

Regildo Márcio Gonçalves da Silva

**“Estudo da ação tripanomicida do extrato bruto de *Mandevilla velutina*
em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.”**

Uberlândia - Minas Gerais
Abril de 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

2000
619/616.9
00262
10/10/99

**“Estudo da ação tripanomicida do extrato bruto de *Mandevilla velutina*
em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.”**

Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia, como parte das
exigências do Curso de Pós-graduação em
Genética e Bioquímica, para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica

DIRBI/UFU



1000187152

Uberlândia - Minas Gerais
Abril de 1999

Regildo Márcio Gonçalves da Silva

**“Estudo da ação tripanomicida do extrato bruto de *Mandevilla velutina*
em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.”**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Amélia Hamaguchi

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia, como parte das
exigências do Curso de Pós-graduação em
Genética e Bioquímica, para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica

Uberlândia - Minas Gerais
Abril de 1999

“Que ninguém se vanglorie do seu saber, nem despreze os humildes, pois estes sabem muitos segredos que Deus não revelou aos que têm fama de sábio.”

Roger Bacon (1214-1294)

Dedico este trabalho

Aos meus pais José Rodrigues da Silva e Elieti Sebastião Gonçalves.

À Luciana Pereira Silva.

Agradecimento

À Profa Amélia Hamaguchi, pelos inúmeros ensinamentos, pelo entusiasmo com que sempre tratou este trabalho e pela confiança em mim depositada, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico.

À Profa. Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo pelo estímulo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó e Prof. Ms. Júlio Cesar Nepomuceno pela colaboração nas análises de genotoxicidade.

À Profa Dra. Ana Angélica e MS. Adriana por sua colaboração para coleta da *M. velutina*.

Ao Prof. Dr. Gilmar da Cunha Sousa e sua família, pela grande amizade.

Ao Prof Dr. Warwick Estevam Kerr pelo apoio na realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goular Filho, que gentilmente cedeu o laboratório para realização de uma das etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Elmiro Santos Resende pela contribuição neste trabalho.

À Profa. Dra. Benvenida R. dos Santos pelo apoi no tratamentos dos animais.

À Profa. Dra. Luiza Kinichita Gouveia, do Dep. de Botânica do Instituto de Biologia, da UNICAMP/ SP, pela identificação da *Mandevilla velutina*.

Aos Professores Doutores João Ernesto de Carvalho e Mary Ann Foglio e ao Técnico Rodney Alexandre F. Rodrigues do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas, Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP/SP, pela colaboração e contribuição nas análises fitoquímicas.

Aos amigos: Marcelo, Veridiana, Rosana, Vânia, Francislene, Márcia, Maurício e Jair Júnior pela força e amizade.

À Sebastiana Abadia Inácio e Maria Heloisa Gomes, pelo apoio sempre constante.

Aos demais colegas do Laboratório de Bioquímica, professores, alunos e funcionários, pelo companheirismo.

Aos professores e funcionários dos Laboratórios de Parasitologia, Microbiologia, Biofísica, Genética e Genética Molecular, desta instituição pela colaboração neste trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Paulo Roberto Rangearo Péres e Profa Dra Cecília Lomônaco de Paula, pela contribuição nas análises estatísticas desta trabalho.

À Fátima Aparecida Souza Faria, do Laboratório de Imagens do CEBIM-UFU, por colaborar na ilustração das múltiplas etapas deste trabalho.

Aos amigos Romeu e Silvânia pela acolhida carinhosa e apoio constante.

Ao Vallée Nordeste e Pentapharm pelo fornecimento de animais utilizados neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Parasitologia e Imunologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro-Uberaba-MG, em principal ao Prof. MS Aldo Mattos pela colaboração para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por contribuir para dosagem de NO₂ e NO₃.

Ao Hospital das Clínicas da Fundação de Assistência, Estudo e Pesquisa de Uberlândia. Laboratório de Análises Clínicas, por realizarem os hemogramas.

Ao CNPq por ter fornecido a bolsa de Mestrado.

Para todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Resumo.....	iv
1- Introdução	
1.1 – Doença de Chagas.....	1
1.2 – Plantas Medicinais.....	4
1.3 – Óxido Nítrico.....	7
2 – Objetivos.....	9
3 – Material e Métodos	
A – Materiais	
3.1 – Biológicos.....	10
3.1.1 – Animais	10
3.1.2 – <i>Mandevilla velutina</i> (Apocinaceae).....	10
3.1.3 – <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
3.1.4 - <i>Escherichia coli</i>	10
3.2 – Agentes Químicos.....	11
3.2.1 – Benzonidazol.....	11
3.2.2 – Inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS)	11
3.2.3 – Ciclofosfamida.....	11
B – Métodos	
3.4 – Preparação do extrato bruto liofilizado (EBL) de <i>Mandevilla velutina</i>	11
3.5 – Determinação da parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	12
3.6 – Produção da infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.7 – Teste de microhematócrito para detecção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	12
3.8 – Investigação da toxicidade do EBL de <i>M. velutina</i>	12
3.9 - Estudo do efeito EBL de <i>M. velutina</i> na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	13
3.10 - Estudo do pré-tratamento com EBL de <i>M. velutina</i> em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	14
3.11 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de <i>M. velutina</i> e do Benzonidazol na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	14
3.12 - Estudo dos efeitos de EBL de <i>M. velutina</i> associado aos inibidores da NOS em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	15
3.12.1 - Estudo dos efeitos de EBL de <i>M. velutina</i> associado ao NOARG em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	15
3.12.2 - Estudo dos efeitos de EBL de <i>M. velutina</i> associado ao L-NAME em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	16
3.13 - Dosagem de Nitrito (NO ₂) e Nitrato (NO ₃) no soro de animais normais tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	16
3.13.1 - Tratamento dos animais para obtenção de soro.....	16
3.13.2 - Dosagens de NO ₂ e NO ₃	17
3.14 - Dosagem de NO ₃ no soro de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	17
3.15 - Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos do EBL de <i>M. velutina</i>	18

3.16 – Métodos para a triagem fitoquímica do extrato bruto (EB) de <i>M. velutina</i>	19
3.16.1 – Extração do EB.....	19
3.16.2 – Determinação de triterpenos e esteróides.....	19
3.16.3 – Determinação de carotenóides.....	20
3.16.4 – Determinação de ácidos graxos.....	20
3.16.5 – Determinação de alcalóides.....	20
3.16.6 – Determinação de agliconas flavônicas.....	20
3.16.7 – Determinação de emodóis.....	21
3.16.8 – Determinação de cumarinas.....	21
3.16.9 – Determinação de Taninos gálicos e catéquicos.....	21
3.16.10 – Determinação de Saponinas.....	21
3.16.11 – Determinação de Compostos Redutores.....	21
3.16.12 – Determinação de Amido.....	22
3.16.13 – Determinação de Mucilagens.....	22
3.17 – Estudo do efeito tripanomíida <i>in vitro</i> do EBL de <i>M. velutina</i>	22
3.18 – Análises estatísticas.....	23
4 – Resultados	24
4.1 - Investigação da toxicidade do EBL de <i>M. velutina</i>	24
4.2 - Efeito do EBL de <i>M. velutina</i> na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	24
4.3 - Estudo do pré-tratamento com EBL de <i>M. velutina</i> em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	27
4.4 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de <i>M. velutina</i> e do Benzonidazol na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	29
4.5 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de <i>M. velutina</i> associado aos inibidores da NOS na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	32
4.6 - Dosagem de nitrito (NO ₂) e nitrato (NO ₃) no soro de animais normais e tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	36
4.7 - Dosagem de NO ₃ no soro de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	39
4.8- Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos do EBL de <i>M. velutina</i>	41
4.9 - Triagem fitoquímica do extrato bruto (EB) de <i>M. velutina</i>	42
4.10 - Estudo dos efeitos tripanomíidas <i>in vitro</i> do EBL de <i>M. velutina</i>	43
5 – Discussão e Conclusão.....	44
6 – Referências Bibliográficas	52
7 - Abstract.....	59
8 - Anexo 1	60

Lista de Abreviaturas

CP.....	Ciclofosfamida
CEME.....	Central de Medicamentos
D0870.....	Derivado do cetoconazol
DEGEB....	Departamento de Genética e Bioquímica
EB.....	Extrato Bruto
EBL.....	Extrato Bruto Liofilizado
EPCMN...	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
GIEMSA	Glicerina azul de eosina álcool metílico
L-NAME..	L-arginina-metil-ester
L-NIO.....	L-imino-etil-L-ornitina
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
NOARG...	N ^o -nitro-L-arginina
NOS.....	Óxido Nítrico Sintase
NOSe.....	Óxido Nítrico Sintase endotelial
NOSi.....	Óxido Nítrico Sintase induzível
NOSn.....	Óxido Nítrico Sintase neural
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
PBS.....	Tampão fosfato 0,01M com salina 0,09% pH 7,2
UFU.....	Universidade Federal de Uberlândia

Lista de Tabelas

Tabela A	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.8.....	13
Tabela B	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.9.....	13
Tabela C	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.10.....	14
Tabela D	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.11.....	15
Tabela E	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.12.....	16
Tabela F	Resumo dos procedimentos da associação de EBL+ L-NAME.....	16
Tabela G	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.13.1.....	17
Tabela H	Resumo dos procedimentos descritos no item 3.14.....	18
Tabela 01	Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos tratados com EBL e controle.....	25
Tabela 02	Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos pré-tratados com EBL e GIV-controle.....	27
Tabela 03	Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos tratados com duas doses diárias EBL, Benzonidazol e sem tratamento.....	30
Tabela 04	Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos experimentais e controles.....	33
Tabela 05	Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos experimentais e controles.....	34
Tabela 06	Frequência média e desvio padrão dos eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) dos grupos de animais tratados com EBL) e controles positivo tratados com Ciclofosfamida (CP) e o grupo que recebeu água.....	41
Tabela 07	Triagem fitoquímica do extrato bruto de <i>Mandevilla velutina</i>	42
Tabela 08	Efeito tripanomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>M. velutina</i> em sangue contaminado e incubado com EBL.....	43

Lista de Figuras

Figura 01 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> tratados com doses crescentes de EBL de <i>M. velutina</i>	25
Figura 02 - Porcentagem de diminuição da parasitemia nos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com doses crescentes de EBL de <i>M. velutina</i>	26
Figura 03 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com doses crescentes de EBL de <i>M. velutina</i>	26
Figura 04 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> pré-tratados com dose única de EBL de <i>M. velutina</i>	28
Figura 05 - Porcentagem de redução da parasitemia nos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e pré-tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	28
Figura 06 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e pré-tratados com EBL de <i>M. velutina</i>	29
Figura 07 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> tratados com duas doses diárias de EBL, Benzonidazol e sem tratamento.....	30
Figura 08 - Porcentagem de diminuição da parasitemia nos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com duas doses diárias de EBL (GF-71,5 mg/kg, GG-143 mg/kg) e Benzonidazol.....	31
Figura 09 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com duas doses diárias de EBL, Benzonidazol e sem tratamento.....	31
Figura 10 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> tratados com EBL de <i>M. velutina</i> , EBL+NOARG, NOARG e sem tratamento (GM).....	33
Figura 11 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> tratados com EBL de <i>M. velutina</i> , EBL+L-NAME, L-NAME e sem tratamento.....	34
Figura 12 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com EBL de <i>M. velutina</i> , EBL+NOARG, NOARG e sem tratamento.....	35
Figura 13 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com EBL de <i>M. velutina</i> , EBL+L-NAME, L-NAME e sem tratamento.....	35
Figura 14 - Curva padrão de dosagem de NO ₂ e equação da reta.....	14
Figura 15 - Curva padrão de dosagem de NO ₃ e equação da reta.....	14
Figura 16 - Concentração média de Nitrato (NO ₃) no soro de animais normais tratados com EBL.....	16
Figura 17 - Concentração média de Nitrito (NO ₂) no soro de animais normais tratados com EBL.....	16
Figura 18 - Concentração de Nitrato (NO ₃) no soro de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e normais, tratados com EBL e sem tratamento.....	40
Figura 19 - Concentração média de Nitrato (NO ₃) no soro de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e normais, tratados com EBL e sem tratamento.....	40
Figura 20 - Número de Tripomastigotas por animal, encontrados no sangue dos animais dos grupos infectados por <i>T. cruzi</i>	41
Figura 21 - Porcentagem média de eritrócitos policromáticos micronucleados de células da medula óssea de camundongos tratados com EBL e sem tratamento.....	42

**ESTUDO DA AÇÃO TRIPANOMICIDA DO EXTRATO BRUTO DE
Mandevilla velutina EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
Trypanosoma cruzi.**

A doença de Chagas é uma das mais importantes infecções parasitárias em várias regiões da América Latina, incluindo o Brasil, em virtude da sua alta incidência, prevalência e repercussão sócio-econômica que esta endemia causa aos países. Apesar dos esforços, um número muito reduzido de drogas tripanomicidas tem sido indicadas para o tratamento específico da doença, todas com efeitos colaterais que limitam a utilização. Na região de Uberlândia, existem relatos populares de que o extrato do rizoma de *Mandevilla velutina* é indicado aos pacientes portadores desta doença. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de investigar a ação deste extrato sobre a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com 5×10^4 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. O extrato foi obtido pela maceração de fragmentos do rizoma em álcool de cereais a 15%, o qual foi liofilizado (EBL) e ressuspenso em água destilada. O EBL administrado aos camundongos, por via oral, apresentou uma baixa toxicidade no organismo destes animais. Quando o EBL foi administrado em doses crescentes (até 200mg/kg) em camundongos infectados com *T. cruzi*, observou-se redução da parasitemia e aumento da sobrevivência, os quais foram dose dependentes. O tratamento prévio dos animais, com uma dose de 200mg/kg, mostrou-se eficaz na diminuição da parasitemia, sendo mais eficiente quando o tratamento foi realizado 24 horas antes da infecção. Quando os animais infectados foram tratados com duas doses diárias de EBL (71,5 e 143 mg/kg) durante 30 dias e comparados com os animais tratados com Benzonidazol (duas doses diárias de 50mg/kg), verificou-se que o EBL é mais eficaz do que o Benzonidazol nas doses administradas. Para investigar o possível envolvimento do Sistema NO no mecanismo de ação do EBL, animais infectados foram tratados com EBL e inibidor da NOS (NOARG ou L-NAME) onde se observou uma atenuação dos efeitos do EBL. Ao realizar a dosagem de NO_2 e de NO_3 no soro de animais normais e tratados com EBL verificou-se nestes um aumento *significante* nas concentrações de NO_2 e NO_3 . Quando se comparou as parasitemias e os níveis séricos de NO_3 dos animais infectados, tratados e não tratados com EBL, verificou-se que os animais não tratados apresentaram maiores valores de parasitemia e NO_3 , entre 8º e 14º dia pós-infecção. A ação tripanomicida promovida pelo EBL, foi testada também *in vitro* no sangue contendo *T. cruzi*, incubado com EBL (24 e 48 horas), resultando na redução da contagem de tripomastigotas. Na avaliação do potencial genotóxico do EBL, os resultados sugerem que o EBL possui efeitos protetores na formação de eritrócitos micronucleados. Na triagem fitoquímica verificou-se a presença de várias classes químicas incluindo os taninos e os terpenóides que podem apresentar atividade antiparasitária. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o extrato bruto de *M. velutina* possui componente(s) capaz(es) de atuar sobre a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*, reduzindo *significativamente* o número de parasitos durante a infecção, sendo que esta redução pode estar correlacionada com o Sistema Óxido Nítrico.

INTRODUÇÃO

1.1 - Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana, mais conhecida como doença de Chagas, é causada pela infecção com o parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1991) existem aproximadamente 16 a 20 milhões de pessoas infectadas em toda América Latina, sendo que cerca de 50% deste contingente encontra-se no Brasil (PEDROSA *et al*, 1993). Essa moléstia representa uma das principais causas de morte súbita, que pode ocorrer com freqüência na fase mais produtiva do cidadão, ocorrendo no Brasil cerca de 6000 óbitos por ano relacionados à doença (LANNI e MADY, 1998).

