



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito do Extrato Bruto de *Ginkgo biloba* na  
Parasitemia e Mortalidade de Camundongos  
Infectados Experimentalmente com  
*Trypanosoma cruzi*

*Tatyana de Almeida Silva*

Monografia apresentada à coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG  
Dezembro, 1999



Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Curso de Ciências Biológicas

Efeito do Extrato Bruto de *Ginkgo biloba* na  
Parasitemia e Mortalidade de Camundongos  
Infectados Experimentalmente com  
*Trypanosoma cruzi*

Tatyana de Almeida Silva

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi

Monografia apresentada à coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG  
Dezembro, 1999



Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Curso de Ciências Biológicas

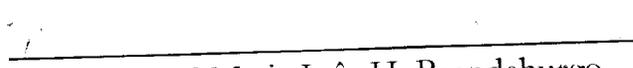
Efeito do Extrato Bruto de *Ginkgo biloba* na  
Parasitemia e Mortalidade de Camundongos  
Infectados Experimentalmente com  
*Trypanosoma cruzi*

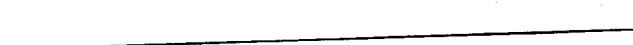
Tatyana de Almeida Silva

Aprovada pela Banca Examinadora em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Nota \_\_\_\_\_

Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Curso de Ciências Biológicas  
Banco de Matrizes de Matrizes de Matrizes

  
Prof.ª Dr.ª Amélia Hamaguchi

  
Prof.ª Dr.ª Maria Inês H. Brandeburgo

  
Msc. Fábio Tonissi Moroni

Uberlândia - MG; 16 de Dezembro de 1999

*Dedico o presente trabalho aos  
meus pais, Sérgio e Célia,  
que sempre me incentivaram e  
apoiaram minhas decisões*

*Aos meus familiares e avós  
sempre dispostos a ajudar em  
tudo e a Rodrigo Vinicius pelo  
carinho e dedicação*

*A Deus, por tudo o que  
conquistei...*

# Agradecimentos

À professora Dr.<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi por sua orientação e profissionalismo que me auxiliaram na carreira científica e no meu crescimento pessoal e profissional. E também pela maneira como nos considera e auxilia.

Aos amigos Fábio Tonissi Moroni e Francislene Glória de Freitas pelos métodos ensinados para a realização dos experimentos e pela ajuda na preparação do extrato bruto liofilizado de **Ginkgo biloba**.

A Regildo Márcio pelos ensinamentos na preparação do extrato vegetal e no trabalho com **Trypanosoma cruzi**.

À Maria Inês Homs Brandeburgo pelos conselhos que contribuíram para o crescimento do meu conhecimento.

Aos meus professores, aos funcionários da UFU e colegas de curso que estiveram presentes em toda a minha vida acadêmica.

A todos os companheiros de laboratório, tanto funcionários como estagiários, sempre juntos em todos os momentos e atividades, especialmente, Sebastiana Abadia Inácio.

Em especial aos amigos Francis, Kátia e Fabiana Kimie pelo auxílio moral e profissional que me incentivaram em todos os momentos.

Aos amigos Gilvan, Renata, Andreia, Ana Paula, Grace, Selma, Willian e demais, pelo companherismo.

A Rodrigo Vinícius dos Santos pelo incentivo, paciência, e por sair de seus estudos e ocupações para me levar à faculdade ou onde fosse preciso a qualquer hora. Eternos agradecimentos por toda dedicação e carinho.

*“Só a paciência, a tolerância e um amor desinteressado poderão ajudar uma alma a desabrochar para perfumar a sua própria existência.”*

Cenyra Pinto

## SUMÁRIO

I- Introdução .....	01
II- Objetivo .....	07
III- Material e Métodos .....	08
3.1. <i>Ginkgo biloba</i> .....	08
3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	08
3.3. Animais .....	08
3.4. Extrato bruto liofilizado (EBL) de <i>Ginkgo biloba</i> .....	09
3.5. Extrato bruto de <i>Ginkgo biloba</i> obtido no comércio .....	10
3.6. Determinação da parasitemia .....	10
3.7. Coleta de sangue para repique e montagem dos experimentos .....	10
3.8. Atuação do EBL de <i>G. biloba</i> em camundongos infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i> no pré-tratamento seguido de tratamento .....	11
3.9. Atuação do extrato bruto (EB) de <i>G. biloba</i> obtido no comércio local, em camundongos infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i> .....	12
3.10. Atuação do EB de <i>G. biloba</i> obtido no comércio local, em camundongos infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i> no pré-tratamento seguido de tratamento .....	13
3.11. Seguimento evolutivo dos animais .....	13
3.12. Efeito tripanomicida do EBL de <i>G. biloba</i> , <i>in vitro</i> .....	14
3.13. Teste da toxicidade do extrato de <i>G. biloba</i> .....	15
3.14. Análise Estatística .....	16
IV- Resultados .....	17
V- Discussão e Conclusão .....	35
VI- Referências Bibliográficas .....	43

## RESUMO

### **Efeito do Extrato Bruto (EB) de *Ginkgo biloba* na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*.**

O extrato de *Ginkgo biloba* vem sendo utilizado para as mais diversas enfermidades, principalmente em disfunções da memória, além de aumentar a resposta imunológica do organismo. Diante das várias atribuições farmacológicas do mesmo, objetivou-se testar o efeito desse extrato na Doença de Chagas. Foram utilizados dois extratos: feito com as folhas no laboratório e o preparado comercial. As folhas da árvore de *G. biloba* foram lavadas e, em seguida, imersas em uma solução de água sanitária 20%; foram novamente lavadas em água destilada e trituradas com água desionizada no liqüidificador. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro e algodão, e posteriormente liofilizada. Após esse passo, o EBL de *G. biloba* foi diluído nas concentrações desejadas. O extrato obtido no comércio foi diluído nas concentrações desejadas e filtrado a vácuo. Os camundongos utilizados foram da raça Swiss (machos, 28-32g, 5 semanas), mantidos em condições de ração e água *ad libitum* e temperatura ambiente. Estes foram separados em grupos de 5 animais para a montagem dos experimentos. Utilizou-se o extrato nas doses de 200, 400 e 800mg/kg de animal pela via orogástrica. Foi concluído que o EBL de *G. biloba*, nas doses de 200 e 400mg/kg - pré-tratamento seguido de tratamento, atua diminuindo o número de parasitos significativamente ( $p < 0,05$ ) e aumentando o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi*, principalmente a dose de 400mg/kg. Já o E B de *G. biloba* obtido no comércio local não apresenta diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle, tanto no tratamento pós-infecção como no pré-tratamento/tratamento. Para o experimento *in vitro* utilizou-se as doses de 10, 20 e 30mg/ml no sangue contendo *T. cruzi*, incubado com EBL (24 e 48 horas), resultando na redução das formas tripomastigotas. Verificou-se também, que a concentração de 10mg/ml de EBL foi mais eficaz. A toxicidade aguda do extrato também foi testada utilizando-se as seguintes doses para o EB obtido no comércio: 5mg/kg, 500mg/kg e 5g/kg de animal; e 5g/kg de animal para o EBL. Neste teste observou-se que tanto o EB obtido no comércio quanto o EBL não apresentaram toxicidade aguda aparente. Conclui-se que o EBL de *G. biloba* atua reduzindo a parasitemia e aumentando o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi* experimentalmente. O mesmo não ocorre com o extrato obtido no comércio.

## I-INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas durante as várias épocas da história humana, cujo acúmulo de informações, obtido pela experiência de cada civilização, constitui milênios de história, desde quando a maior parte dos recursos medicamentosos provinham dos vegetais (MING, 1994).

Desde o início do século XX, com o advento da síntese química, os quimioterápicos foram substituindo as plantas medicinais, sendo bem aceitos pela população, mesmo que muitos causem a dependência química e bloqueiem mecanismos imunológicos, agredindo o organismo. Por tais motivos, há uma tendência ao retorno às plantas medicinais, segundo pesquisas do Centro Internacional de Comércio (*ibid.*, 1994).

A pesquisa com plantas medicinais parte do conhecimento popular acumulado e específico, conforme cada situação sócio-cultural das comunidades envolvidas. De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), 80% da população mundial utiliza principalmente a medicina popular para solucionar as necessidades primárias de assistência médica, daí a importância desse passo na pesquisa (*ibid.*1994).

