELDA-BOZA, S.; CASSELS, B. K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 62, p. 98-105, 1996.

SHIROTA, O.; SEKITA, S.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; HAYASHI, T.; YANAGAWA, T.; SATAKE, M. Two chalcone-prenylcoumarin diels-alder adducts from *Brosimum rubens*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1381-1385, 1998.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 1110.

SILVA, R. M. G. **Efeito do extrato bruto de *Mandevilla velutina* (apocinaceae) na infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi***. 1996, 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1996.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed., Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 1819 p.

TORRES, S. L.; MONTEIRO, J. C. M.; ARRUDA, M. S. P., MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, Vol. 44, No. 2, Ed. Elsevier, p. 347-349, 1997.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' Disease: the how and the why. **Journal of Molecular Medicine**, v.77, p. 332-338, 1999.

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, Ed. Elsevier, p.257-264, 2002.

VERDINE, G. L.; The combinatory chemistry of nature. **Nature**, v.384, p. 11-13, 1996. Supplementum.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v.62, n.11, p. 5177-5182, 1994.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure Applied Chemistry**, v.73, p. 617-622, 2001.

VINATEA, L. E. Artemia um ser vivo excepcional. **Panorama da aqüicultura**. v. 4, nº 25, p. 8-9, 1994.

WEISS, C. R.; MOIDEEN, S. V. K; CROFT, S. L.; HOUGHTON, P. J. Activity of extracts and isolated naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Plasmodium falciparum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1306-1309, 2000.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P.R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1189-1208, 1989.