No que se diz respeito à infecção pelo *T. cruzi*, esta pode ocorrer de várias maneiras e circunstâncias, tais como: transmissão vetorial, transfusão sanguínea, congênita, transplante de órgãos, leite materno (DIAS, 1989) e, também, por acidentes eventuais com profissionais que manipulam materiais contaminados. A transmissão vetorial ocorre pela penetração de tripomastigotas metacíclicos (eliminados nas fezes ou urina de triatomíneos, durante o hematofagismo) em solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra. Esta via de transmissão tem importância epidemiológica principalmente nas regiões endêmicas onde as estratégias de controle do vetor não foram adotadas ou são deficientes (NEVES, 1995). Outra modalidade de transmissão ocasional é a que ocorre por transfusão de sangue, sendo esta a mais importante em áreas não endêmicas (REY, 1992). Além destas duas vias de transmissão prevalecem em menor grau as outras modalidades de contágio, contribuindo para a disseminação da doença.

A partir do momento em que penetra no hospedeiro humano, o *T. cruzi* passa a invadir células do sistema mononuclear fagocitário, sobretudo macrófagos (DUTRA *et al*, 1992). No interior destas células, o parasito que não é digerido, por ter capacidade de sair do fagossomo, passa a habitar o citoplasma na forma amastigota (tecdual) e começa a subdividir-se. Em seguida, reassume a forma tripomastigota e atinge a circulação sanguínea, período no qual se observa uma alta parasitemia até que haja resposta imune aos parasitos (CUNHA-NETO *et al*, 1994), constituindo assim a fase aguda da infecção.

Esta fase, se caracteriza por ser inicial, rápida, geralmente assintomática e por apresentar uma típica curva parasitêmica relacionada com a proliferação intracelular do *T. cruzi*, que sai para o meio extracelular, possibilitando assim, a

quantificação da parasitemia (BRENER, 1979). Os parasitos na forma tripomastigota, após atingirem a circulação sanguínea, passam a invadir outras células como as musculares (MILEI *et al*, 1991) e células do sistema nervoso (ALMEIDA *et al*, 1983). Após a fase aguda inicia-se a fase crônica da doença na forma indeterminada ou latente, que é caracterizada pela presença de infecção com *T. cruzi* e ausência de manifestações clínicas, podendo ser considerada o período mais longo da doença (BARRETO *et al*, 1990).

Segundo Siqueira-Batista e col (1996) cerca de 30% dos portadores do *T. cruzi* evoluem para enfermidade clinicamente discernível, denominada de fase crônica determinada, caracterizando-se pelas manifestações clínicas relacionadas com o sistema cardiovascular e/ou digestivos, oriundas de lesões que se acumularam e se agravaram no decorrer das fases anteriores (REY, 1992). Segundo Higuchi (1995), o parasito teria papel fundamental no desencadeamento de lesões na fase aguda que influenciariam cronicamente e levariam às alterações cardíacas e digestivas.

De acordo com Storino e col (1986), a evolução e as manifestações clínicas da doença de Chagas são dependentes da relação parasito-hospedeiro, tais como: estado nutricional, constituição genética do indivíduo (hipersensibilidade podendo originar resposta inflamatória de maior intensidade), idade (indivíduos mais jovens apresentam quadros de maior morbidade), resposta imunológica e presença de reinfecção. A cepa do parasito é outro fator importante para a desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi*, pois ela é responsável pela capacidade de infecção celular do parasito, virulência e resistência aos medicamentos. Dentro das pesquisas aplicadas à doença de Chagas, a cepa "Y" é amplamente utilizada em ensaios biológicos, por apresentar alta virulência e poder invasivo, apresentando também uma resistência média aos medicamentos tripanomicidas (UKUMURA *et al*, 1990).

Devido às características tão peculiares da doença de Chagas, a terapêutica é realizada de duas formas distintas: tratamento sintomático e o específico. Para o tratamento sintomático se faz uso de drogas para amenizar as manifestações clínicas da fase crônica, tratando-se as anormalidades cardiovasculares e digestivas com fármacos ou procedimentos cirúrgicos (SIQUEIRA-BATISTA *et al*, 1992). O tratamento específico visa a erradicação do agente etiológico no hospedeiro, e para tanto, existem drogas aplicadas na clínica e experimentalmente. O tratamento específico de pacientes nas áreas endêmicas do Brasil continua a ser feito,

preferencial ou exclusivamente, com o Benzonidazol, já que o Nifurtimox foi retirado do mercado em 1990 (SIQUEIRA-BATISTA *et al*, 1996). Esta droga pode diminuir ou mesmo suprimir a parasitemia durante o tratamento, no entanto, os efeitos colaterais causados tais como: náuseas e vômitos, sensação de fraqueza, irritabilidade e insônia, levam os pacientes a reduzir as doses ou abandonar o tratamento (SILVA, 1994). Experimentalmente, outras drogas como o Megazol, o Itraconazol e o Alopurinol têm sido ensaiadas, mas os resultados parasiticidas divulgados não permitem, ainda, conclusões definitivas (FRAGATA-FILHO *et al*, 1994). Recentemente Urbina e col (1996) testaram um composto derivado de cetoconazol (DO870) em ratos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* obtendo uma supressão da parasitemia, sugerindo cura parasitológica. No entanto, foram encontrados parasitos na forma tecidual nos animais estudados, e os mesmos somente foram eliminados com longo tempo de tratamento dificultando, assim, o emprego desta droga devido à sua toxicidade no uso crônico.

As terapias empregadas na doença de Chagas, para o tratamento específico, estão restritas aos pacientes de fase aguda comprovada, principalmente crianças, indivíduos com a forma crônica indeterminada ou com manifestações clínicas pouco expressivas, com parasitemia comprovada em regime de carências imunitárias (como por exemplo, no uso de imunossupressores ou pacientes H.I.V positivo) e em procedimento de transplantes de órgãos (OMS, 1991).

Diante das limitações encontradas no tratamento da doença de Chagas, se faz necessário o estudo de novos fármacos capazes de eliminar o agente etiológico e/ou amenizar as complicações resultantes da fase crônica. Sendo assim, a investigação de plantas medicinais, popularmente utilizadas no tratamento da doença de Chagas, é de grande valia para a terapêutica desta moléstia.

1.2 - Plantas Medicinais

As plantas sempre representaram para o homem um recurso terapêutico de enorme importância para as mais variadas doenças. Muitas foram as fontes que favoreceram o acúmulo gradual do conhecimento das propriedades terapêuticas das plantas medicinais, tais como: a inspiração, o instinto, o ensinamento pelos animais, as analogias de cor, forma exterior e sabor, etc... (MORGAN, 1997).

O poder farmacológico das plantas está centrado em seus princípios ativos que, em sua maioria, se originam no metabolismo secundário, sendo este decorrente da adaptação às condições adversas do meio, incluindo as estações do ano, tipo de solo, pH, umidade, composição genética, nutrientes e temperatura. Estes compostos se distribuem diferentemente nas diversas partes dos vegetais como raízes, caule e folhas, e sua composição varia de espécie para espécie e até mesmo dentro de uma mesma espécie (MING, 1994). Além disso, esses metabólitos secundários apresentam estrutura química complexa e a maioria não apresenta função definida no organismo onde se encontra (GEISSAMAN *et al*, 1969).

Entre os princípios farmacologicamente ativos com ação antimicrobiana encontrados nas plantas, os taninos e os terpenóides destacam-se por estarem presentes na maioria das plantas, principalmente nas que compõem o cerrado brasileiro (ROBBERS *et al*, 1997).

Quimicamente, os taninos ocorrem como misturas de polifenóis solúveis em água e compreendem um grupo de substâncias amplamente disseminadas no reino vegetal. Esses compostos geralmente são encontrados em determinados órgãos da planta como folhas, frutos e caule. Farmacologicamente, apresentam efeitos antiinflamatórios, anti-diarréicos e cicatrizantes (ROBBERS *et al*, 1997).

Os terpenóides são constituídos por unidades de isopreno. Uma parte dessas substâncias é volátil, tornando-se fácil a identificação devido à fragrância exalada pela planta sendo, assim, denominados óleos essenciais. A ação farmacodinâmica mais característica destes compostos é a antiparasitária e antisséptica, associada a uma ação expectorante, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antiviral, analgésica e antiinflamatória (ROBBERS *et al*, 1997).

O uso de plantas medicinais contra a doença de Chagas é bastante difundido na medicina popular. Há muitos relatos e poucas comprovações científicas, principalmente no que diz respeito aos efeitos destes extratos sobre o *T. cruzi*.

Alguns trabalhos que comprovam a ação de extratos vegetais sobre o *T. cruzi*, estão resumidos no quadro abaixo.

Planta (Família ou Espécie)	Ensaio	Forma do <i>T. cruzi</i>	Autores
Euforbiaceae	<i>in vitro</i>	Epimastigota	GONZALES <i>et al</i> , 1985
<i>Vanillosmopsis erythropappa</i>	<i>in vitro</i>	Epimastigota e Amastigota	CRUZ <i>et al</i> , 1985
Solanaceae	<i>in vitro</i>	Epimastigotas	CHIARI <i>et al</i> , 1988
Euforbiaceae	<i>in vitro</i>	Epimastigota	BELDA-NETO <i>et al</i> , 1988
Asteraceae	<i>in vitro</i>	Epimastigota e Amastigota	BUAINAIN <i>et al</i> , 1988
<i>Zanthoxylum minutiflorum</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigota	CUNHA, 1993
<i>Physalis angulata</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	RIBEIRO <i>et al</i> , 1998
<i>Apisdosperma parvifolium</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	JÁCOME <i>et al</i> , 1998
<i>Norantea brasiliensis</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	ROCHA <i>et al</i> , 1998
<i>Rheedia longifolia</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	BÉRENGER <i>et al</i> , 1998
<i>Clusia criuva</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	CHEDIER <i>et al</i> , 1998
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	<i>in vitro</i>	Tripomastigotas	PIMENTA <i>et al</i> , 1998

No estado de Minas Gerais, mais precisamente no Triângulo Mineiro, a população faz uso do extrato de *Mandevilla velutina* para combater as complicações cardiovasculares e/ou digestivas causadas pela doença de Chagas. A *Mandevilla velutina* pertence à família Apocinaceae, que possui representantes em todas as regiões do Brasil, e são utilizadas nas mais diversas formas, como fornecedoras de madeira de lei (peroba) ou ornamentação de parques e jardins devido as exuberantes flores. Produzem também frutos muito apreciados como a mangaba, mucugê e pequiá, que são utilizados na produção de gomas elásticas. Entre as espécies dessa família, algumas podem apresentar um certo grau de toxicidade, sendo empregadas como inseticidas. Além dessas utilizações, as Apocinaceae se destacam principalmente na medicina folclórica pelo seu emprego para variadas finalidades, tais como: antiparasitária, estimulante cardíaco e antidiarréica (APPEZZATO, 1988).

A espécie *Mandevilla velutina* é vastamente difundida pelo planalto meridional do sul do Brasil sem, contudo, ser frequente ocorrendo esparsamente e nunca formando agrupamentos. Seu habitat preferencial encontra-se nos campos cerrados de Minas Gerais e São Paulo. A área de dispersão no Brasil compreende os

Estados da Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Essa espécie popularmente conhecida como Jalapa, é constituída por um arbusto de pequeno porte que possui um rizoma junto a suas raízes; sua parte vegetativa é composta por folhas simples e as flores são tubulares, de coloração que pode variar do vermelho ao rosa claro (APPEZZATO, 1988).

Em estudos farmacológicos realizados, Calixto e col. (1985) demonstraram que o extrato do rizoma da *Mandevilla velutina* apresenta componentes antiinflamatórios contra picada de serpente *Bothrops jararaca*. Posteriormente, Calixto e col. (1988) demonstraram que o mecanismo de ação destes componentes se deve à atividade antagonista da bradicinina na inflamação causada por picada de serpente. Mais recentemente, foi demonstrado que o extrato de *M. velutina* possui componentes capazes de inibir o ácido aracdônico em edema induzido em pata de rato (CALIXTO, 1991) e antagonizar a ação das fosfolipase A2 e fosfolipase C em edemas de patas de camundongos (NEVES *et al*, 1993).

Tendo em vista as características apresentadas pelas Apocinaceae e as ações farmacológicas comprovadas da *Mandevilla velutina*, torna-se interessante a investigação e elucidação da possível ação desta planta na terapêutica da doença de Chagas.

1.3 - Óxido Nítrico

Tanto em humanos como em animais de experimentação, a infecção pelo *T. cruzi* induz respostas imunológicas que desempenham um papel fundamental no controle do crescimento parasitário. Dentre todas as pesquisas que estão sendo realizadas na tentativa de elucidar os mecanismos implicados no controle da carga parasitária, as que envolvem a produção de óxido nítrico (NO) têm despertado maior interesse pelos estudiosos. O NO é um radical livre sintetizado durante a conversão de L-arginina em L-citrulina, reação catalisada pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) na presença de NADPH e Tetraidrobiopterina. Por sua vez, a NOS existe nos organismos eucariotos sob três isoformas, que se distinguem quanto às propriedades e funções fisiológicas (KNOWLES *et al*, 1994, NATHAN e XIE, 1994): NOS neural (NOS_n - tipo I), NOS induzível (NOS_i - tipo II) e NOS endotelial (NOS_e - tipo III).

Estudos realizados nas diversas áreas do conhecimento têm demonstrado que o NO desempenha várias funções fisiológicas no organismo animal, sendo que a ação citotóxica ou citostática é a mais importante no controle da infecção causada por diversos patógenos. O NOS tipo-II, quando ativada, produz NO por longo período que pode perdurar por dias (KRÖNCKE *et al*, 1994). A NOS tipo II é encontrada em diversas células incluindo os macrófagos, neutrófilos, epitélio tubular renal, adenocarcinoma, hepatócitos, endotélio, endocárdio, células mesageais, cardiomiócitos, fibroblastos, neurônios e astrócitos (NATHAN e XIE, 1994). Já se sabe que em macrófagos de camundongos o interferon- γ (INF- γ) e lipopolissacarídeos (LPS) são capazes de promover a indução transcripcional da NOS_i (NATHAN e XIE, 1994).

Os macrófagos ativados também produzem outros radicais livres com: ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em adição, NO reage com O_2 produzindo peróxinitrito ($ONOO^-$), o qual espontaneamente é transformado em íon hidroxílico (OH^-) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^-). Estes radicais livres são altamente tóxicos e constituem parte essencial do mecanismo de defesa dos fagócitos para destruir microorganismos invasores (HÖLSCHER *et al*, 1998). Além de radicais livres, macrófagos ativados produzem Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), que é uma citocina inflamatória que potencializa a ação parasiticida de macrófagos ativados (WIRTH e KIRSZEBAUM, 1988, SILVA *et al*, 1995). Assim, a resposta imune contra agentes patológicos é dependente da ativação dos macrófagos pelas

citocinas, resultando numa série de respostas bioquímicas que convertem os macrófagos numa potente célula efetora (ROITT *et al*, 1997)

O envolvimento de NO na atividade tripanomicida de macrófagos ativado por INF- γ foi inicialmente demonstrado por Gazzinelli e col (1992) e, em seguida, por Munoz-Fernandes e col (1992). Desde então, vários trabalhos têm confirmado este achado. Neste contexto, estudos comparativos entre linhagens de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção com *T. cruzi* demonstraram que, quando infectados, os animais resistentes apresentam maiores níveis séricos de NO (VESPA *et al*, 1994). Quando animais desta linhagem resistente à infecção com *T. cruzi* foram tratados com anticorpo monoclonal anti-TNF- α ou com inibidores da NOSi, se tornaram altamente susceptíveis à infecção (SILVA *et al*, 1995). Mais recentemente foi demonstrado que, camundongos mutantes deficientes de INF- γ ou NOSi, quando submetidos à infecção com *T. cruzi*, apresentam parasitemia dramaticamente aumentada, severo comprometimento tecidual e morte precoce (HOLSCHER *et al*, 1998).