Além disso, o levantamento desse patrimônio é fundamental e deve ser realizado rapidamente pois, em geral, esse conhecimento está concentrado em populações isoladas ou rurais. Contudo, o estudo da biologia floral, a correta identificação da planta e o conhecimento de

seus nomes populares, são fatores que permitem determinar práticas mais adequadas para a produção de princípios ativos em quantidade e qualidade desejadas (*ibid.*, 1994).

Na Europa, Estados Unidos da América, China e Índia, o uso de medicamentos de origem vegetal é maior do que os quimiossintéticos. No Brasil, não se dispõe de dados seguros, porém, a tendência em acompanhar o restante do mundo é relevante (*ibid.*, 1994). Portanto, seria prejudicial a desvalorização do potencial deste país, uma vez que a região tropical brasileira contém uma grande variedade de plantas medicinais, sendo algumas destas vindas de outros países, como é o caso da *Ginkgo biloba*.

A *Ginkgo biloba* é uma árvore oriental que pode chegar até a 40 metros de altura. É uma planta dióica, com folhas em formato de leques e, no outono, adquire diversos tons de amarelo; e além de adaptar-se bem ao clima temperado (FRANCO, 1997), de suas folhas se extraem substâncias que atuam sobre o metabolismo de vários órgãos. Tais substâncias, Ginkgolídeos e Bilobaídeos, são utilizadas, principalmente, em disfunções da memória, cerebrais e transtornos vasculares periféricos.

Foi verificado que o extrato de *G. biloba* (EGB) constitui um potente antagonista do PAF (Fator de Ativação de Plaquetas), melhora a circulação sangüínea, reduz coceiras, varizes, vertigens e auxilia nas dificuldades sexuais. Em contrapartida, pode provocar hematomas (se usado continuamente) e associado à aspirina pode provocar sangramentos espontâneos. Como o PAF vem sido caracterizado como agente tóxico em processos de isquemia-reperusão intestinal, levantou-se a possibilidade de atuar por meio da formação de radicais livres. Além disso, o EGB é muito rico em quercetina, destruidor de Radicais Livres, mostrando uma ação anti-oxidativa (PÓVOA, 1993), adstringente, antifúngica, antibacteriana, antidepressiva, antidiabética, antilabirintite, antiAIDS e retinopatia, aumentando a resposta imune (FRANCO, 1997).

Os ginkgolídeos antioxidantes e neuroprotetores possuem atividades colinérgicas relacionadas com os mecanismos da Doença de Alzheimer. A eficácia terapêutica do extrato nesta doença foi semelhante às drogas atualmente utilizadas, porém, com mínimos efeitos colaterais (PERRY *et al.*, 1998).

Pelos relatos existentes de que a *Ginkgo biloba* aumenta a resposta imune do organismo, pode-se dizer que, por tal motivo, ajuda no combate das várias doenças já mencionadas e, talvez, de doenças ainda não testadas com essa planta. Além disso, com o transcorrer dos tempos, novas doenças de interesse mundial foram surgindo, como a AIDS e canceres, aumentando cada vez mais o número de vítimas. Com isso, o estudo das plantas medicinais aumentou.

Os quimioterápicos muitas vezes não possuem efeitos satisfatórios para determinadas patologias pois, além de não curarem, podem causar graves efeitos colaterais. Daí a importância de se estudar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre tais doenças, inclusive com a tripanossomíase americana ou Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi*, um flagelado da família Trypanosomatidae, parasita mamíferos e tem como hospedeiros invertebrados várias espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae. Esse parasito apresenta diferenças morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à infectividade e patogenicidade. Já foram descritas mais de 60 linhagens ou cepas, segundo diferentes critérios, sem se estabelecer uma sistematização entre elas. As cepas Y (mais patogênica) e CL (menos patogênica), têm sido consideradas como tipos "polares", todas as demais variedades isoladas e caracterizadas estão incluídas ou situadas entre esses dois extremos (REY, 1991).

No ciclo evolutivo do *T. cruzi*, há multiplicação de formas epimastigotas no intestino posterior de triatomíneos; na ampola retal, os parasitos transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que são

eliminados com as fezes. Ao penetrar, através da pele lesada, no hospedeiro vertebrado, os flagelados invadem células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) cutâneo onde, sob a forma amastigota, voltam a multiplicar-se, indo para o sangue, como tripomastigotas, e disseminam-se pelo organismo, atacando músculo e outros tecidos. O ciclo fecha-se quando o paciente é sugado por outro triatomíneo e as formas sangüícolas chegam ao intestino do inseto (*ibid.*, 1991).

A Doença de Chagas é uma moléstia endêmica na América Latina, abrangendo uma área que vai desde o norte do México até o sul da Argentina e Chile, e afeta cerca de 16 milhões de pessoas. Estima-se que no Brasil há aproximadamente 8 a 9 milhões de pacientes com essa moléstia (PEDROSA *et al.*, 1993), que causa mortes precoces em populações adultas, gera perda na produtividade pessoal e absenteísmo. Além disso, o custo médico-social é alto, incluindo o tratamento médico, internações hospitalares, cirurgias corretivas, marcapassos, entre outros. E dentre as manifestações clínicas, a cardiopatia crônica é a que causa o maior impacto devido sua incidência e gravidade (DIAS, 1994).

Segundo CUNHA-NETO e cols. (1995), estima-se que no Brasil ocorram 2 a 3 milhões de casos de cardiopatia chagásica crônica, com evolução de cerca de 30% dos infectados e, em humanos, o parasito mostra preferência por células musculares cardíacas.

A parasitemia começa a ser intensa após 10 à 15 dias da contaminação, correspondendo à fase aguda da doença. Neste período a parasitemia pode crescer e levar o paciente à morte, ou diminuir, por interferência do sistema imune e, assim, o paciente entra na fase crônica, na qual pode permanecer durante anos (CUNHA, 1995). BRENER *apud* SILVA (1999) complementa dizendo que a fase aguda é inicial, rápida e geralmente assintomática, e se caracteriza por apresentar uma curva parasitêmica característica, relacionada com a proliferação intracelular do *T. cruzi*, que sai para o meio extracelular, permitindo a quantificação dos parasitos.

De acordo com BARRETO e cols. *apud* SILVA (1999), a fase crônica inicia-se após a fase aguda da doença na forma indeterminada ou latente, que se identifica pela infecção por *T. cruzi*, sem manifestações clínicas, na maioria dos pacientes, sendo considerada o período mais longo da doença.

Em camundongos experimentais, a parasitemia é intensa, ou seja, apresenta seu pico entre o 6º e o 10º dia, destacando-se, principalmente, no 7º dia, constituindo a fase aguda da doença, onde podem ocorrer óbitos e, após esse período, a fase crônica se estabelece, podendo ou não levar os animais ao óbito. Dentre todos os modelos experimentais, os camundongos destacam-se por apresentarem maior nitidez no desenvolvimento das fases características da doença ( SHERLOCK *apud* MORONI, 1998).

A Doença de Chagas humana, disseminou-se entre as populações rurais, principalmente transmitida pelas fezes infectadas do inseto vetor (triatomíneos), no interior de habitações infestadas pelos mesmos. Mas outras vias de transmissão são conhecidas como a transfusional e a congênita (DIAS, 1994). Cabe também citar as infecções acidentais em laboratório, consultórios odontológicos, hospitais onde se manipula material contaminado e em transplantes de órgãos.

O tratamento da Doença de Chagas humana pode ser específico ou sintomático. O específico é justificável para todos os casos agudos da infecção, com perspectiva de cura parasitológica oscilando entre 50 e 90% dos casos. Quando acompanhados por um longo período, os indivíduos tratados, se curados na fase aguda, não desenvolvem as formas crônicas sintomáticas da doença. Esse tratamento também se justifica aos casos congênitos da infecção logo após o nascimento. Já o tratamento sintomático é muito importante e pode prevenir e minorar os danos tardios da doença (DIAS, 1994).

Testes experimentais, com plantas medicinais, em camundongos têm sido feitos com o objetivo de encontrar tratamentos mais eficazes para a Doença de Chagas. SILVA (1996) testou o extrato bruto

liofilizado do rizoma de *Mandevilla velutina* em animais infectados com *T. cruzi* e obteve resultados promissores no que diz respeito à redução da quantidade de parasitos e aumento da sobrevivência dos animais, principalmente nos tratados com a dose do extrato de 200mg/kg de animal.