Assim, a resistência à infecção com *T. cruzi* tem sido associada com a capacidade dos linfócitos produzirem INF- γ , que por sua vez ativa os macrófagos, resultando na produção de TNF- α e de NO e consequente inibição da replicação dos parasitos presentes no seu interior.

Quanto à determinação do NO, diversos métodos estão sendo utilizados, empregando as mais avançadas tecnologias. Esta determinação pode ser feita de forma direta ou indireta, mediante ensaios que reflitam a presença do NO (MARZINZIG *et al*, 1997). O NO produzido *in vivo* e *in vitro* pode ser mensurado, por meio da dosagem de Nitrato (NO₃) e Nitrito (NO₂) que constitui um método indireto utilizado na quantificação de NO (KELM *et al*, 1992), pois este reage rapidamente com O₂ em meio aquoso resultando NO₂ e no sangue o NO reage com o oxigênio ligado ao grupamento heme da hemoglobina produzindo NO₃ (HENRY, 1991).

Tendo em vista a importância do NO na ação tripanomicida de macrófagos ativado, torna-se de fundamental interesse o estudo de princípios ativos vegetais que possam contribuir para a produção de NO, favorecendo a eliminação do parasito e, conseqüentemente, amenizando os efeitos deletérios causados pelo *T. cruzi* no organismo animal.

OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Estudar os efeitos do extrato bruto de *Mandevilla velutina* na fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos infectados com cepa "Y" do *Trypanosoma cruzi*.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a parasitemia e a mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato bruto liofilizado de *M. velutina*.

- Comparar o efeito do extrato bruto de *M. velutina* com o Benzonidazol que é uma droga com ação tripanomicida comprovada.

- Investigar o possível envolvimento do Sistema do Óxido Nítrico no mecanismo de ação do extrato bruto de *M. velutina*.

- Estudar a atividade tripanomicida *in vitro* do extrato.

- Avaliar a possível ação genotóxica do extrato bruto de *M. velutina* em células da medula óssea de camundongos.

- Identificar as principais classes químicas presentes no extrato bruto de *M. velutina*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A - Materiais

3.1 - Biológicos

3.1.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos *outbreed*, com 5 a 6 semanas de idade, pesando entre 30 e 35 gramas, fornecidos pelo Biotério do Vallée Nordeste ou da Pentapharm e mantidos no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (DEGEB-UFU) com ração e água filtrada fornecidas *ad libitum*, à temperatura ambiente

3.1.2 - *Mandevilla velutina* (Apocinaceae)

A coleta do rizoma de *Mandevilla velutina* (anexo1) foi realizada na região de cerrado de Uberlândia - MG, sendo armazenado à -20°C, conforme descrito por Calixto e col (1985).

A identificação taxonômica da planta contou com a valiosa colaboração da Dr^a. Luiza Kinochita Gouveia, do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas - SP.

3.1.3 - *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa "Y" do *T. cruzi*, fornecida pelo Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba), originada de camundongos infectados e mantida por repique semanal no Laboratório de Bioquímica do DEGEB-UFU.

3.1.4 - *Escherichia coli*

Foram utilizadas *E. coli* fornecidas pelo Laboratório de Genética Molecular da UFU, para a produção de nitrato redutase e mantidas congeladas à -70°C, até o momento do uso.

3.2 - Agentes químicos

3.2.1 - Benzonidazol

Foi utilizado o produto comercialmente disponível (Rochagan[®], Roche). Cada comprimido, contendo 100 mg de Benzonidazol, foi triturado, pesado e suspenso em água deionizada para uma concentração final de 60 mg/ml de princípio ativo.

3.2.2 - Inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS)

Foram utilizados dois inibidores inespecíficos para a NOS: N^o-nitro-L-arginina (NOARG) e L-arginina-metil-ester (L-NAME) da SIGMA Chemical Company. Os inibidores foram pesados e dissolvidos em água deionizada em concentrações desejadas.

3.2.3 - Ciclofosfamida (CP)

Utilizou-se a CP-(2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxafosforino 2-óxido), CAS N^o 50-18-0, comercialmente disponível como Enduxan[®], fabricada pelo Laboratório Roche. A CP foi pesada e dissolvida em água estéril para injeção em concentrações desejadas.

3.2.4 - Todos os demais reagentes usados eram de grau analítico.

B- Métodos

3.4 - Preparação do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Mandevilla velutina*.

Numa preparação típica, o rizoma de *M. velutina*, pesando 100 gramas, foi lavado em água destilada por 20 minutos. Posteriormente, foi imerso durante duas horas em solução de etanol 70% e novamente lavado. Em seguida, foi ralado e macerado em 1000 ml de solução de álcool de cereais a 15%, durante sete dias, à temperatura ambiente. Após este período, o extrato foi separado dos fragmentos do rizoma por filtração em papel, acondicionado em frascos plásticos e liofilizado. O material liofilizado foi pesado e ressuspenso em água destilada nas concentrações desejadas e armazenado à 4°C.

3.5 - Determinação da parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*.

A parasitemia foi determinada de acordo com a técnica descrita por Brener (1979), que consiste na contagem do *T. cruzi* no sangue a fresco. O sangue foi coletado por uma secção na cauda do animal (5º ao 12º dia após a infecção), num volume de 5µl, o qual foi distribuído entre lâmina (25,4x76,2mm) e lamínula (22x22mm) e levado ao microscópio óptico (STUDAR LAB. ZEISS) para contagem dos parasitos. O número de tripomastigotas observados por campo foi multiplicado pelo fator de correção para o cálculo da quantidade de parasitas presentes em 1ml de sangue circulante nos camundongos.

3.6 - Produção da infecção com *Trypanosoma cruzi*

Os camundongos foram infectados por injeção intraperitoneal de aproximadamente 50.000 formas sanguíneas do *T. cruzi*. O inóculo desejado foi preparado a partir da diluição do sangue, coletado por punção cardíaca com seringa heparinizada, em uma solução de PBS (Tampão fosfato 0,01M, com salina 0,09%, pH 7,2) contendo soro fetal bovino a 10%, num volume total de 200µl de inóculo por animal (PINTO, 1986). Os animais assim infectados foram separados aleatoriamente para formar os grupos controles e experimentais.

3.7 - Teste de microhematócrito para detecção de tripomastigotas de *T. cruzi*.

O sangue a ser testado foi coletado por meio de um tubo capilar (1,2x75mm) não heparinizado. Logo após, o mesmo foi colocado numa centrifuga de hematócrito em 30.000 rpm por 10 minutos. Ao término da centrifugação os capilares foram levados ao microscópio óptico (aumento de 400x com auxílio do óleo de imersão) para a detecção de tripomastigotas de *T. cruzi*. A observação foi realizada em material obtido da região leucocitária do sangue centrifugado (LAFUENTE, 1985).

3.8 - Investigação da toxicidade do EBL de *M. velutina*

Cinco grupos de animais normais (n=10), escolhidos aleatoriamente, foram mantidos em jejum por 12 horas. Logo após, receberam doses crescentes de EBL, num volume total de 0,5 ml de inóculo, por meio de gavagem. As doses variaram de 0,5 a 5,0 g/kg de animal dependendo do grupo. Os animais foram observados a cada 2 horas até completar 12 horas. Após este período a observação passou a ser realizada a cada 12 horas, até atingir 48 horas.

Na tabela A encontram-se resumidos esses procedimentos.

Tabela A - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.8

Grupos	Animais Normais	EBL de <i>M. velutina</i> mg/kg de animal (dose única)
	Número	
T1	10	0,5
T2	10	1,0
T3	10	2,0
T4	10	3,5
T5	10	5,0

3.9 - Estudo do efeito EBL de *M. velutina* na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Foram formados, aleatoriamente, cinco grupos de animais infectados com *T. cruzi*, sendo cada grupo composto por 10 animais, mantidos em gaiolas separadas. Quatro destes receberam tratamento por gavagem com EBL de *M. velutina*, cujas doses variaram de 25 a 200 mg/kg de animal (GA-25mg/kg, GB-50mg/kg, GC-100mg/kg e GD-200mg/kg). Um grupo recebeu água destilada (GE-controle) num volume total de 0,5 ml por animal. O tratamento foi iniciado imediatamente após a infecção, em intervalos de 24 horas, e se prolongou por 6 semanas. A parasitemia diária de cada animal foi determinada do 5º ao 10º dia após a infecção, e as curvas parasitêmicas foram traçadas com os valores médios calculados para cada grupo de animais. A sobrevivência dos mesmos foi monitorada até 60 dias após a infecção.

Na tabela B encontram-se resumidos esses procedimentos.

Tabela B - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.9

Grupos	Animais Infectados com <i>T. cruzi</i>	EBL de <i>M. velutina</i>	H ₂ O
	Número	mg/kg de animal	ml
GA	10	25	-
GB	10	50	-
GC	10	100	-
GD	10	200	-
GE	10	-	0,5

3.10 - Estudo do pré-tratamento com EBL de *M. velutina* em camundongos infectados com *T. cruzi*.

Para este estudo formaram-se quatro grupos de animais normais (n=5) separados aleatoriamente. Os grupos experimentais GI, GII e GIII receberam um pré-tratamento com EBL, numa única dose de 200 mg/kg de peso, por meio de gavagem, num volume de 0,5ml por animal. Os grupos foram separados de acordo com os dias de pré-tratamento (GI-7dias, GII-3dias e GIII-1dia antes da infecção). O grupo controle (GIV) recebeu somente água destilada 1 dia antes da infecção. A parasitemia diária de cada animal foi determinada do 6º ao 11º dia após a infecção, e as curvas parasitêmicas foram traçadas com os valores médios calculados para cada grupo de animais. A sobrevivência dos mesmos foi monitorada até 45 dias após a infecção.

Na tabela C encontram-se resumido esses procedimentos.

Tabela C - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.10

Grupos	Animais Normais		EBL de <i>M. velutina</i> mg/kg de animal	H ₂ O ml
	Número	dia do pré-tratamento		
GI	05	7	200	-
GI	05	3	200	-
GIII	05	1	200	-
GIV	05	7	-	0,5

3.11 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de *M. velutina* e do Benzonidazol na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*

Neste estudo formaram-se, aleatoriamente, quatro grupos de animais infectados com *T. cruzi*, contendo 10 animais cada e mantidos em gaiolas separadas. Dois destes grupos foram tratados com duas doses distintas de EBL de *M. velutina* (GF-71,5mg/kg e GG-143mg/kg de animal). Um terceiro grupo recebeu duas doses diárias de benzonidazol de 50 mg/kg de peso por dia, o que corresponde ao controle positivo (GH) para a diminuição da parasitemia. O quarto grupo recebeu água destilada (GI-controle negativo), num volume total de 0,5ml por animal. Os tratamentos que ocorreram num intervalo de 12 horas, por meio de gavagem, foram iniciados imediatamente após a infecção e prolongados até o 13º dia de infecção. A parasitemia diária de cada animal foi determinada do 6º ao 10º dia após a infecção, e as curvas parasitêmicas foram traçadas com os valores médios calculados para cada grupo de animais. A sobrevivência dos mesmos foi monitorada até 45 dias após a infecção.

Na tabela D encontram-se resumidos esses procedimentos.

Tabela D - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.11

Grupos	Animais Infectado com <i>T. cruzi</i>	EBL mg/kg	Benzonidazol mg/kg	H ₂ O ml
	Número			
GF	10	71,5	--	--
GG	10	143	--	--
GH	10	--	50	--
GI	10	--	--	0,5

3.12 - Estudo dos efeitos de EBL de *M. velutina* associado aos inibidores da NOS em camundongos infectados com *T. cruzi*.

Para este estudo foram montados dois experimentos utilizando diferentes inibidores da NOS, NOARG e L-NAME.

3.12.1 - Estudo dos efeitos de EBL de *M. velutina* associado ao NOARG em camundongos infectados com *T. cruzi*.

Na associação do EBL com NOARG formaram-se quatro grupos de animais infectados com *T. cruzi*, escolhidos aleatoriamente, contendo 5 animais cada e mantidos em gaiolas separadas. O primeiro grupo (GJ) foi tratado com EBL na dose de 200 mg/kg. O segundo (GK) recebeu o tratamento com NOARG na dose de 50 mg/kg, o terceiro (GL) foi tratado com a associação de EBL+NOARG em doses de 200 mg/kg e 50 mg/kg de peso por dia, respectivamente; o quarto (GM) recebeu água destilada, constituindo, assim, o grupo controle. As administrações de EBL e água foram realizadas por meio de gavagem num volume total de 0,5 ml. O tratamento com NOARG foi feito por meio de injeção intraperitoneal, num volume de 0,2 ml por animal, num intervalo de 24 horas. Paralelamente aos grupos experimentais e controle, foi monitorado um grupo de animais normais que recebeu somente administração de NOARG na mesma dose que o grupo GK. O tratamento dos animais foi realizado até o décimo quinto dia após infecção.

A determinação da parasitemia diária de cada animal foi realizada do 6º ao 10º dia após a infecção e as curvas parasitêmicas foram traçadas com os valores médios calculados para cada grupo de animais. A sobrevivência dos mesmos foi monitorada até 50 dias após a infecção.

Na tabela E estão resumidos esses procedimentos.

Tabela E - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.12

Grupos	Animais Infectado com <i>T. cruzi</i>	EBL mg/kg	NOARG mg/kg	H ₂ O ml
	Número			
GJ	05	200	--	--
GK	05	--	50	--
GL	05	200	50	--
GM	05	--	--	0,5

3.12.2 - Estudo dos efeitos de EBL de *M. velutina* associado ao L-NAME em camundongos infectados com *T. cruzi*.

A associação de EBL com L-NAME, procedeu-se segundo descrito em 3.12.1, substituindo NOARG por L-NAME.

Na tabela F encontram-se resumidos os procedimentos.

Tabela F - Resumo dos procedimentos da associação de EBL + L-NAME

Grupos	Animais Infectado com <i>T. cruzi</i>	EBL mg/kg	L-NAME mg/kg	H ₂ O ml
	Número			
GN	05	200	--	--
GO	05	200	50	--
GP	05	--	50	--
GQ	05	--	--	0,5

3.13 - Dosagem de Nitrito (NO₂) e Nitrato (NO₃) no soro de animais normais tratados com EBL de *M. velutina*

3.13.1 - Tratamento dos animais para obtenção de soro.

Quatro grupos de animais normais (n=5) foram separados aleatoriamente. Os grupos experimentais GR, GS e GT receberam tratamento com EBL na dose de 200 mg/kg de animal por dia, por meio de gavagem, num volume de 0,5ml por animal, os mesmos foram separados de acordo com número de dias de tratamento (GR-7dias, GS-3 dias e GT-1dia). O grupo controle (GU) recebeu água destilada durante 7 dias, num intervalo de 24 horas. Após 24 horas dos respectivos períodos de tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de éter, o sangue foi coletado por meio de punção cardíaca e armazenado em tubos Eppendorf (2ml), à temperatura ambiente, para posterior obtenção do soro.

Na tabela G encontram-se resumidos esses procedimentos.

Tabela G - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.13.1

Grupos	Animais Normais		EBL de <i>M. velutina</i> mg/kg de animal	H ₂ O ml
	Número	nº dias tratados		
GR	05	7	200	-
GS	05	3	200	-
GT	05	1	200	-
GU	05	7	-	0,5

3.13.2 - Dosagens de NO₂ e NO₃

A quantificação de NO₂ e de NO₃ no soro foram realizados conforme a técnica descrita por Granger e col (1996) que se fundamenta numa reação colorimétrica. Para tanto, 500µl de soro foi desproteinizado, por meio de precipitação com 50µl de sulfato de zinco a 10% e 10µl de hidróxido de sódio 2,5N. Posteriormente, foi realizada uma reação de conversão com fosfato de sódio 0,5M, pH 7,2 e formato de amônio 2,4M, pH 7,2, a qual foi adicionada uma alíquota de 10µl de *E. coli*, produtora de nitrato redutase. O material foi mantido em repouso por 2 horas à 37°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada (10.000g, 5 minutos à 20°C); a 100µl do sobrenadante foram adicionados 100µl de reagente de Griess (mistura de volumes iguais de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e de alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% em água). Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 540nm (ESPEKOL, ZEISS).

A concentração sérica de NO₂ de cada amostra foi calculada a partir da equação da reta obtida para a regressão linear da curva padrão construída com nitrito de sódio (0 a 150 µM). Para a determinação da concentração de NO₃ nos soros dos animais foi construída uma curva padrão com nitrato de sódio (0 a 150 µM).

3.14 - Dosagem de Nitrato (NO₃) no soro de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com EBL de *M. velutina*

Para esta finalidade foram formados, aleatoriamente, quatro grupos (GV, GW, GX e GY) de animais (n=5). Dois destes grupos continham animais infectados com *T. cruzi* (GV e GW). O GV recebeu tratamento com EBL (200 mg/kg) e o controle GW recebeu água destilada, num volume total de 0,5ml. Os outros dois grupos, compostos por animais normais, foram tratados igualmente aos grupos anteriores (GX-EBL na dose de 200mg/kg e GY-0,5 ml de água destilada).

Os tratamentos foram iniciados imediatamente após a infecção, em intervalos de 24 horas, e se prolongaram por 14 dias. A partir do 6º dia de infecção, um animal de

cada grupo foi sacrificado em câmara de éter a cada 48 horas. O sangue destes animais foi coletado, por punção cardíaca, e armazenado em tubos Eppendorf (2,0 ml) à temperatura ambiente para a obtenção do soro. A dosagem de NO_3 no soro procedeu-se como descrito em 3.13.2.

Paralelamente a esses procedimentos, a parasitemia diária de cada animal foi determinada do 6º ao 14º dia após a infecção. As curvas parasitêmicas foram traçadas com os valores médios calculados para cada grupo de animais.

Na tabela H encontram-se resumidos esses procedimentos.

Tabela H - Resumo dos procedimentos descritos no item 3.14

Grupos	Animais			EBL de <i>M. velutina</i> mg/kg de animal	H ₂ O ml
	Número	Normal	Infectado/ <i>T. cruzi</i>		
GV	05	-	+	200	-
GW	05	-	+	-	0,5
GX	05	+	-	200	-
GY	05	+	-	-	0,5

3.15 - Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos do EBL de *M. velutina*.

Para este estudo foi realizada a análise de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) da medula óssea femural de camundongos, conforme descrito por Schmid (1975). Para tanto, formaram-se cinco grupo de animais normais (n=5) escolhidos aleatoriamente e mantidos separados. Três destes grupos receberam doses distintas de EBL de *M. velutina* (GI-100 mg/kg, GII-200 mg/kg e GIII-800 mg/kg de animal por dia), num volume final de 0,5 ml por animal, em intervalos de 24 horas, durante 7 dias. O GIV foi tratado somente com água destilada e o GV (controle positivo) recebeu, no 6º dia, uma dose de 20 mg/kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal.

No sétimo dia os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para posterior obtenção de células da medula óssea de acordo com a técnica descrita por Schmid (1975). As epífises dos fêmures retirados dos animais foram seccionadas e a medula óssea foi obtida por punção, sendo posteriormente emulsionada com soro fetal bovino. Após este procedimento, as amostras de células da medula foram espalhadas em lâminas, secadas e fixadas com metanol por 5 minutos. Após 24 horas, as mesmas foram coradas com uma solução 1:20 de GIEMSA com tampão fosfato, 0,01M, pH 7,2. Posteriormente, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico (aumento de 1000x) para contagem de 2000 eritrócitos policromáticos por lâmina, quantificando-se também

o número de micronúcleos encontrados. Os valores encontrados de EPCMN em cada animal dos diferentes grupos foram submetidos ao teste para eventos raros (PEREIRA, 1991).

3.16 - Métodos para a triagem fitoquímica do extrato bruto (EB) de *M. velutina*

Os métodos realizados para a triagem fitoquímica foram baseados nas técnicas descritas por Wagner e col. (1984) e Williamson e col. (1996).

3.16.1 - Extração do EB.

O rizoma da planta pesando 800g foi triturado em liquidificador industrial com capacidade para 8 litros e macerado em solução de etanol 70%, durante 4 dias, à temperatura ambiente. O extrato obtido foi separado dos fragmentos do rizoma por meio de filtragem a vácuo com papel de filtro intercalado com placas de algodão. Evaporou-se sob vácuo o etanol presente no extrato, em evaporador rotatório (HERDOLPH WB 200). Tomou-se a fração aquosa restante e extraiu-se com três volumes de éter etílico, resultando em duas frações: uma orgânica menos polar e outra aquosa que contem componentes de maior polaridade. As amostras obtidas foram liofilizadas e 1,0g de extrato seco foi ressuscitado em 100 ml de etanol absoluto, para realização da triagem fitoquímica.

3.16.2 - Determinação de triterpenos e esteróides.

Utilizou-se um volume de 20 ml de EB de cada fração, evaporado até a secura e dissolvidos em 50 ml de etanol absoluto. A uma alíquota de 40 ml foram adicionados 10 ml de hidróxido de potássio 0,5M, a qual foi submetida a um sistema de refluxo por duas horas. À amostra resultante do refluxo, adicionou-se 10 ml de água destilada e evaporou-se em rotavapor para retirada total do álcool. A amostra resultante da evaporação foi tratada com 10 ml de éter etílico por três vezes, obtendo-se 30 ml de fração orgânica (etérea). Uma alíquota de 5ml foi separada e submetida à reação de Liebermann-Buchard (volumes iguais de ácido acético anidro e clorofórmio, acrescidos de 3 a 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado), onde a formação de um anel verde azulado e uma interfase marrom indica a presença de triterpenos e esteróides.

3.16.3 - Determinação de carotenóides.

Após realizar os mesmos procedimentos para determinação de triterpenos e esteróides até a fração orgânica (etérea), tomou-se uma alíquota de 5 ml desta fração, a qual foi submetida à reação de Carr-Price, que consistiu na evaporação até a secura, ressuspensão em 5ml de clorofórmio e adição lenta de três gotas de reagente de Carr-Price (25g de cloreto de antimônio III em 75ml de clorofórmio). Nesta reação a formação de um precipitado branco e uma fase sobrenadante azul indica a presença de carotenóides.

3.16.4 - Determinação de ácidos graxos.

Após realizar os mesmos procedimentos de determinação de triterpenos e esteróides até a obtenção da fração orgânica (etérea), esta fração foi acidificada com ácido clorídrico até pH 3,0 a 4,0, e depois submetida a uma reextração com 10 ml de éter etílico absoluto por duas vezes e evaporou-se em um tubo de ensaio até secura total. Após a secura, a formação de resíduos como cristais na parede do tubo indica a presença de ácidos graxos.

3.16.5 - Determinação de alcalóides.

Neste ensaio utilizaram-se 10 ml de EB evaporado até secura e o resíduo resultante da evaporação foi dissolvido em 3 ml de ácido clorídrico concentrado. A solução resultante foi dividida em três porções iguais. À primeira adicionou-se três gotas de reagente de Mayer (solução de 1,35g de cloreto de mercúrio e 5g de iodeto de potássio em 100ml de água). A segunda foi utilizada como branco e à terceira adicionou-se três gotas de uma solução reagente de Bertrand (ácido silicotúngstico 5%), sendo que a formação de um precipitado branco nos tubos um e três indica a presença de alcalóides.

3.16.6 - Determinação de agliconas flavônicas.

Para este teste foi utilizado uma alíquota de 5 ml de EB, evaporado até a secura total. O resíduo resultante da evaporação foi dissolvido em 2 ml de metanol 50% a quente. À solução resultante foram adicionadas limalhas de magnésio em pequena quantidade e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Aguardou-se 10 minutos para o processamento da reação, onde a mudança de cor para uma coloração avermelhada indica a presença de agliconas flavônicas.

02594/99

3.16.7 - Determinação de emodóis.

Neste ensaio foram utilizados 5 ml de EB, evaporado até a secura e o resíduo resultante foi dissolvido em 1 ml de hidróxido de amônio 25%. Na mistura final, o aparecimento de uma coloração vermelha indica a presença de emodóis

3.16.8 - Determinação de cumarinas.

Neste ensaio foram utilizados 5 ml de EB, evaporados até a secura e o resíduo resultante foi dissolvido em 1 ml de água destilada fervente. Duas alíquotas foram aplicadas em um papel de filtro com o auxílio de capilar de vidro, formando duas manchas. Sobre uma das manchas foi aplicado uma gota de solução de hidróxido de potássio 0,5M e as manchas foram observadas sob luz ultravioleta a 366nm (MINERALIGHT - 25 254/366). A fluorescência da mancha indica a presença de cumarina.

3.16.9 - Determinação de Taninos gálicos e catéquicos.

Neste ensaio foi utilizado um volume de 5 ml de EB, diluído em 2 ml de água destilada, ao qual foram adicionados três a cinco gotas de solução de cloreto férrico a 1%. Nesta condição, a mudança de cor da solução para azul indica a presença de taninos gálicos e para verde, a presença de taninos catéquicos.

3.16.10 - Determinação de Saponinas.

Para este ensaio foram utilizados 5 ml de EB, diluídos em 45 ml de água destilada. Esta solução foi submetida a uma agitação vigorosa por 5 minutos e a formação de espuma que se mantém por 20 minutos indica a presença de saponinas.

3.16.11 - Determinação de Compostos Redutores.

Neste ensaio foi utilizado um volume de 5 ml de EB ao qual acrescentou-se 1ml de solução de Fehling [36,65g de sulfato de cobre, 172g de sal de Rochelle (tartarato de sódio tetra hidratado) e 125g de hidróxido de potássio em 1000ml de água]. Esta mistura foi submetida ao sistema de evaporação e condensação por refluxo durante 30 minutos. O aparecimento de precipitado cor de tijolo corresponde à presença de compostos redutores.

BIBLIOTECA DE QUÍMICA

3.16.12 - Determinação de Amido.

Para este ensaio foram utilizados 5 ml de EB onde adicionou-se 3 ml de água destilada e 2 gotas de lugol (100g de iodeto de potássio e 50g de iodo metálico em 1000ml de água). O aparecimento da coloração azul corresponde à presença de amido.

3.16.13 - Determinação de Mucilagens.

A presença de mucilagens foi pesquisada utilizando-se 5ml de EB, onde foram adicionados 10 ml de acetona absoluta e 5 gotas de hematoxilina (10%). Após agitação vigorosa, o material foi filtrado em papel de filtro. O aparecimento de precipitado violeta corresponde à presença de mucilagens.

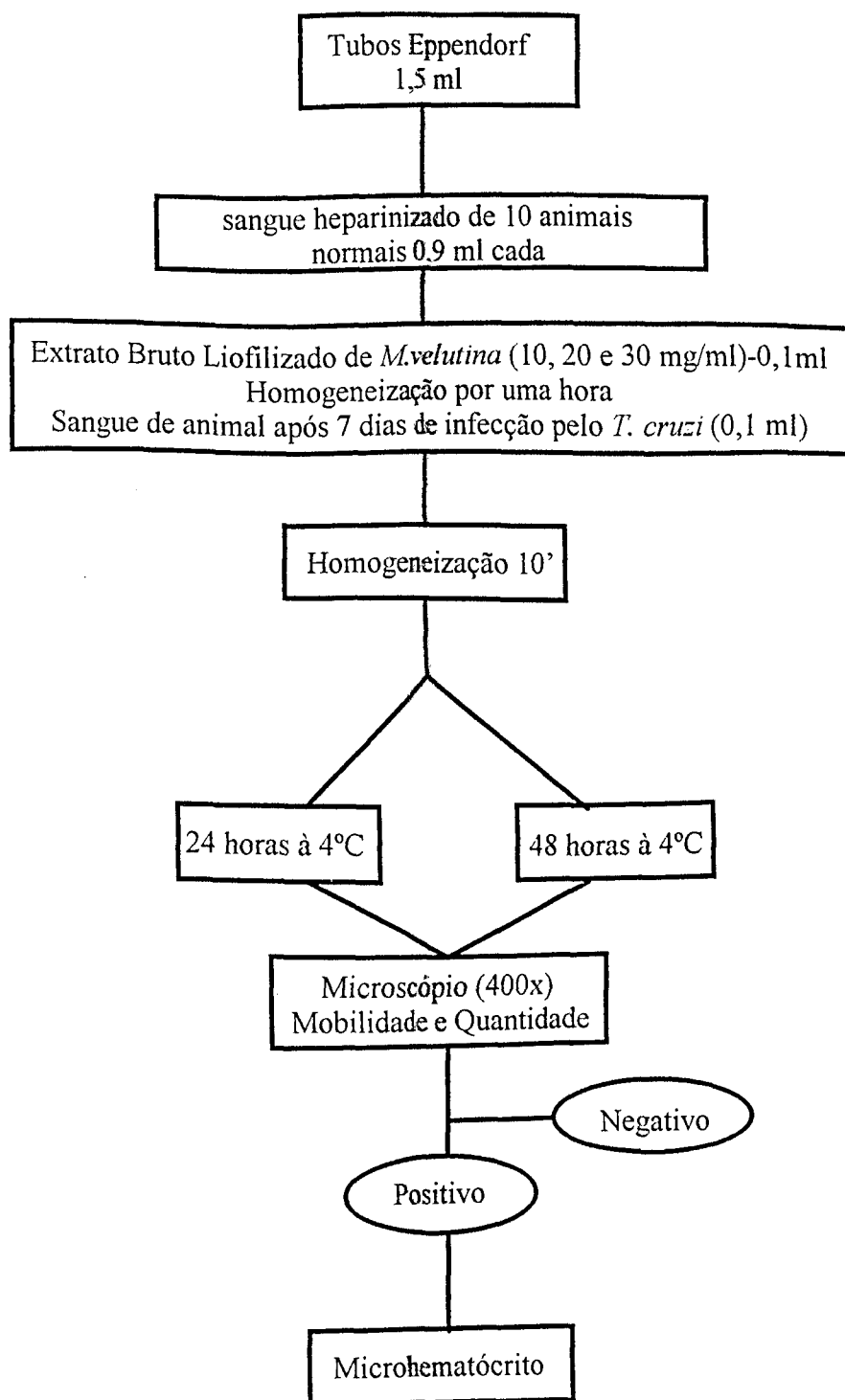
3.17 - Estudo do efeito tripanomicida *in vitro* do EBL de *M. velutina*.

Os ensaios tripanomicidas *in vitro* foram baseados em metodologia desenvolvida por Cover & Gutteridge (1982).

Dez tubos Eppendorf (1,5ml) contendo 0,9ml de sangue heparinizado de animais normais foram separados em 5 lotes de dois tubos. Três destes lotes receberam diferentes concentrações de EBL de *M. velutina*, num volume total de 0,1ml (T1-10mg/ml, T2-20mg/ml e T3-30mg/ml), o quarto (T4-sangue com *T. cruzi*) e quinto (T5-sangue sem *T. cruzi*) lotes foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente. Os tubos foram homogeneizados por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados aos lotes T1, T2, T3 e T4 0,1ml de sangue contendo aproximadamente 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi*. O lote T5 recebeu o mesmo volume de água destilada. Os lotes foram homogeneizados por 10 minutos e incubados à 4°C. Depois de 24 e 48 horas de incubação, amostras destas misturas foram examinadas, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico (aumento de 400x). Pesquisou-se 50 campos por lâmina, onde os tripomastigotas avaliados quanto a mobilidade e quantidade (BRENER *et al.*, 1979). Nas amostras onde não foram encontrados parasitos, o sangue foi submetido ao teste do microhematócrito.