Muito ainda deve ser feito no combate a essa doença que acomete centenas de pessoas a cada ano. Para tal, algumas medidas devem ser tomadas como melhorar as habitações, evitar desmatamentos, controlar o número de insetos, entre outras. O tratamento das pessoas infectadas é um passo importante no combate à doença, apesar dos medicamentos serem caros e com muitos efeitos colaterais. Isto justifica a importância da pesquisa de plantas que ajudem no tratamento da Doença de Chagas, com baixo custo e com efeitos colaterais mínimos ou ausentes.

## II-OBJETIVOS

Estudar a atuação do extrato bruto de *Ginkgo biloba* na sobrevivência e na parasitemia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Estudar a atuação do extrato bruto liofilizado (EBL) *in vitro* em sangue contaminado com *T. cruzi*.

Estudar a toxicidade aguda do extrato bruto (EB) de *G. biloba* em camundongos.

### III-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- *Ginkgo biloba*

Foram utilizados dois tipos de EB de *G. biloba*:

- Extrato bruto liofilizado (EBL); obtido a partir das folhas da árvore de *G. biloba* coletadas no outono, de um único indivíduo, na região da grande São Paulo.

- Extrato bruto obtido no comércio local, comprado em uma farmácia de manipulação de Uberlândia.

#### 3.2- *Trypanosoma cruzi*

Utilizou-se a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* proveniente da Faculdade de Medicina do Triângulo, Uberaba-MG, que foi mantida no Laboratório de Bioquímica (DEGEB-UFU) por repiques semanais utilizando-se camundongos para inoculação.

#### 3.3 - Animais

Os camundongos raça Swiss, padrão sanitário convencional, com aproximadamente 5 semanas, peso médio de 30 gramas; foram

fornecidos pelo Biotério do Vallée S/A ou Pentapharma. No laboratório de Bioquímica do DEGEB-UFU foram mantidos em condições apropriadas com ração e água filtrada *ad libitum*, em temperatura ambiente e gaiolas desinfetadas contendo maravalha.

### **3.4- Extrato Bruto Liofilizado (EBL) de *Ginkgo biloba***

#### **3.4.1- Trituração das folhas com água e filtração**

As folhas foram selecionadas, ou seja, as contaminadas por fungos ou muito danificadas foram excluídas. As folhas em boas condições foram então lavadas com água desionizada, tomando-se o cuidado de limpá-las bem.

Em seguida, estas foram mergulhadas em uma solução de água sanitária a 20%, durante 20 minutos para a desinfecção.

Novamente, as folhas foram lavadas com água desionizada retirando-se todo o resíduo de água sanitária. Após esse passo, distribuiu-se as mesmas em uma superfície e levou-as à estufa para secar em temperatura de, aproximadamente, 40°C. Depois de secas, elas foram pesadas e trituradas no liqüidificador com água desionizada, numa proporção de 15g para 250ml. Essa solução foi armazenada em um recipiente opaco de plástico ou em um vidro escuro a fim de não entrar em contato direto com a luz, evitando a perda de princípio ativo.

A solução foi coada em uma peneira com gaze e, em seguida, filtrada a vácuo, onde utilizou-se o Kitassato com funil de porcelana e, neste último, colocou-se duas folhas de papel de filtro qualitativo. A solução foi armazenada para posterior liofilização.

As folhas trituradas, utilizadas para se obter a solução acima referida, foram ressuspensas em outros 250ml de água desionizada, para a produção de mais EBL.

### **3.4.2- Extrato aquoso**

A solução obtida foi distribuída em frascos, congelada e, posteriormente, levada ao liofilizador. Os frascos foram vedados com "Parafilm M (Sigma)", que recebeu perfurações com agulha.

Depois de liofilizar a solução, o material obtido foi pulverizado com Grau e Pistilo e pesado. O pó obtido foi armazenado no freezer em um recipiente opaco ou escuro para, posteriormente, ser utilizado nas concentrações desejadas, ressuspendido em água filtrada.

## **3.5- Extrato Bruto (EB) de *Ginkgo biloba* Obtido no Comércio**

### **3.5.1- Extrato aquoso**

O extrato de *Ginkgo biloba* obtido no comércio local já estava na forma de pó, necessitando-se apenas ressuspendê-lo nas concentrações desejadas para os experimentos e filtrá-lo a vácuo.

Para tal, utilizou-se o funil de porcelana e o Kitassato. No funil foram colocadas duas camadas de papel de filtro qualitativo iniciando-se a filtração.

Cabe ressaltar que esse extrato foi filtrado, após ser diluído nas concentrações a serem utilizadas, por possuir uma consistência diferente do extrato preparado no laboratório, sendo mais grosso e menos solúvel.

## **3.6- Determinação da Parasitemia**

Para tal atividade, preparou-se a bancada forrando-a com papel, colocando água sanitária para descarte de materiais, lâminas, lamínulas, pipetador manual, ponteiras, suporte para camundongo, copo de garrafa térmica, álcool iodado, tesoura cirúrgica, algodão, contador de

células manual e microscópio óptico. Em seguida, pegou-se as gaiolas dos grupos experimentais e os camundongos, um a um, foram contidos no copo de garrafa térmica com a cauda exposta. Foi realizada uma secção mínima na extremidade distal de cauda, e coletou-se, com a pipetador manual, 5,0µl de sangue que foi acondicionado entre lâmina e lamínula. A ferida cirúrgica foi cauterizada com álcool iodado, retornando-se o animal à gaiola. A lâmina foi levada ao microscópio óptico para a contagem dos parasitos, utilizando o Método de Brener.

Neste método, a lamínula é dividida em cinco campos, ou seja, as quatro extremidades e o centro da mesma. Cada um dos cinco campos é dividido em outros dez campos, de tal forma que formem cinco pares, ou seja, um ao lado do outro cinco vezes (BRENER, 1979).

Após realizar a contagem, com o contador, dos cinco campos da lamínula, cada um dividido em 10 campos menores (ao todo 50 campos), obteve-se o número aproximado de parasitos em 5,0µl (*ibid.*, 1979).

### **3.7- Coleta de Sangue Para Repique e Montagem dos Experimentos**

Tendo em vista a manutenção dos parasitos, utilizou-se PBS (solução tampão fosfato) com 10% de soro fetal bovino como diluente de sangue. A quantidade desta solução depende do número de parasitos encontrados e do número de camundongos a serem inoculados pois, cada camundongo recebeu cerca de 50.000 parasitos num volume de 0,2ml de sangue. Então, em 1ml de sangue continha 250.000 tripomastigotas, aproximadamente.

Um camundongo de repique foi utilizado em cada experimento. O animal foi sacrificado por meio de anestesia profunda prolongada com éter de Petróleo e afixado sobre o suporte de cortiça, utilizando-se alfinetes nas patas, para realizar a punção cardíaca. Após heparinizar a seringa, o sangue foi retirado do coração e colocado junto ao PBS com

10% de Soro Fetal Bovino no tubo de ensaio. Daí então, inoculou-se, nos camundongos normais, 0,2ml dessa solução por via intraperitoneal, iniciando-se os experimentos.

### **3.8- Atuação do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) de *Ginkgo biloba* em Camundongos Infectados Experimentalmente com *T. cruzi* no Pré-Tratamento Seguido de Tratamento**

Foram formados três grupos compostos por cinco animais em cada, de tal forma que dois, GA e GB, receberam pré-tratamento 24 horas antes da infecção e tratamento pós-infecção, durante 45 dias, com o EBL nas seguintes doses: 200 e 400mg/kg do peso do animal, respectivamente; e o terceiro grupo (GC - grupo controle) não recebeu tratamento com EBL, mas recebeu água filtrada para ser submetido às mesmas condições de stress que os demais animais.

A administração oral do EBL aquoso, bem como da água filtrada, iniciou-se 24h antes da infecção com *T. cruzi* e foi realizada por sonda orogástrica (sonda de polietileno, acoplada à agulha de metal, introduzida diretamente no esôfago) num volume fixo de 0,5ml por animal. O tratamento foi realizado em intervalos regulares de 24 horas.