No organograma 01 se encontram-se resumidos esses procedimentos.

Organograma 01 - Resumo dos procedimentos descritos no ítem 3.17



3.18 - Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística do Teste ANOVA utilizando o programa Microsoft Systat. Para a análise dos EPCMN foi utilizado o teste para eventos raros conforme descrito por Pereira (1991).

RESULTADOS

4.1 - Investigação da toxicidade do EBL de *M. velutina*.

Para investigar os possíveis efeitos tóxicos do EBL foram montados 5 grupos de animais normais, os quais receberam doses crescentes, que variaram de 0,5 a 5,0 g/kg de peso, dependendo do grupo. Após observação realizada de acordo com o item 3.8, constatou-se que não houve óbito nos grupos estudados no período que foi até 48 horas após a administração do EBL.

4.2 - Efeito do EBL de *M. velutina* na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*.

A investigação do efeito do EBL na parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* foi realizada por meio da administração do extrato em doses crescentes, de acordo com o item 3.9. Os valores das parasitemias (7º, 8º e 9º dia após infecção) dos grupos experimentais (GA, GB, GC e GD) e controle (GE) estão apresentados na Tabela 01.

Na Figura 01 estão apresentadas as curvas de parasitemia, traçadas a partir das médias aritméticas diárias de cada grupo. Baseando-se nos resultados obtidos com cada curva, foi possível constatar que os grupos de animais tratados com EBL apresentaram redução da parasitemia.

Na Figura 02 estão apresentadas as porcentagens de diminuição da parasitemia, calculadas entre o sétimo e oitavo dia após a infecção, dos grupos experimentais, sendo que esta foi mais acentuada no grupo GD. Na Figura 03 estão apresentadas as taxas de sobrevivência para cada grupo estudado. Os resultados demonstram que o grupo sem tratamento (GE) apresentou 100% de mortalidade e a sobrevivência dos grupos tratados foi diretamente proporcional à dose de EBL, sendo que no grupo GD 100% dos animais sobreviveram até 60 dias pós-infecção.

Tabela 01 - Valores da parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos tratados com EBL (GA-25mg/kg, GB-50 mg/kg, GC-100mg/kg e GD-200mg/kg de animal) e controle (GE-0,5ml de H₂O destilada).

Animais	Parasitemia (x 20.000) por ml de sangue														
	GA			GB			GC			GD			GE		
	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°
A1	102	108	0	37	20	8	40	60	18	6	13	0	93	161	14
A2	131	24	8	75	46	19	85	75	21	18	84	16	135	175	31
A3	49	151	27	99	133	24	32	11	2	0	0	0	108	171	24
A4	40	78	32	71	46	18	15	22	8	35	37	7	147	163	28
A5	30	70	10	12	149	22	39	29	12	27	20	0	135	77	10
A6	32	90	21	54	80	14	11	14	4	0	22	2	104	69	19
A7	92	127	32	52	85	17	0	0	0	0	39	6	93	123	22
A8	86	122	13	2	4	0	0	0	0	12	4	0	0	0	2
A9	58	45	0	2	3	0	58	52	21	0	0	0	89	24	16
A10	108	95	5	63	26	5	0	0	0	0	0	0	9	91	14
Médias	72,8	91	14,8	46,7	59,2	12,7	31,1	29,3	8,6	9,8	21,9	3,1	91	105,7	18

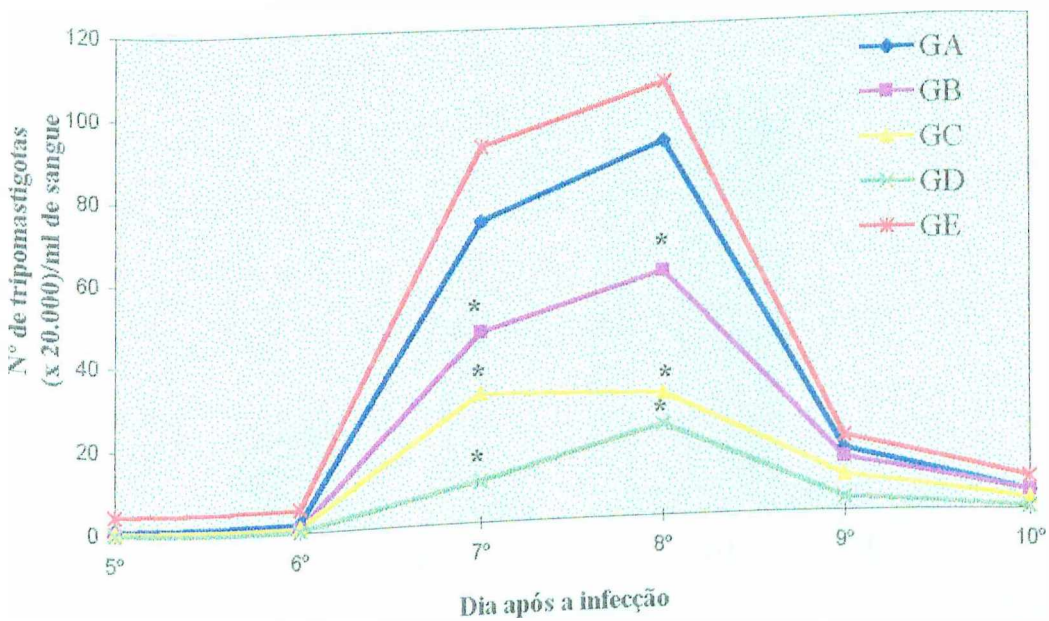


Figura 01 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com *T. cruzi* tratados com doses crescentes de EBL de *M. velutina* (GA-25mg/kg, GB-50 mg/kg, GC-100mg/kg e GD-200mg/kg de animal) e controle (GE-0,5 ml de H₂O destilada). *P<0,05 (Teste ANOVA) quando comparado com o grupo de animais do grupo controle.

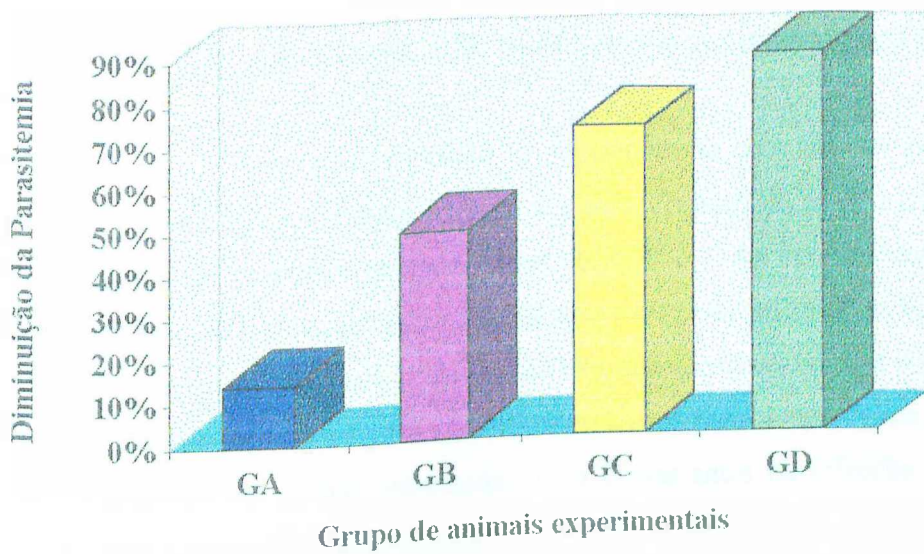


Figura 02 - Porcentagem de diminuição da parasitemia nos grupos de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com EBL de *M. velutina* (GA-25mg/kg, GB-50 mg/kg, GC-100mg/kg e GD-200mg/kg de animal), calculada a partir das médias parasitêmicas do 7º e 8º dia após infecção e comparada ao grupo controle (GE-0,5 ml de H₂O destilada), cujo o valor médio foi considerado 100%.

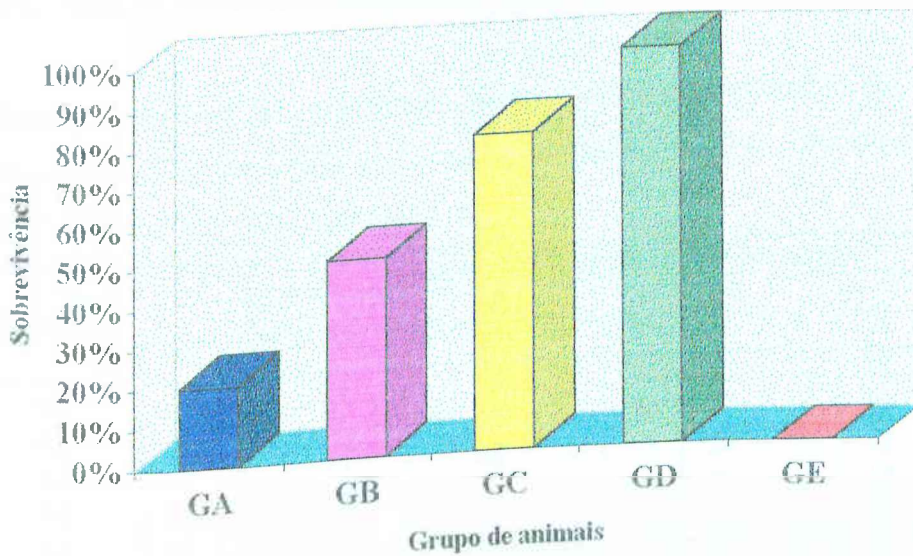


Figura 03 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com EBL de *M. velutina* (GA-25mg/kg, GB-50 mg/kg, GC-100mg/kg e GD-200mg/kg) e do grupo sem tratamento (GE-0,5 ml de H₂O destilada). O monitoramento da sobrevivência foi realizado até 60 dias pós-infecção.

4.3 - Estudo do pré-tratamento com EBL de *M. velutina* em camundongos infectados com *T. cruzi*.

Neste estudo investigou-se o efeito do pré-tratamento com EBL de *M. velutina* sobre a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*, de acordo com o item 3.10. Os valores das parasitemias determinadas no 7º, 8º e 9º dia após a infecção estão expostos na Tabela 02. Utilizando as médias diárias das parasitemias foi possível traçar as curvas parasitêmicas para cada grupo (Figura 04), onde constatou-se que o grupo pré-tratado (GIII) 1 dia antes da infecção resultou numa menor parasitemia (Teste ANOVA) quando comparado aos grupos pré-tratados 3 ou 7 dias antes da infecção, GI e GII respectivamente, e sem tratamento (GIV).

Na Figura 05 estão apresentadas as porcentagens de diminuição da parasitemia dos grupos experimentais, calculadas entre 7º e 9º dia após infecção, em comparação ao controle (GIV), constatou-se uma diminuição de 78% para o grupo GIII, 55% para o GII e 33% para o GI, quando comparados ao grupo GIV (controle)

Os animais dos grupos experimentais e controle foram monitorados quanto ao óbito até 45 dias após a infecção, possibilitando assim, o cálculo da porcentagem de sobrevivência dos animais em cada grupo estudado. Constatou-se que a sobrevivência foi maior nos animais tratados com EBL (20 a 60%) e no grupo sem tratamento (GIV) houve 100% de mortalidade (Figura 06).

Tabela 02 - Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos pré-tratados com EBL numa dose de 200mg/kg de animal (GI-7dias, GII-3dias e GIII-1dia) e GIV-controle (0,5 ml de H₂O destilada).

Animais	Parasitemia (x 20.000) por ml de sangue											
	GI			GII			GIII			GIV		
	7º	8º	9º	7º	8º	9º	7º	8º	9º	7º	8º	9º
A1	42	68	34	14	36	13	10	25	20	47	88	76
A2	31	56	16	22	49	26	12	23	11	68	129	102
A3	56	127	45	13	68	37	13	34	22	73	132	111
A4	29	131	69	62	75	49	10	20	17	45	165	142
A5	15	28	12	24	46	21	11	36	22	67	101	97
Médias	34,6	82,0	35,2	27	54,8	29,5	11,2	27,5	18,4	60	123	105,6

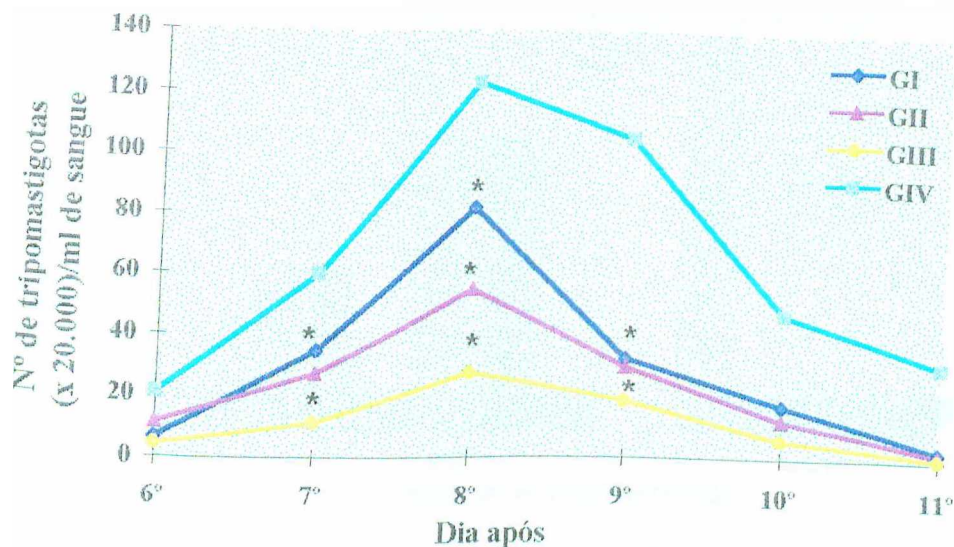


Figura 04 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com *T. cruzi* pré-tratados com dose única de EBL de *M. velutina* (GI-7, GII-3 e GIII-1 dia antes da infecção), e sem tratamento (GIV-água). * $P < 0,05$ (Teste ANOVA) quando comparado com o grupo de animais do grupo controle.

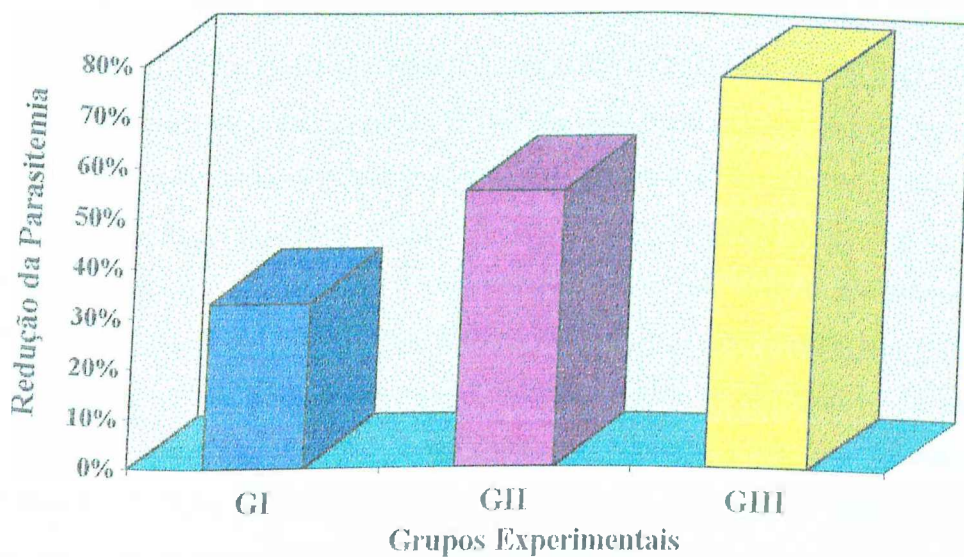


Figura 05 - Porcentagem de redução da parasitemia nos grupos de animais infectados com *T. cruzi* e pré-tratados com EBL de *M. velutina* (GI-7, GII-3 e GIII-1 dia antes da infecção), calculada a partir das médias parasitêmicas do 7º e 8º dia após infecção e comparada ao grupo controle (GIV-água), considerando sua parasitemia média igual a 100%.