### **3.9- Atuação do Extrato Bruto (EB) de *G. biloba* Obtido no Comércio Local, em Camundongos Infectados Experimentalmente com *T. cruzi***

Para este experimento foram formados 4 grupos de 5 animais. Estes receberam tratamento, após a infecção por *T. cruzi*, com o EB nas seguintes doses: 200mg/kg (GA), 400mg/kg (GB) e 800mg/kg (GC) de

animal; GD - grupo controle, recebeu água filtrada. O extrato e a água foram administrados por via orogástrica, num volume fixo de 0,5ml por animal. O tratamento foi realizado em intervalos regulares de 24 horas durante 20 dias e iniciou-se após a infecção por *T. cruzi*.

### **3.10- Atuação do EB de *G. biloba* Obtido no Comércio Local, em Camundongos Infectados Experimentalmente com *T. cruzi* no Pré-Tratamento Seguido de Tratamento**

Neste experimento foram formados três grupos compostos por cinco animais em cada, de tal forma que dois, GA e GB, receberam pré-tratamento 24 horas antes da infecção e tratamento pós-infecção com o EB nas seguintes doses: 200 e 400mg/kg do peso do animal, respectivamente; e o terceiro grupo, GC - grupo controle, não recebeu tratamento com EB, mas recebeu água filtrada.

A administração oral do EB aquoso, bem como da água filtrada, iniciou-se 24h antes da infecção com *T. cruzi* e foi realizada por sonda orogástrica num volume fixo de 0,5ml por animal, em intervalos regulares de 24 horas, durante 20 dias.

### **3.11- Acompanhamento dos Animais Infectados por *T. cruzi***

#### **3.11.1- Mortalidade**

A mortalidade dos camundongos de cada grupo foi acompanhada e comparada entre os grupos que receberam tratamento e o grupo controle, em cada experimento. Os camundongos que sobreviveram até o 60º dia foram sacrificados.

### 3.11.2 - Curva Parasitêmica

A quantificação dos parasitos circulantes no sangue foi realizada entre o 6º e 10º dia após a inoculação de tripomastigotas, em todos os camundongos dos experimentos.

Para cada experimento foram calculadas as médias parasitêmicas de cada grupo e, com base nas mesmas, foram traçadas as curvas de parasitemia.

### 3.12 - Efeito tripanomicida do EBL de *G. biloba*, *in vitro*

Seguindo a metodologia de Cover & Gutteridge *apud* SILVA (1999) desenvolveu-se o ensaio tripanomicida *in vitro*.

Em dez tubos Eppendorf de 1,5ml, separados em 5 lotes de dois tubos, colocou-se 0,9ml de sangue heparinizado. Em três lotes (T1, T2 e T3) foi colocado 0,1ml do EBL de *Ginkgo biloba* nas seguintes concentrações: 10, 20, 30mg/ml. No quarto lote (T4) colocou-se 0,1ml de sangue com 50.000 tripomastigotas de *T. cruzi*, aproximadamente, e no quinto (T5) 0,1ml de sangue sem *T. cruzi*, ambos serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. Todos os lotes foram homogeneizados por 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se aos lotes 1 à 3 0,1ml de sangue contendo em torno de 50.000 tripomastigotas de *T. cruzi*, com exceção dos lotes quatro e cinco que receberam água desionizada no mesmo volume. Novamente, todos os lotes foram homogeneizados por 10 minutos e incubados à 4°C.

As amostras de sangue foram examinadas ao microscópio óptico (aumento 400x), entre lâmina e lamínula, após 24 e 48 horas de incubação à 4°C, de acordo com a metodologia descrita no item 3.6, utilizando-se o sangue dos tubos. Verificou-se alterações nas hemácias, a mobilidade e quantidade das formas tripomastigotas.

As amostras com ausência de parasitos foram submetidas ao teste do microhematócrito. Neste teste, o sangue a ser testado foi coletado por meio de um tubo capilar (1,2x75mm) não heparinizado. Logo após, o mesmo foi centrifugado em 30.000 rpm por 10 minutos numa centrífuga de hematócrito (laboratório de Biofísica - DEFIS) e, em seguida, levado ao microscópio óptico (aumento 400x com óleo de imersão) para a detecção de tripomastigotas de *T. cruzi*. A observação foi realizada na região leucocitária (intermediária) do sangue centrifugado (LAFUENTE *apud* SILVA, 1999).

### **3.13 - Teste da Toxicidade do EB de *Ginkgo biloba***

#### **3.13.1 - Extrato Obtido no Comércio Local**

Para tal estudo utilizou-se como modelo a metodologia aplicada por SILVA (1999). Foram formados três grupos de cinco camundongos em cada, com peso entre 26-28 gramas, os quais foram mantidos em jejum por 12 horas antes de receberem o extrato vegetal. Após este período, receberam doses do EB, via orogástrica, nas seguintes concentrações: 5mg/kg, 500mg/kg e 5g/kg de animal.

Os animais foram observados a cada 2 horas até completar 12 horas. Em seguida, os animais foram observados a cada 12 horas, até atingir 48 horas após a administração do extrato bruto. Após este período, os animais foram observados em intervalos aleatórios por mais 13 dias seguidos.

#### **3.13.2 - Extrato Bruto Liofilizado**

Neste experimento somente um grupo (n=5) foi formado pois testou-se apenas a dose de 5g/kg de animal do EBL de *Ginkgo biloba*, via orogástrica, num volume de 0,5ml.

Os animais foram monitorados a cada 2 horas até completar 12 horas. Em seguida, foram observados a cada 12 horas, até atingir 48 horas pós-administração do extrato bruto. Após este período, os animais foram observados em intervalos aleatórios por mais 13 dias seguidos.

### **3.14- Análise Estatística**

Com as variáveis obtidas - mortalidade e número de parasitos - aplicou-se a estatística paramétrica, com os testes ANOVA e Tukey (Programa SYSTAT - Windows). Se  $P < 0,05$ , há diferença significativa entre os grupos.

## IV-RESULTADOS

### 4.1 - Extrato Bruto Liofilizado

Com base no relato do item 3.4.1, a partir de 15 gramas de folhas trituradas em 250ml de água desionizada, obteve-se em torno de 7,0g do EBL. Ao ressuspender as folhas trituradas em água desionizada, mais 7,0g do EBL foram obtidas.

### 4.2- Atuação do EBL de *Ginkgo biloba* na Mortalidade de Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi* no Pré-tratamento Seguido de Tratamento

Neste estudo investigou-se o efeito do pré-tratamento/tratamento com o EBL de *G. biloba* na mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*, de acordo com os itens 3.7 e 3.11.1. Foi observado que os camundongos pré-tratados/tratados com o EBL de *G. biloba* nas doses de 200 e 400mg/kg de animal mostraram um tempo de sobrevivência significativamente maior ( $p < 0,05$  - teste Anova) que os camundongos do grupo controle. No 20º dia haviam morrido 60% de GA, 40% de GB e 100% de GC. Enquanto os indivíduos dos grupos GA e GC haviam todos morrido até o 25º dia, no grupo tratado com a dose de 400mg/kg (GB),

três dos cinco camundongos sobreviveram até o dia do sacrifício (60º), (tabela 01, figura 01).

Cabe ressaltar que o número de parasitos encontrado na parasitemia de cada grupo está diretamente relacionado com a mortalidade, pois os que apresentaram mais parasitos morreram primeiro. E os dois animais de GB morreram por causa desconhecida, com o aparecimento de feridas no corpo dos mesmos.

Grupo (n=5)	Mortalidade (dia após infecção)				
	10°	15°	20°	25°	60°*
GA	-	02	01	02	-
GB	-	02#	-	-	-
GC	-	04	01	-	-

**Tabela 01:** Efeito do EBL de *G. biloba* no pré-tratamento/tratamento por administração orogástrica em intervalos regulares de 24 h na mortalidade de camundongos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*. GA e GB, pré-tratados 24h antes da infecção com as doses do EBL: 200mg/kg e 400mg/kg de animal, respectivamente; GC, grupo controle, recebeu água filtrada.

(\*) Os camundongos sobreviventes até esse dia foram sacrificados.

(#) - Camundongos com morte desconhecida (feridas).

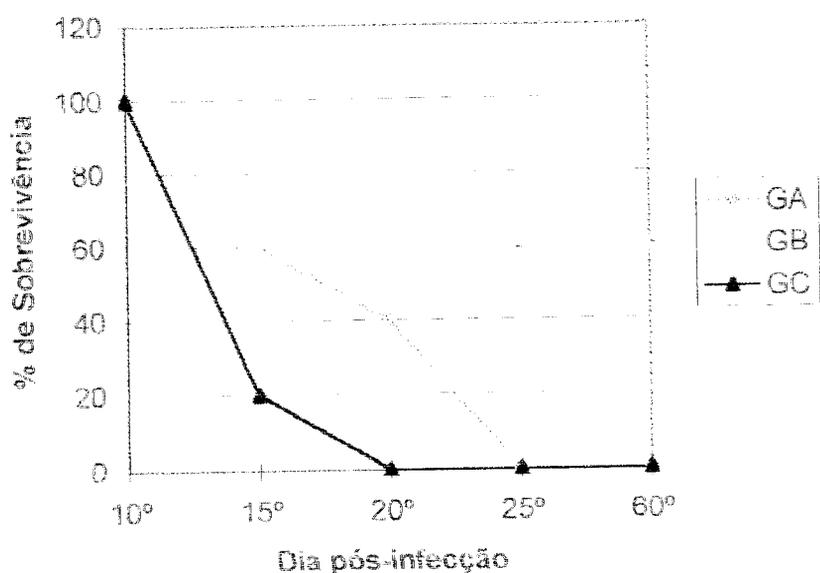


Figura 01: Taxa de sobrevivência de camundongos inoculados com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas de *T. cruzi*, tratados com EBL de *G. biloba*. 200mg/kg (GA) e 400mg/kg (GB) de animal. GC, grupo controle, recebeu água filtrada. Os grupos foram formados com 5 animais e apresentaram diferença significativa no tempo de sobrevivência ( $p < 0,05$ ).

#### **4.3- Atuação do EBL de *G. biloba* na Parasitemia de Camundongos infectados por *T. cruzi* no Pré-Tratamento Seguido de Tratamento**

Neste estudo acompanhou-se o efeito do EBL de *G. biloba* na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* conforme os itens 3.7 e 3.11.2. Foi observado que houve diferença significativa entre os grupos no número de parasitos entre o 6º e 8º dia ( $p < 0,05$  - teste Anova), sendo que os grupos tratados mostraram menor quantidade de parasitos.

Quando se comparou a parasitemia entre os grupos, foi possível verificar que o grupo tratado com a dose de 400mg/kg apresentou uma diferença significativa ( $p < 0,05$  - teste Tukey) em relação ao grupo controle nos 6º, 7º e 8º dias pós-infecção, respectivamente. Já o grupo tratado com a dose de 200mg/kg mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle apenas no 7º dia pós-infecção ( $p < 0,05$  - teste Tukey).

Estes dados podem ser observados na figura 02.

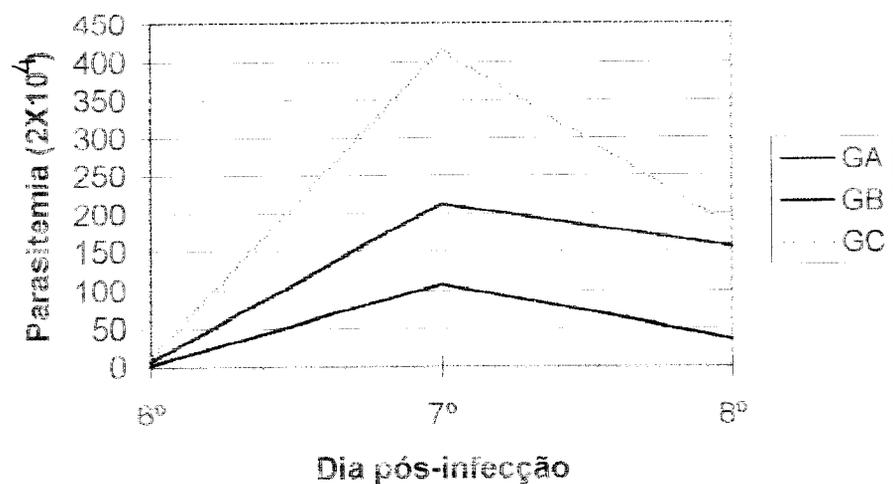


Figura 02: Efeito do EBL de *G. biloba* por administração orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas de *T. cruzi*; pré-tratados/tratados 24 h antes da infecção. Grupos GA, 200mg/kg de animal; GB, 400mg/kg de animal e GC, grupo controle que recebeu água, nos 6<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dia após infecção por *T. cruzi*.

#### **4.4- Atuação do Extrato Bruto (EB) de *Ginkgo biloba*, Obtido no Comércio, na Mortalidade de Camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***

##### **4.4.1- Tratamento pós infecção com *T. cruzi***

A investigação do efeito do EB de *G. biloba* na mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*, conforme itens 3.8 e 3.11.1, mostrou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$  - teste Anova) na mortalidade entre os camundongos tratados com extrato e os do grupo controle. Foi constatado que: o grupo tratado com a maior dose - 800mg/kg (GC) - teve 100% de mortalidade até o 20º dia; o tratado com a menor dose - 200mg/kg (GA) - teve 100% de mortalidade até o 35º dia. Os únicos grupos que continham animais vivos no dia do sacrifício (60º) foram o grupo controle e o tratado com a dose 400mg/kg de animal, sendo que o primeiro continha maior número de animais (60%) e o segundo apenas um animal (tabela 02, figura 03).

Grupo (n=5)	Mortalidade (dia após infecção)						
	10 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>	20 <sup>o</sup>	25 <sup>o</sup>	30 <sup>o</sup>	35 <sup>o</sup>	60 <sup>o*</sup>
GA	-	02	01	01	-	01	-
GB	-	-	03	-	-	01	-
GC	-	03	02	-	-	-	-
GD	01	01	-	-	-	-	-

**Tabela 02:** Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio local, por administração orogástrica, em intervalos regulares de 24h, na mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas de *T. cruzi*. Tratados pós-infecção por 20 dias nas seguintes doses: 200mg/kg (GA), 400mg/kg (GB) e 800mg/kg (GC) de animal. GD- grupo controle - recebeu água filtrada.

(\*) - Os camundongos que sobreviveram até o 60<sup>o</sup> dia foram sacrificados.

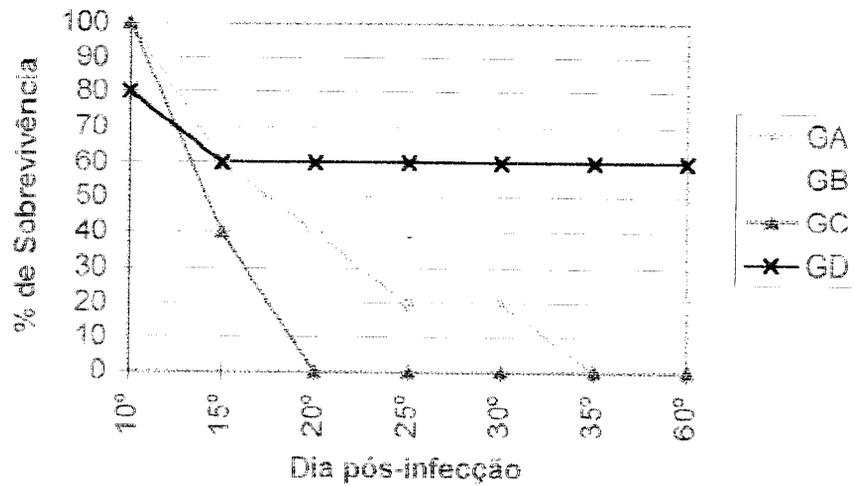


Figura 03: Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio local, por administração orogástrica em intervalos regulares de 24h, na porcentagem de sobrevivência dos camundongos. As doses do extrato foram de 200, 400 e 800mg/kg de animal para GA, GB e GC, respectivamente. GD, grupo controle, recebeu água filtrada. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$  - teste Anova).