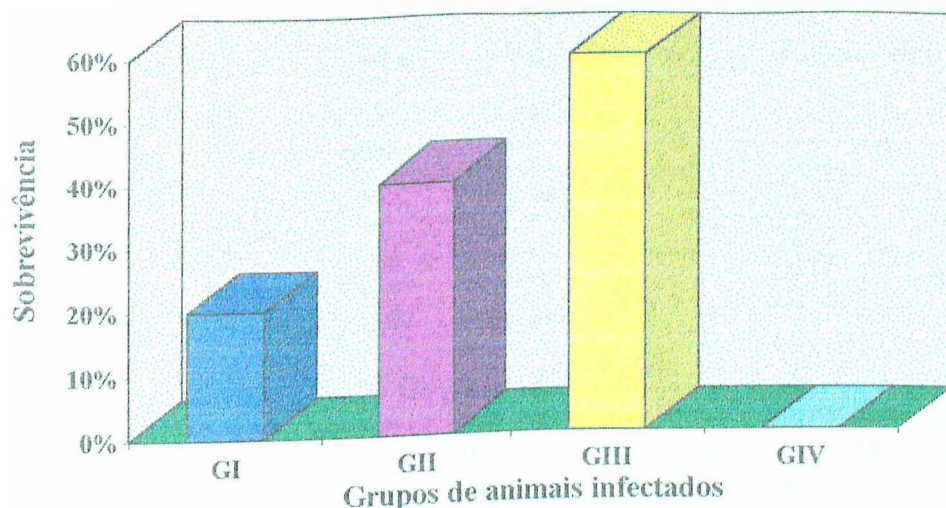


Figura 06 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e pré-tratados com EBL de *M. velutina* (GI-7, GII-3 e GIII-1 dia antes da infecção), e sem tratamento (GIV-controle). O monitoramento da sobrevivência foi realizado até o 45º dia pós-infecção.

4.4 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de *M. velutina* e do Benzonidazol na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*

Neste estudo comparou-se o efeito do EBL com o do Benzonidazol sobre a parasitemia de animais infectados com *T. cruzi*, de acordo com o item 3.11. Os valores das parasitemias determinadas no 7º, 8º e 9º dia após a infecção estão expostos na Tabela 03. A partir do cálculo das médias diárias das parasitemias foi possível traçar as curvas parasitêmicas para cada grupo (Figura 07), onde constatou-se que os grupos tratados com duas doses diárias de EBL (GF e GG) resultaram em uma menor parasitemia quando comparados aos grupos tratados com Benzonidazol (GH) e sem tratamento (GI).

Na Figura 08 estão apresentadas as porcentagens de diminuição da parasitemia dos grupos experimentais em comparação ao controle (GI), constatando-se uma diminuição de 77% para o grupo GF e 90% para o GG, ambos tratados com EBL, enquanto que o grupo GH tratado com benzonidazol resultou em uma diminuição de 52%.

Os animais dos grupos experimentais e controle foram monitorados quanto ao óbito até 45 dias após a infecção, a partir do qual foi possível calcular a porcentagem de sobrevivência dos animais em cada grupo estudado e constatar que a sobrevivência foi maior nos animais tratados com EBL (Figura 09).

Tabela 03 - Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos tratados com duas doses diárias EBL (GF-71,5mg/kg, GG-143mg/kg), Benzonidazol (GH- 50 mg/kg) e com água destilada (GI-0,5 ml por dia).

Animais	Parasitemia (x 20.000) por ml de sangue											
	GF			GG			GH			GI		
	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°
A1	05	06	02	06	04	01	01	40	04	62	26	05
A2	02	04	01	10	01	00	02	20	00	48	31	03
A3	02	02	01	00	00	00	00	13	08	40	27	00
A4	02	02	00	00	00	00	01	16	06	00	00	02
A5	01	04	02	02	02	00	02	00	00	30	18	05
A6	04	06	03	00	02	01	02	08	04	18	20	03
A7	02	00	00	00	00	00	03	00	00	52	57	04
A8	05	17	08	02	06	02	03	06	03	10	07	00
A9	02	04	01	00	00	00	04	00	00	18	07	02
A10	02	05	02	00	00	00	02	04	00	02	29	06
Médias	2,7	5,0	2,0	02	1,5	0,4	2,0	10,7	1,7	28,0	22,2	2,4

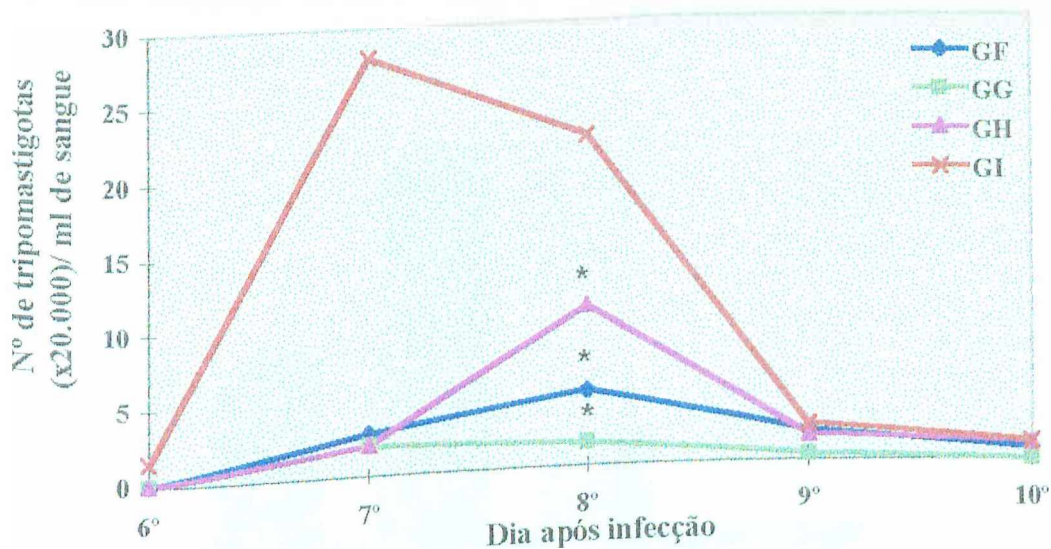


Figura 07 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com *T.cruzi* tratados com duas doses diárias de EBL (GF-71,5mg/kg, GG-143mg/kg), Benzonidazol (GH- 50mg/kg) e sem tratamento (GI-0,5 ml de H₂O destilada). * P<0,05 (Teste ANOVA) quando comparado com o grupo de animais controle.

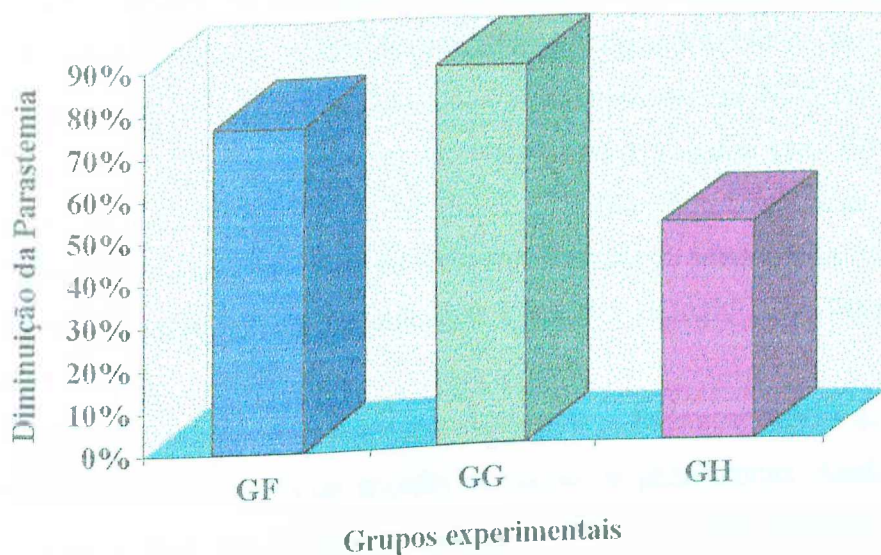


Figura 08 - Porcentagem de diminuição da parasitemia nos grupos de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com duas doses diárias de EBL (GF-71,5 mg/kg, GG-143 mg/kg), Benzonidazol (GH-50mg/kg), calculada a partir das médias parasitêmicas do 7º e 8º dia após infecção e comparada ao grupo controle (GI-0,5 ml de H₂O destilada), considerando sua parasitemia média igual a 100%.

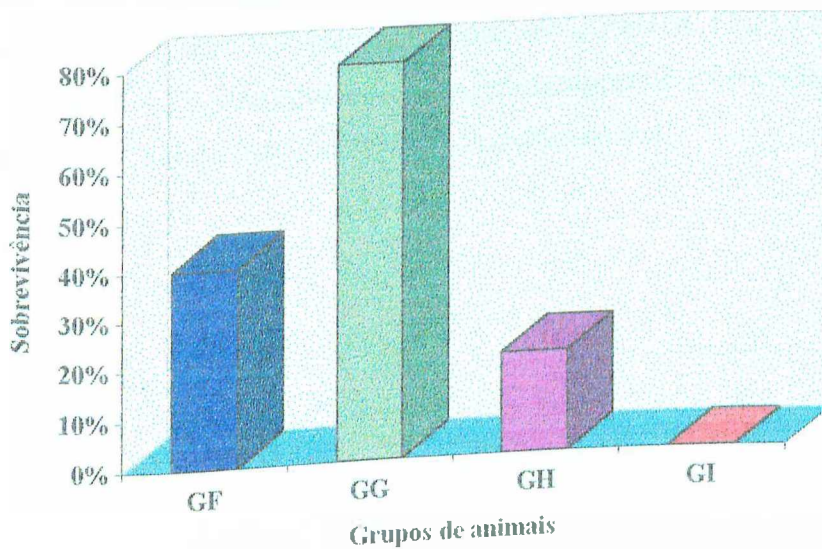


Figura 09 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com duas doses diárias de EBL (GF-71,5mg/kg, GG-143 mg/kg), Benzonidazol (GH-50mg/kg) e sem tratamento (GI-controle). O monitoramento da sobrevivência foi realizado até o 45º dia pós infecção.

4.5 - Estudo comparativo dos efeitos do EBL de *M. velutina* associado aos inibidores da NOS na parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Neste experimento foram utilizados dois inibidores da NOS (NOARG e L-NAME). Quatro grupos de animais infectados foram tratados com EBL e com a associação de EBL+inibidor até o 13º dia de infecção. Para tanto, cada inibidor foi testado separadamente. Na Tabela 04 estão apresentadas as parasitemias dos grupos de animais experimentais e controle utilizando o inibidor NOARG e na Tabela 05 as do inibidor L-NAME.

Para cada experimento foram calculadas as médias parasitêmicas de cada grupo e com base nas mesmas foram traçadas as curvas de parasitemias. Analisando estas curvas (Figura 10 e 11) constatou-se que a associação do EBL+inibidor (GK e GO) resulta numa maior parasitemia quando comparado aos grupos tratados somente com EBL (GJ e GN). Os animais tratados somente com inibidor (GL e GP) apresentaram uma parasitemia superior aos animais do grupo controle (GM e GQ).

A sobrevivência dos animais infectados, tanto controle quanto experimentais, foi acompanhada até o 50º dia pós-infecção, onde foi constatado que os animais tratados(GI) somente com extrato apresentaram uma sobrevivência superior aos tratados com a associação de EBL+inibidor (GK e GO) e estes sobreviveram mais que os animais dos grupos tratados somente com inibidores (GL e GP) e controle GH e GQ). Na Figura 12 e 13 estão apresentadas as porcentagens de sobrevivência dos animais do experimento com NOARG e L-NAME, respectivamente.

Tabela 04 - Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos experimentais (GJ-EBL-200mg/kg, GK-EBL-200mg/kg + NOARG-50mg/kg) e controles (GL-NOARG-50 mg/kg, GM-0,5 ml de H₂O destilada).

Animais	Parasitemia (x 20.000) por ml de sangue											
	GJ			GK			GL			GM		
	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°
A1	0	15	7	9	82	72	77	239	201	34	202	147
A2	0	6	3	2	64	52	44	321	258	4	275	206
A3	0	38	19	0	49	60	10	198	134	8	68	47
A4	0	0	0	9	102	49	95	282	198	5	88	52
A5	0	13	8	0	6	37	12	304	252	67	257	190
Médias	0	14,4	7,4	4	72,4	54	47,6	268,8	208,6	23,6	178,4	127,4

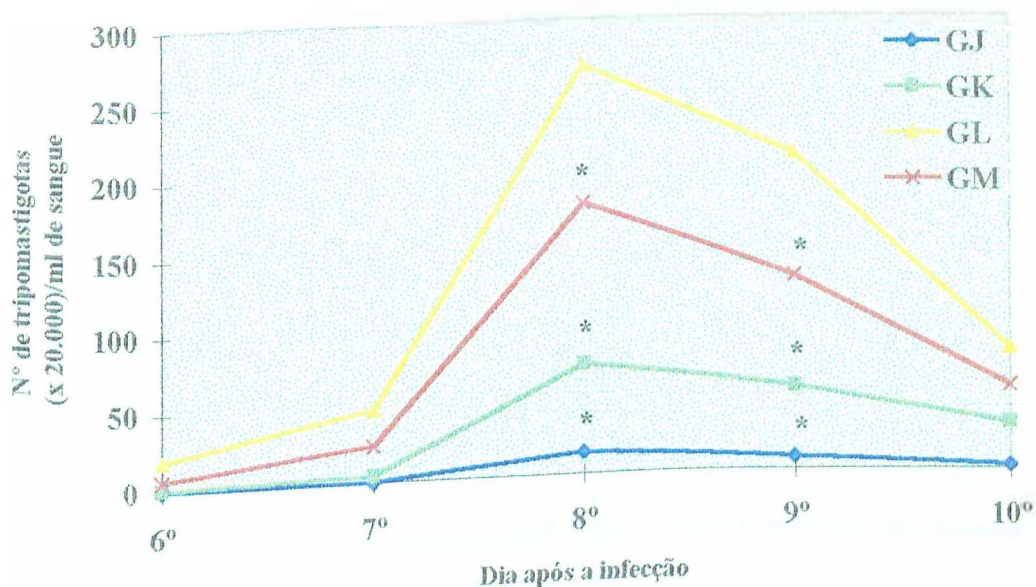


Figura 10 - Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com *T. cruzi* tratados com EBL de *M. velutina* (GJ-200mg/kg), EBL+NOARG (GK- EBL-200mg/kg + NOARG-50mg/kg), NOARG (GL-50mg/kg) e sem tratamento (GM). * P<0,05 (Teste ANOVA) quando comparado com o grupo controle (GM).

Tabela 05 - Valores das parasitemias diárias e médias parasitêmicas dos grupos experimentais (GN-EBL-200mg/kg, GO-EBL-200mg/kg + L-NAME-50mg/kg), controles (GP- L-NAME-50 mg/kg e GQ-0,5 ml de H₂O destilada).