#### **4.4.2- Pré-tratamento 24 horas antes da infecção com *T. cruzi*, seguido por tratamento pós-infecção**

No estudo do efeito do EB de *G. biloba* no pré-tratamento sobre a mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi* (itens 3.9 e 3.11.1), não foi possível observar diferença significativa ( $p > 0,05$  - teste Anova) na mortalidade entre os animais do grupo controle e os grupos tratados. Contudo, foi verificado que 80% (4 animais) dos camundongos do grupo tratado com 200mg/kg (GA) morreram até o 25º dia; 100% dos animais do grupo de maior dose - 400mg/kg (GB) - morreram até o 35º dia; e o restante dos animais do grupo GA (20%) sobreviveu até o 60º dia. No grupo controle (GC), 80% morreu até o 20º dia, o restante (20%) sobreviveu até o 60º dia.

Os animais sobreviventes foram sacrificados, pois não morreram até o 60º dia; sendo que o GC tinha um camundongo e o GA também (tabela 03, figura 04).

Cabe ressaltar que dois camundongos de GB morreram por causa desconhecida, logo após a infecção por *T. cruzi*.

Grupos (n=5)	Mortalidade (dia após infecção)						
	10°	15°	20°	25°	30°	35°	60°*
GA	-	02	01	01	-	-	-
GB	02 <sup>#</sup>	-	01	-	01	01	-
GC	01	02	01	-	-	-	-

**Tabela 03:** Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio local, por administração orogástrica, em intervalos regulares de 24h, na mortalidade de camundongos infectados experimentalmente com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas de *T. cruzi*. Pré-tratados/tratados por 20 dias nas seguintes doses: 200mg/kg (GA) e 400mg/kg de animal (GB). GC - grupo controle que recebeu apenas água filtrada.

(\*) Dia do sacrifício - Camundongos que sobreviveram até o 60° dia foram sacrificados.

(#) - Camundongos com causa de morte desconhecida (logo após infecção).

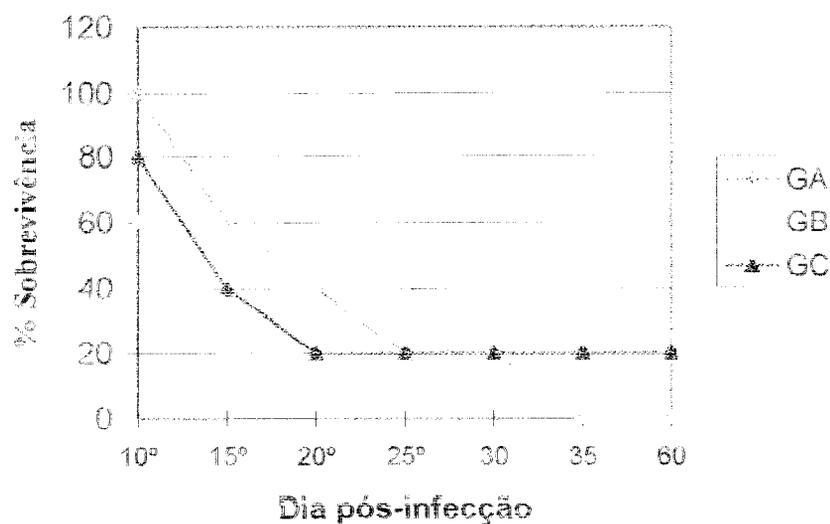


Figura 04: Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio local, por administração orogástrica no pré-tratamento seguido de tratamento em intervalos regulares de 24h, na sobrevivência de camundongos infectados com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas de *T. cruzi*. Os animais que não morreram até o 60º dia foram sacrificados. As doses do extrato foram de 200 e 400mg/kg de animal para GA e GB, respectivamente. GC, grupo controle, recebeu água filtrada. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

#### **4.5- Atuação do E B de *G. biloba* Obtido no Comércio Local, na Parasitemia de Camundongos Infectados com *T. cruzi*.**

##### ***4.5.1- Tratamento pós-infecção com T. cruzi.***

Ao investigar o efeito do tratamento com EB de *G. biloba* na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*, conforme itens 3.9 e 3.11.2, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$  - testes Anova e Tukey), cujos resultados estão apresentados na figura 05.



Figura 05: Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio, na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas de *T. cruzi*. Tratados por via orogástrica em intervalos regulares de 24h com as seguintes doses do extrato: 200mg/kg (GA), 400mg/kg (GB) e 800mg/kg (GC) de animal. GD - grupo controle - recebeu água filtrada.

**4.5.2- Pré-tratamento 24 horas antes da infecção com *T. cruzi* seguido de tratamento pós infecção.**

No estudo da parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* pré-tratados/tratados com EB de *G. biloba* (itens 3.10 e 3.11.2) também não foi possível observar diferença significativa ( $p > 0,05$  - testes Anova e Tukey), embora os grupos tratados com as doses de 200mg/kg (GA) e 400mg/kg (GB), tenham apresentado menor número de parasitos em relação a GC, conforme resultados apresentados na figura 06.

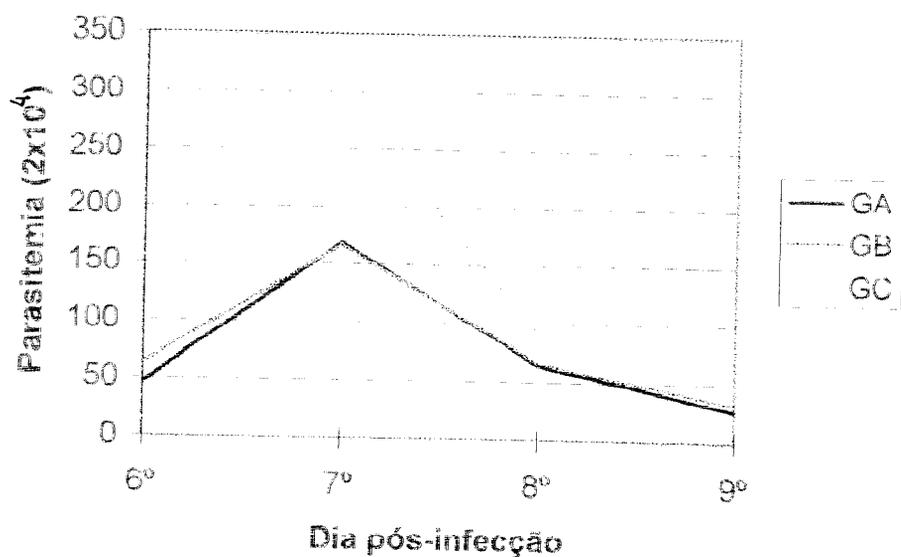


Figura 06: Efeito do EB de *G. biloba* obtido no comércio local por administração orogástrica em intervalos regulares de 24h, na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas de *T. cruzi*. Pré-tratados 24h antes da infecção e posteriormente tratados com o extrato nas seguintes doses: 200mg/kg (GA) e 400mg/kg de animal (GB). GC - grupo controle - recebeu água filtrada.

#### 4.6- Estudo do Efeito Tripanomicida *in vitro* do EBL de *Ginkgo biloba*

O estudo da atividade tripanomicida *in vitro* do EBL de *G. biloba* foi realizado conforme descrito no item 3.12 A amostra T1 foi submetida ao teste do microhematócrito e não apresentou parasitos no 2º dia de observação. Quanto à mobilidade, os parasitos foram classificados em rápidos ou normais (++) , lentos (+) e ausência de mobilidade (0).

O lote T1 (10mg/ml do extrato) apresentou maior efeito tripanomicida e, apesar de os lotes T2 (20mg/ml) e T3 (30mg/ml) não mostrarem efeito tripanomicida tão evidente, apresentaram um número menor de parasitos em relação a T4 (controle). Quanto à mobilidade, os lotes com EBL de *G. biloba* apresentaram menor mobilidade, apesar de T3 ter se aproximado de T4 (não recebeu o EBL) nas primeiras 24 h (tabela 04).

O lote T5 (sangue com água desionizada) estava com amostras perfeitas de sangue, ou seja, os elementos componentes do mesmo, como as hemácias, estavam em boas condições, assim como nos demais lotes.

Lotes	Mobilidade		N.º parasitos (x20.000) por ml de sangue	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
T1	+	0	1	0
T2	+	+	6	3
T3	++	+	25	10
T4	++	++	36	24

**Tabela 04:** Efeito tripanomicida *in vitro* do EBL de *G. biloba* em sangue contaminado e incubado com EBL (T1-10, T2-20, T3-30 mg/ml e T4 somente *T. cruzi*), 24 e 48 horas à 4°C, observado e avaliado ao microscópio óptico quanto a mobilidade e quantidade de parasitos.

## **4.7 Teste da Toxicidade do EB de *G. biloba***

### ***4.7.1 - Extrato Obtido no Comércio Local***

A toxicidade do EB foi realizada segundo a metodologia descrita no item 3.13.1, onde observou-se que não ocorreram mortes durante as 48 horas de experimento. No entanto, no 5º dia após a administração do EB, 1 animal do grupo tratado com a dose de 5g/kg foi a óbito. 80% dos camundongos deste grupo sobreviveram até o término do período do experimento (15 dias). Nos demais grupos (500mg/kg e 5mg/kg) houve 100% de sobrevivência.

Também não ocorreram alterações fisiológicas aparentes nos animais, como diarreia e regurgitação.

### ***4.7.2 - Extrato Bruto Liofilizado***

Neste teste realizado conforme a metodologia do item 3.13.2, não ocorreram óbitos nas primeiras 48 horas de experimento. Apenas um camundongo morreu, no 6º dia. 80% dos camundongos do grupo experimental permaneceram vivos até o 15º dia de experimento, e também não foi observado casos de diarreia e regurgitação.

Vale lembrar que foi montado somente um grupo, tratado com a dose do EBL de 5g/kg de animal.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Como descrito na introdução deste trabalho, SILVA (1996) testou o efeito do extrato bruto liofilizado de *Mandevilla velutina* em camundongos inoculados com *T. cruzi*, obtendo resultados satisfatórios no que diz respeito à redução da parasitemia e mortalidade. Em estudos posteriores, SILVA (1999) comprovou que a ação do extrato de *M. velutina* é atenuada com a administração de inibidores da Óxido Nítrico Sintase, mostrando o envolvimento do Sistema Óxido Nítrico (NO).

O Sistema Óxido Nítrico é um entre os vários mecanismos de defesa do organismo (sistema imune) que age contra invasões de microorganismos, produzindo o óxido nítrico (NO). Este é produzido por ativação de macrófagos inflamatórios do sangue, que convertem a L-arginina em L-citrulina por ação da NO sintase induzida, com a participação de NADPH e Tetraidrobiopterina (ROITT *et al.*, 1997). O NO promove a transformação radicais livres, como peróxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), em íon hidroxílico (OH<sup>-</sup>) e dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), compostos altamente tóxicos para os microorganismos invasores (HÖLSCHER *et al.*, *apud* FREITAS, 1999).

No que diz respeito à terapia da Doença de Chagas, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas, mas os avanços já alcançados, tanto para o tratamento específico como para o sintomático ainda não são suficientes, pois conta-se com poucos recursos terapêuticos disponíveis no mercado (AMATO-NETO, 1998).

Diante da importância médica, sócio econômica da Doença de Chagas e da necessidade de novos medicamentos que possam ser empregados na terapêutica, surge a necessidade de testar outras plantas que possivelmente possam atuar em decorrência da ampliação da resposta imune do organismo, ou por outro mecanismo. Por conseqüência, houve o interesse de estudar o extrato bruto (EB) de *G. biloba* por ser uma planta que pode trazer muitos benefícios contra diversas enfermidades.

A partir do estudo das diversas propriedades medicinais da *Ginkgo biloba* iniciou-se a pesquisa onde se testou a atuação do extrato bruto das folhas desta planta *in vivo* e *in vitro* em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*; além do teste de toxicidade.

Segundo os relatos existentes, as folhas de *G. biloba* são utilizadas em chás e em cápsulas na forma de pó. No presente trabalho, padronizou-se a utilização do extrato em pó obtido no comércio e o extrato bruto liofilizado (EBL) produzido a partir das folhas no laboratório de Bioquímica (DEGEB-UFU), também na forma de pó.

A primeira etapa deste trabalho consistiu no estudo da atuação do EBL de *G. biloba*, no pré-tratamento/tratamento, em camundongos infectados com *T. cruzi*. Ao analisar o tempo de sobrevivência dos animais deste experimento, percebe-se que o grupo tratado com a dose de 400mg/kg de animal (GB) mostrou 60% de sobrevivência até o dia do sacrifício quando os animais dos demais grupos já haviam morrido. Pode-se dizer também que os animais do grupo tratado com a dose de 200mg/kg (GA) morreram depois do grupo controle (item 4.1; Tab. 01; Fig 01).

Apesar de 02 camundongos do grupo GB terem morrido por causa indeterminada; pela infecção, pelas feridas que surgiram no corpo dos mesmos depois de montado o experimento, ou outra causa desconhecida; o EBL de *G. biloba* mostrou ser eficiente principalmente na dose de 400 mg/kg, aumentando a sobrevivência dos animais

tratados e reduzindo o número de tripomastigotas no sangue. Em qualquer dose de EBL utilizada neste ensaio foi observado um tempo de sobrevivência maior em relação ao grupo controle e menor número de parasitos. Provavelmente, o pré-tratamento ativou o sistema imune anteriormente à infecção, já que é uma planta imuno-estimuladora.

É possível que o sistema Óxido Nítrico (NO) esteja sendo estimulado proporcionando maior resistência contra o parasito como foi mostrado por SILVA (1999), já que estudos realizados nestes últimos anos têm demonstrado que o Óxido Nítrico (NO) produzido pelos macrófagos ativados são citostáticos ou citotóxicos para uma variedade de patógenos, incluindo o *T. cruzi*.

Com relação aos camundongos de morte desconhecida, a causa mais provável é o aparecimento de grandes feridas no corpo dos mesmos, podendo ser sarna ou outro patógeno desconhecido.

Efeitos benéficos como os que foram observados no pré-tratamento com EBL de *G. biloba* (item 4.2) não foram observados nos experimentos onde se utilizou o extrato obtido no comércio. Possivelmente, existam outras partes da planta além das folhas, como casca e galhos, ou mesmo algum outro composto junto ao conteúdo, como o amido, por exemplo, detectado com o teste de lugol. A forma com que o extrato é manipulado também pode causar a perda de algum princípio ativo. Por tal motivo, deve-se pesquisar outros extratos obtidos comercialmente que mostrem resultados semelhantes aos obtidos pela utilização do EBL preparado a partir das folhas.

Primeiramente, quando se utilizou o extrato comercial no tratamento pós-infecção, foi verificado um fato interessante. Os animais do grupo controle, que só receberam água filtrada, mostraram 60% de sobrevivência até o dia do sacrifício; enquanto que, nos grupos tratados com o extrato, apenas um camundongo do grupo tratado com 400mg/kg sobreviveu até esse dia (Figura 03). Pode ter sido coincidência ou devido ao fato de os camundongos serem geneticamente diferentes, pois apresentaram parasitemia semelhante (figura 05). Além disso, o extrato

comercial pode estar agindo diferentemente do EBL, de maneira ainda desconhecida.

No experimento onde utilizou-se o EB obtido no comércio no pré-tratamento/tratamento de animais infectados com *T. cruzi*, também foi observado que o óbito de 02 camundongos, no início do ensaio, foi por causa indeterminada (tabela 03, figura 04) e não pela infecção por *T. cruzi*, pois morreram logo após a infecção. Assim, tanto neste como no experimento onde se utilizou o EBL no pré-tratamento houve a perda de dois camundongos em cada, os quais não puderam ser analisados. O fato de não se saber a causa das mortes é um problema para o estudo, pois pode interferir na análise dos resultados. A solução seria o uso de animais isogênicos e condições ideais para experimentação.

Neste mesmo experimento, não houve diferença significativa entre os grupos, tanto no tempo de sobrevivência como na parasitemia (itens 4.4.2 e 4.5.2) talvez devido ao tipo de extrato, que foi o obtido no comércio. Novamente foi comprovado que, enquanto o EBL atuou reduzindo a parasitemia e aumentando a sobrevivência, o extrato comercial nada fez semelhante a isto, não sendo significativo. A dose de 200mg/kg (menor dose) foi mais eficiente do que a dose 400mg/kg, diferindo do experimento com o EBL, assim como o experimento *in vitro*, mencionado posteriormente, onde a melhor dose (10mg/ml) também foi a menor.