Animais	Parasitemia (x 20.000) por ml de sangue											
	GN			GO			GP			GQ		
	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°	7°	8°	9°
A1	0	13	8	25	46	37	142	84	70	81	144	97
A2	0	7	4	73	6	3	97	133	117	104	212	157
A3	0	0	0	39	119	96	110	206	177	74	163	122
A4	0	15	9	49	84	39	95	181	153	57	169	131
A5	0	0	0	33	59	21	218	314	218	93	163	112
Médias	0	7	4,2	43,8	62,8	39,2	132,4	183,6	147	81,8	168,2	97,6

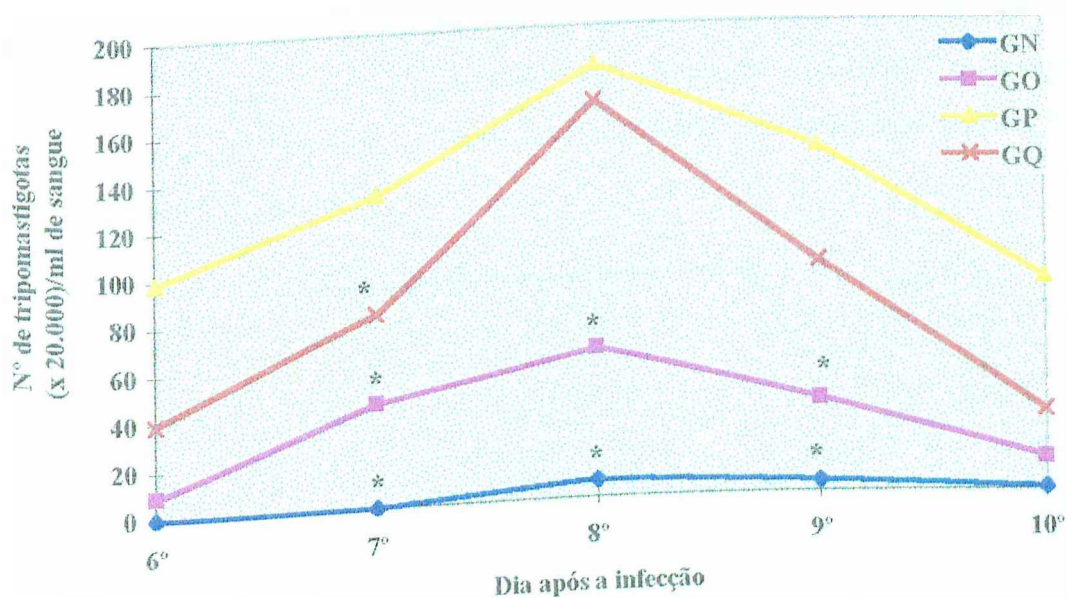


Figura 11- Curvas de parasitemia dos grupos de animais infectados com *T. cruzi* tratados com EBL de *M. velutina* (GN-200mg/kg), EBL+L-NAME (GO- EBL-200mg/kg + L-NAME 50mg/kg), L-NAME (GP-50mg/kg) e sem tratamento (GQ). * P<0,05 (Teste ANOVA) quando comparado com o grupo controle negativo (GQ).

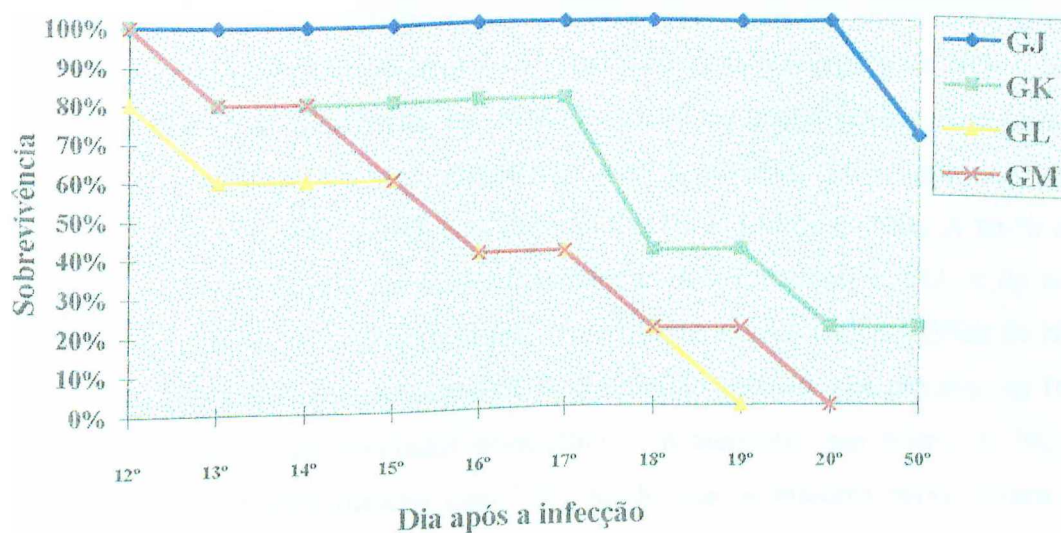


Figura 12 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com EBL de *M. velutina* (GJ-200mg/kg), EBL+NOARG (GK-EBL-200mg/kg + NOARG 50mg/kg), NOARG (GL-50mg/kg) e sem tratamento (GM). O monitoramento da sobrevivência foi realizado até o 50° dia pós infecção.

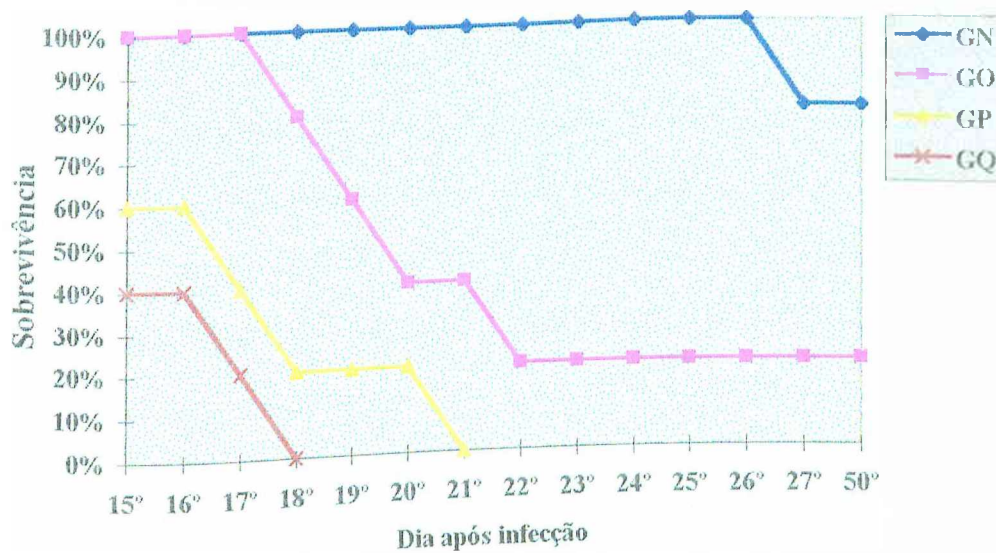


Figura 13 - Taxa de sobrevivência dos animais infectados e tratados com EBL de *M. velutina* (GN-200mg/kg), EBL+L-NAME (GO-EBL 200mg/kg + L-NAME 50mg/kg), L-NAME (GP-50mg/kg) e sem tratamento (GQ). O monitoramento da sobrevivência foi realizado até o 50° dia pós infecção.

4.6 - Dosagem de nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) no soro de animais normais e tratados com EBL de *M. velutina*.

O soro de animais tratados com EBL (200mg/kg por dia) por diferentes períodos de tempo, conforme descrito no item 3.13.1, foi submetido à dosagem de NO_2 e NO_3 seguindo a metodologia descrita no item 3.13.2. Para tanto fez-se necessária a construção de gráficos com as respectivas curvas padrões. Na Figura 14 está apresentada a curva padrão de NO_2 e na Figura 15, a curva padrão de NO_3 . A partir das respectivas equações da reta, foi possível calcular as concentrações de NO_2 e de NO_3 das amostras de soros dos animais tratados com EBL. As concentrações médias de NO_3 e NO_2 dos grupos animais experimentais e controle estão apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Tais resultados demonstram um aumento nos níveis de NO_3 e NO_2 no soro de animais tratados com EBL, sendo que os maiores níveis foram no grupo de animais tratados com apenas uma dose de EBL, 24 horas antes do sacrifício dos animais (GT).

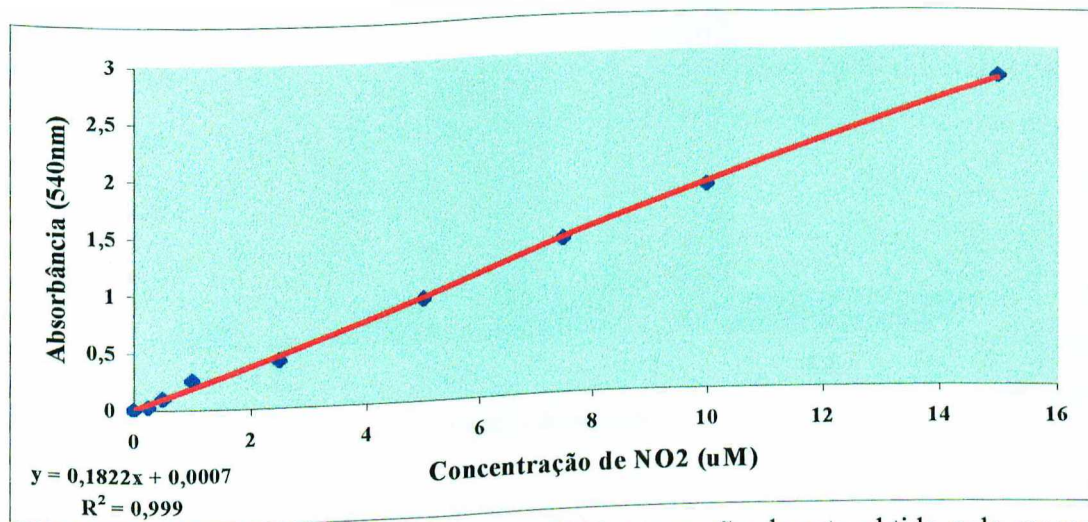


Figura 14 – Curva padrão de dosagem de NO₂ e equação da reta obtida pela regressão linear.

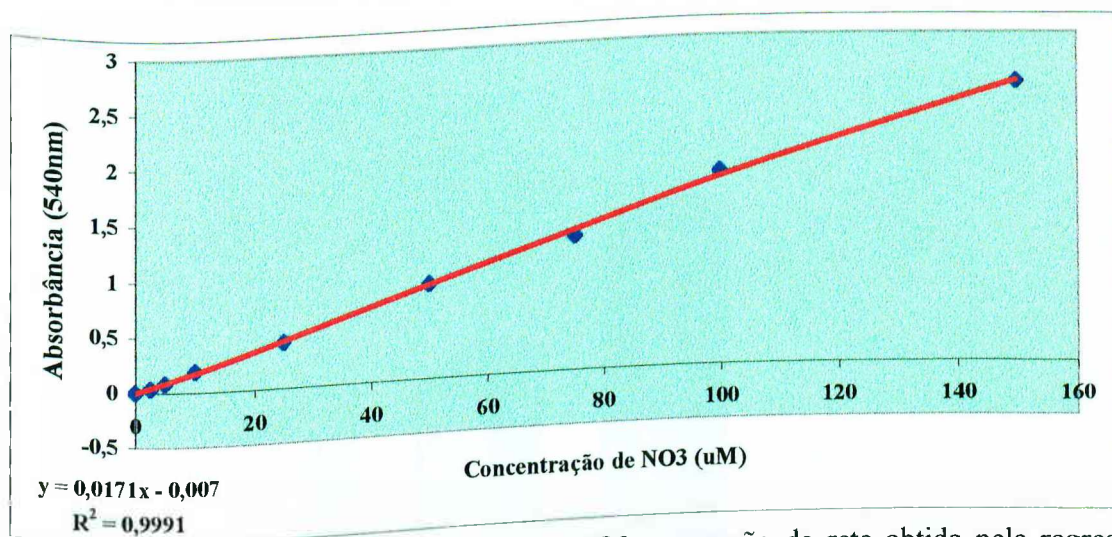


Figura 15 – Curva padrão de dosagem de NO₃ e equação da reta obtida pela regressão linear.

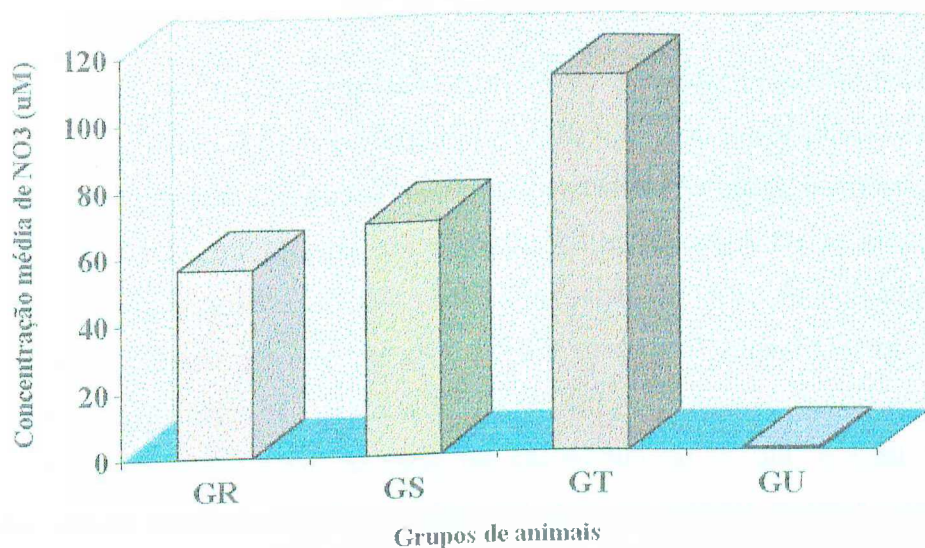


Figura 16 - Concentração média de Nitrato (NO_3) no soro de animais normais tratados com EBL 200mg/kg de peso, sendo que cada grupo experimental recebeu tratamento por períodos diferentes (GR- 7dias, GS- 3dias e GT- 1dia) e o grupo controle (GU-1 dia- água destilada).

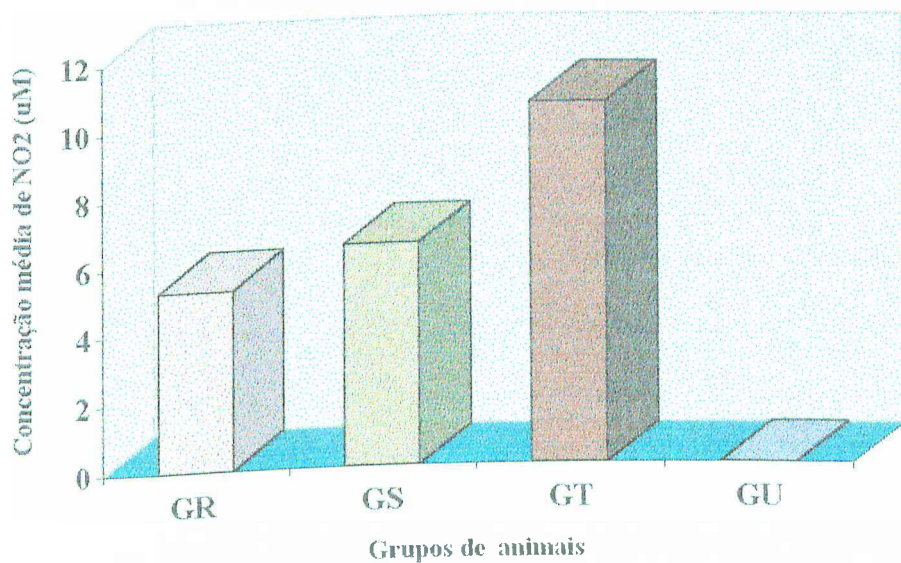


Figura 17 - Concentração média de Nitrito (NO_2) no soro de animais normais tratados com EBL 200mg/kg de animal por dia, sendo cada que grupo experimental recebeu tratamento por períodos diferentes (GR- 7dias, GS- 3dias e GT- 1dia) e o grupo controle (GU-1dia- água destilada).