Com isso, pode-se lançar a hipótese de que, mesmo sem os efeitos observados com o EBL, o extrato obtido no comércio atua de alguma forma ainda não identificada, que pode ser diferente da maneira pela qual o EBL atua. Pode ser que algum outro composto presente no extrato comercial também esteja agindo, devendo-se pesquisar a causa dos resultados e buscar o novos extratos vegetais de boa qualidade.

Mesmo que não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos, o fato de um animal do grupo tratado com 200mg/kg do EB e um do grupo controle sobreviverem até o 60º dia, necessitando sacrificá-los, pode ter ocorrido por esses animais terem apresentado

menor parasitemia em relação aos demais, provavelmente porque o sistema imune proporcionou maior resistência ao parasito, já que não se trata de camundongos isogênicos. Tais hipóteses também podem ser empregadas para o pré-tratamento/tratamento com o EBL discutido anteriormente.

O efeito tripanomicida (item 4.6) do EBL de *G. biloba* foi um dos tópicos abordados onde, pelo fato da menor dose ter sido mais eficaz, pode-se sugerir que as doses maiores estão em excesso e, com isso, tornam-se menos efetivas (tabela 04). Assim como em fármacos utilizados como medicamentos que, quando em excesso, tornam-se maléficos, prejudicando o organismo (GOODMAN *et al.*, 1996).

A menor dose utilizada neste teste (10mg/ml) pode estar estimulando algum mecanismo contra o *T. cruzi* que atue de melhor maneira com esta concentração de EBL, e que provavelmente é a ideal. Além desse limite, o princípio ativo torna-se gradativamente ineficaz, não combatendo o parasito de maneira satisfatória.

Cabe ressaltar que o EB comercial não foi utilizado neste experimento por não ter mostrado resultados satisfatórios nos demais ensaios.

Levando em consideração que uma grande parte dos vegetais produzem metabólitos que podem ser tóxicos para animais, foi necessária a investigação da toxicidade do extrato de *G. biloba*, administrado oralmente.

Neste estudo foi observado que o extrato obtido no comércio (item 4.7.1) não mostrou toxicidade aguda, nem efeitos colaterais como diarreia, irritabilidade, regurgitação no período de observação. O fato de um camundongo tratado com a dose de 5g/kg ter morrido, não implica que o extrato seja tóxico, mas que apresenta baixa toxicidade, pois, é considerado normal a perda de até 25% dos animais. Com exceção dessa morte, todos os demais camundongos sobreviveram até o fim do período de observação (total de 15 dias).

Este fato nos leva a crer que os camundongos infectados por tripomastigotas de *T. cruzi* nos experimentos onde se testou o EB comercial, não morreram devido à concentração do extrato, mas pela doença, mesmo que este não tenha mostrado efeitos benéficos consideráveis, lembrando que a máxima dose usada desse extrato foi a de 800mg/kg.

No que se refere ao EBL (item 4.7.2), este também não mostrou toxicidade aguda e pôde diferir do anterior por ser o extrato bruto puro, sem nenhum outro componente da planta além das folhas. Apenas a dose de 5g/kg de animal foi testada por não dispormos de quantidade suficiente do mesmo para testes de outras concentrações. Pôde-se perceber então, que o EBL não apresenta toxicidade aguda nem efeitos colaterais. Um camundongo do grupo morreu no sexto dia, o que também não comprova a toxicidade aguda do extrato.

Nos dois experimentos de toxicidade, coincidentemente ou não, os animais que morreram, um em cada experimento, foram dos grupos tratados com a maior dose (5g/kg). Com isso, mesmo sendo considerado normal a perda de um animal e, portanto, a não toxicidade, não se deve dizer que o extrato vegetal não é totalmente atóxico, já que ocorreram óbitos. Então, por menor que seja, a toxicidade de certa forma existe quando o extrato vegetal é utilizado em altas doses como foi realizado, caso contrário não ocorreriam óbitos.

De acordo com o CEME, quando a dose letal mediana é maior que 5g/kg de peso, a determinação da mesma não deve ser realizada por não apresentar parâmetro fidedigno. Embora não tenham sido realizados outros testes ou exames específicos para a avaliação dos efeitos tóxicos, a baixa toxicidade do extrato provavelmente exista, como foi descrito acima.

Inúmeros são os fatores que podem influenciar no desenvolvimento da infecção por *T. cruzi*, como variação da resposta imunológica do organismo infectado por não se utilizar camundongos isogênicos SPF (livre de patógenos específicos), a interação parasito-

hospedeiro e pela ausência de monitoramento da temperatura. O extrato de *G. biloba* poderia estar atuando de diversas maneiras no hospedeiro, assim como poderia estar agindo diretamente sobre o parasito.

Os possíveis mecanismos específicos de atuação do EBL de *G. biloba* não foram pesquisados no presente trabalho. Com isso, surge a necessidade de novos testes que possam comprovar como o EBL está agindo nos organismos infectados com *T. cruzi*.

Com base nos resultados dos experimentos realizados, podemos concluir que o EBL de *Ginkgo biloba* mostrou resultados satisfatórios por reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência de camundongos infectados com *T. cruzi*, experimentalmente, principalmente com a dose de 400mg/kg de animal no pré-tratamento/tratamento. Além disso, é um extrato vegetal que não mostra toxicidade aguda e pode possuir efeito tripanomicida, principalmente na concentração de 10mg/ml. Mesmo com estas vantagens, muitos testes ainda devem ser feitos para comprovar se tal extrato é realmente eficaz

Com relação ao EB obtido no comércio, não foi possível observar a atuação do mesmo no que diz respeito à redução da parasitemia e aumento da sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi*, experimentalmente. Daí a necessidade de pesquisar outros produtos disponíveis no comércio que possuam melhor qualidade e quantidade de princípio ativo garantindo maior eficácia do extrato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO-NETO, V. Terapêutica da forma crônica da Doença de Chagas: Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arq. Bras. de Card.**, v.70, n.1, p.63-64, 1998.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.460.
- CUNHA, L. C. Quimioprofilaxia da Doença de Chagas Experimental: Avaliação da Atividade de *Zanthoxylum Minutiflorum Tul*. **Rev. Pat. Trop.**, v.24, n.1, p.99-192, 1995.
- CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da Doença de Chagas: abordagem molecular. **Rev. Soc. Card. do Estado de São Paulo**, v.5, n.2, p.217-229, 1995.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção. **Arq. Bras. Card.**, v.63, n.5, p.451-455, 1994.
- FRANCO, L. L. **As Sensacionais 50 Plantas Medicinais: campeãs de poder curativo**. 2.ed. Curitiba: O Naturalista, 1997. p. 146-149.
- FREITAS, F. G. Efeito do Extrato Bruto Liofilizado de *Mandevilla velutina* em Camundongos Infectados por *Toxoplasma gondii* e

- Células Tumorais de Sarcoma 180.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1999. 48p. Monografia, Graduação.
- GOODMAN-HARDMAN, J.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. 1435p.
- MING, L. C. Estudo e Pesquisa de Plantas Medicinais na Agronomia. **Hort. Brasileira**, v.12, n.1, p. 3-9, 1994.
- MORONI, F.T. **A Utilização do Produto Apícola Própolis no Tratamento da Doença de Chagas.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1998. 56p. Monografia, Graduação.
- PEDROSA, R. C.; CANÇADO, J. R.; DECACHE, W. Estudos Longitudinais do Eletrocardiograma na Doença de Chagas Desde a Fase Aguda. **Rev. Bras. de Med. Trop.**, v.26, n.4, p.163-173, 1993.
- PERRY, E. K. *et al.* Medicinal Plants and Alzheimer's disease - integrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence. **J. Altern. Complement Med.** v.4, n.4, p.419-428, 1998.
- PÓVOA Jr. H.; ANDRADE, C. C.; CÂMARA, M.; GAMMARO, R.; SANTOS, C.; OLIVEIRA, L., A. *Ginkgo biloba* e Radicais Livres em Camundongos. **F. Méd. (BR)**, v.106, n.4, p.149-150, 1993.
- REY, L. **Parasitologia.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.128-170.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE D. **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.18.5.

SILVA, R.M.G. **Efeito do Extrato Bruto de *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) na Infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1996. 56p. Monografia, Graduação.

SILVA, R. M. G. **Estudo da Ação Tripanomicida do extrato Bruto de *Mandevilla velutina* em Camundongos Infectados por *Trypanosoma cruzi***. Uberlândia, 1999. 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1999.