4.7 - Dosagem de NO_3 no soro de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com EBL de *M. velutina*

O soro dos animais infectados com *T. cruzi* e tratados com EBL foi submetido à dosagem de NO_3 , cujos níveis foram comparados com os mesmos valores determinados para o soro de animais de grupos controles (infectados e normais), conforme descrito no item 3.14. Na Figura 18 estão apresentados tais resultados, onde se observa que nos grupos de animais infectados (GV e GW) a concentração sérica de NO_3 aumenta com o decorrer do período pós-infecção até a 12º dia, sendo este aumento maior para o grupo de animais infectados não tratados. Quanto ao grupo de animais normais tratados com EBL (GX), o maior nível de NO_3 foi encontrado no 6º dia, o qual se manteve praticamente constante nos demais dias. No grupo de animais normais sem tratamento (GY), não foi determinada a presença de NO_3 no período de estudo.

Na Figura 19 estão representadas as concentrações médias de NO_3 sérico dos grupos de animais infectados (GV e GW) e normais (GX e GY), evidenciando que a concentração é maior no grupo de animais infectados e não tratados (GW).

A parasitema dos animais de cada grupo infectados com *T. cruzi* estão expostas na Figura 20, sendo possível verificar que a parasitemia dos animais do grupo tratado com EBL (GV) foi inferior que a apresentada pelos animais do grupo sem tratamento (GW).

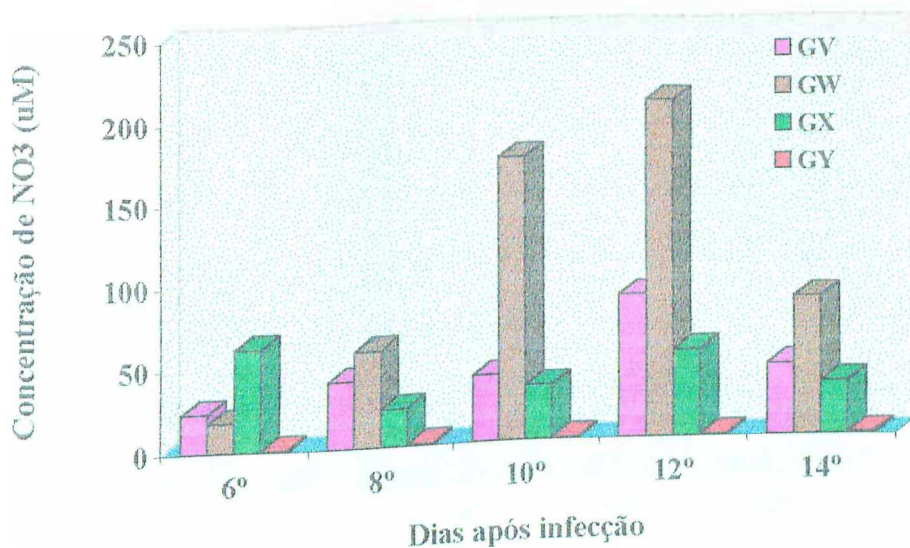


Figura 18 - Concentração de Nitrato (NO₃) no soro de animais infectados com *T. cruzi* (GV e GW) e normais (GX e GY), tratados com EBL numa dose de 200mg/kg de peso (GV e GX) e sem tratamento (GW e GY) do 6º a 14º dia após infecção.

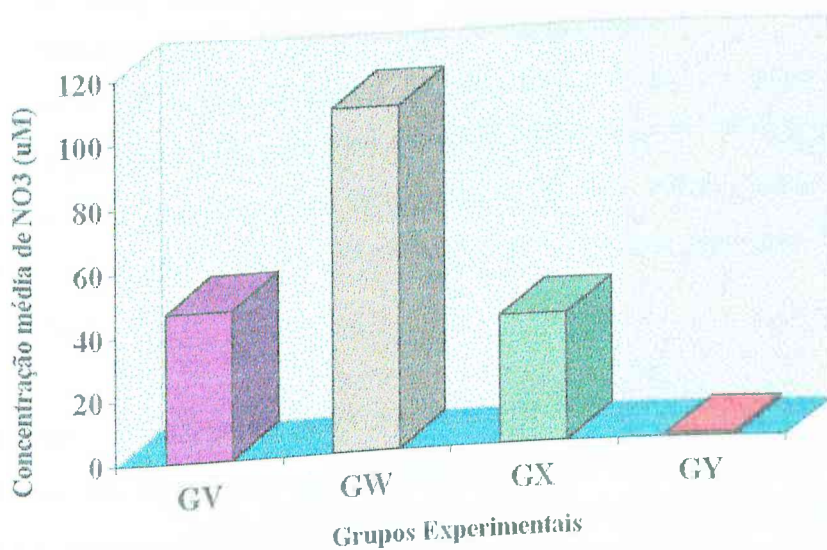


Figura 19 - Concentração média de Nitrato (NO₃) no soro de animais infectados com *T. cruzi* (GV e GW) e normais (GX e GY), tratados com EBL na dose de 200 mg/kg de peso (GV e GX) e sem tratamento (GW e GY).

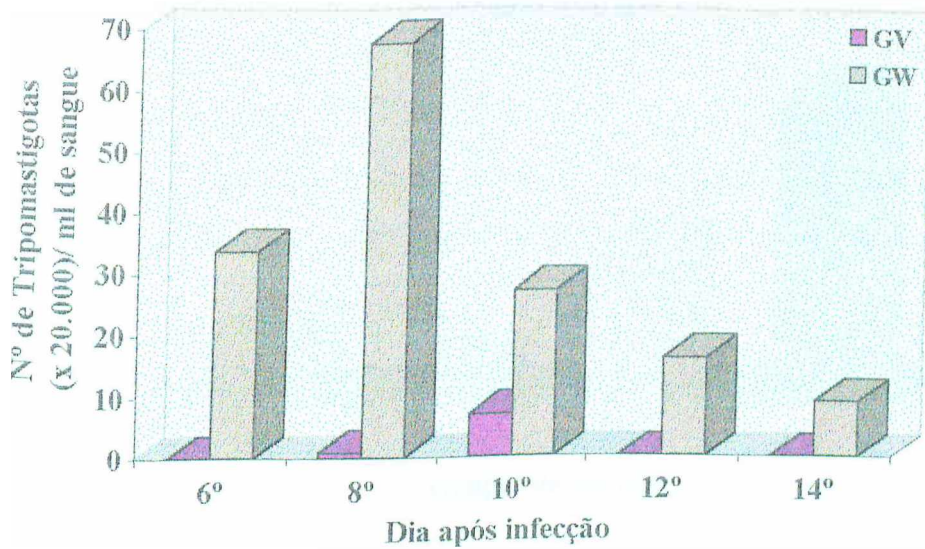


Figura 20 - Número de Tripomastigotas por animal, encontrados no sangue dos animais dos grupos infectados por *T. cruzi* (GV- tratados com EBL-200mg/kg e GW sem tratamento) do 6º ao 14º dia pós-infecção.

4.8- Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos do EBL de *M. velutina*.

Células extraídas da medula óssea de camundongos tratados com EBL em doses entre 100 a 800 mg/kg de animal por dia, foram analisadas quanto à presença de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), conforme descrito no item 3.15. Na tabela 06 estão apresentadas a frequência média e o desvio padrão de cada grupo estudado. Na Figura 21 estão apresentadas as porcentagens médias de EPCMN de cada grupo estudado.

Tabela 06 - Frequência (média \pm desvio padrão) de EPCMN, em porcentagem, observadas em animais dos grupos tratados com EBL (GI-100, GII-200 e GIII-800 mg/kg) e controles (GIV- 02ml de água destilada e GV-20mg/kg de ciclofosfamida).

Grupos	EPCMN / 2000 Eritrócitos					Total	EPCMN/100 eritrócitos
	A1	A2	A3	A4	A5	EPCMN	média \pm dp
GI	01	02	00	00	02	05	0,05 \pm 0,02
GII	00	01	01	00	00	02	0,02 \pm 0,05
GIII	01	00	03	05*	01	10	0,1 \pm 0,02
GIV	04	03	04	04	06	21	0,21 \pm 0,12
GV	22*	30*	32*	28*	23*	135	1,35 \pm 4,36

* Valores estatisticamente significativos comparados com o grupo GIV, de acordo com o teste para detecção de eventos raros (PEREIRA, 1991). Nível de significância $p < 0,05$.

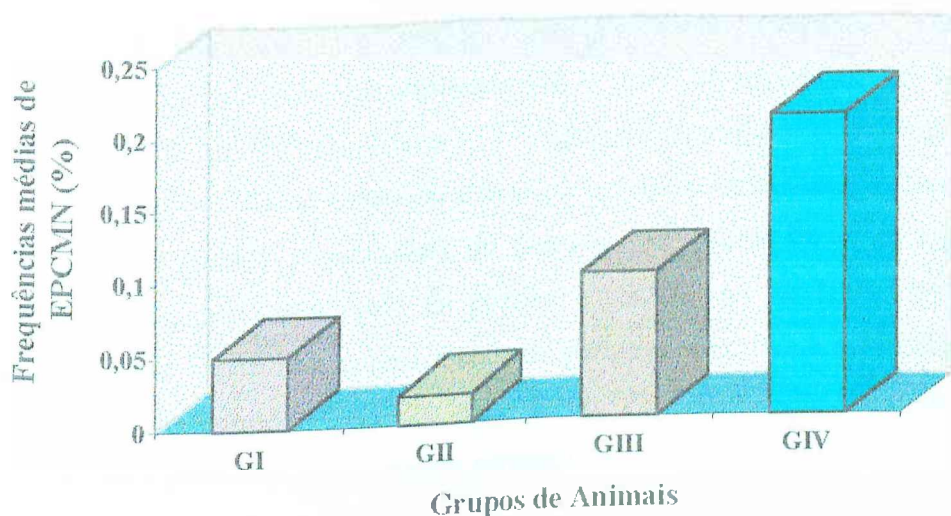


Figura 21 - Porcentagem média de eritrócitos policromáticos micronucleados de células da medula óssea de camundongos tratados com EBL (100, 200 e 800 mg/kg de animal) e sem tratamento (água).

4.9 - Triagem fitoquímica do extrato bruto (EB) de *M. velutina*

Para realização da triagem fitoquímica foi necessária a utilização de várias técnicas envolvendo reações colorimétricas ou propriedades específicas de diferentes classes químicas. Estas metodologias estão descritas no item 3.16. Na tabela 07 estão acumulados os resultados da triagem fitoquímica realizada no extrato bruto de *M. velutina*, tanto na fase aquosa quanto na etérea.

Tabela 07 - Triagem fitoquímica do extrato bruto de *Mandevilla velutina*

Classes Químicas	TRIAGEM FITOQUÍMICA	
	Extrato Bruto do Rizoma de <i>Mandevilla velutina</i>	
	Aquoso	Etéreo
Triterpenos e Esteróides	-	+
Carotenóides	-	-
Ácidos Graxos	+	+
Alcalóides	-	-
Agliconas Flavônicas	-	-
Emodóis	+	+
Cumarinas	-	-
Taninos Gálicos e Catéquicos	-	+
Saponinas	+	-
Compostos Redutores	+	+
Amido	+	+
Mucilagens	-	+

+ = presente, - = ausente

4.10 - Estudo dos efeitos tripanomicidas *in vitro* do EBL de *M. velutina*.

O estudo da atividade tripanomicida *in vitro* do extrato de *M. velutina* foi realizado conforme descrito no item 3.17. O sangue contaminado e incubado com EBL, 24 e 48 horas a 4°C, foi observado e avaliado ao microscópio óptico (aumento 400x) quanto a mobilidade e quantidade do parasito. Na Tabela 08 estão expressos os resultados da observação, onde foi possível constatar que os lotes incubados com extrato apresentaram um número menor de parasitos com baixa mobilidade, quando estes estavam presentes. As amostras T1 e T2 foram submetidas ao teste de microhematócrito e não apresentaram parasitos.

Tabela 08 - Efeito tripanomicida *in vitro* do extrato de *M. velutina* em sangue contaminado e incubado com EBL (T1-10, T2-20 e T-30 mg/ml e T4-somente *T. cruzi*), 24 e 48 horas à 4°C, observado e avaliado ao microscópio óptico (400x) quanto a mobilidade e quantidade do parasito.

Lotes	Mobilidade		Parasitemia (x20.000) por ml de sangue	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
T1	0	0	0	0
T2	+	0	2	0
T3	0	0	0	0
T4	++	++	32	18

Mobilidade: ++ = rápida (normal) e + = lenta 0 = ausência

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Uma estreita relação entre o homem e as plantas medicinais sempre existiu em todas as fases do desenvolvimento de várias civilizações. Provavelmente, a tendência de utilizar plantas para o tratamento de doenças é inata ao homem, como a outros animais. No Brasil, o uso de plantas medicinais é bastante comum, pois aos conhecimentos adquiridos antes do descobrimento foram acumulados os costumes introduzidos pelos imigrantes de diversas partes do mundo. Na medicina popular do Triângulo Mineiro, mais precisamente na região de Uberlândia, existem relatos de que o extrato bruto de *Mandevilla velutina* é utilizado no tratamento das complicações cardiovasculares, decorrentes da fase crônica determinada da doença de Chagas.

A doença de Chagas constitui um problema médico-social grave em diversos países da América Latina. No Brasil, esta endemia atinge cerca de 8 milhões de habitantes, principalmente populações pobres. O impacto socioeconômico causado por esta moléstia é alto, pois considerando-se que 10% dos indivíduos evoluam para cardiopatia grave ou comprometimento digestivo, o custo do tratamento desses casos atingiria US\$ 250 milhões. O absenteísmo de 75 mil trabalhadores chagásicos brasileiros com cardiopatia grave representaria uma perda de aproximadamente US\$ 6 milhões por ano (WANDERLEY, 1994).

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 contamos com poucos recursos terapêuticos disponíveis no mercado (AMATO-NETO, 1998)

Diante da importância médica, socioeconômica da doença de Chagas e a necessidade de novos medicamentos que possam ser empregados na terapêutica, este trabalho objetivou o estudo dos possíveis efeitos do extrato bruto de *M. velutina* na fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos.

Levando em consideração os relatos da medicina popular, o extrato do rizoma de *M. velutina* pode ser obtido por vários métodos, incluindo a infusão em água (“chá”), maceração em vinho suave (“garrafada”) e maceração em água, outra forma menos freqüente é o consumo *in natura* do rizoma. Devido a essa diversidade de métodos para preparação do extrato, neste trabalho fez-se necessário padronizar os procedimentos de extração, optando-se pela maceração do rizoma triturado em álcool de cereais a 15%.

Para suprimir os efeitos deletérios do álcool no organismo dos animais, o extrato hidroalcoólico foi liofilizado. Em média, 100 ml de extrato resultou em 430mg de material seco, o qual foi ressuspensionado em água destilada nas concentrações desejadas.

Após ter estabelecido o método de preparo do extrato bruto de *M. velutina*, procedeu-se à escolha do modelo experimental. Muitos animais são utilizados como modelo para o estudo da doença de Chagas, incluindo os primatas, cães, coelhos, ratos e camundongos. Destes, os camundongos se destacam pela disponibilidade, baixo custo operacional, fácil manipulação, possibilidade do uso de animais isogênicos, representando um bom modelo para o estudo de aspectos patológicos, imunológicos, teste de agentes terapêuticos e profiláticos da doença de Chagas (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985). Além destes fatores, apresentam também maior nitidez no desenvolvimento das fases características da doença. Na fase aguda, sua parasitemia descreve uma típica curva, semelhante à que ocorre na espécie humana (SHERLOCK, 1984), e na fase crônica, as lesões cardiovasculares são intensas e também similares às que ocorrem no homem, quando desenvolve a cardiopatia grave (SCHLEMPER, 1983).

Diferentes cepas de *T. cruzi* podem ser mantidas em laboratório e empregadas na produção experimental da doença de Chagas em camundongos. Estas são classificadas em três tipos de acordo com as características morfológicas e patogênicas: Tipo I, inclui as cepas de rápida multiplicação (ex: cepa Y), com picos parasitêmicos entre 7º e 12º dia de infecção; tipo II, cepas de multiplicação relativamente lenta com picos parasitêmicos entre o 12º e 20º dia de infecção (ex. São Filipe); tipo III cepas de multiplicação lenta (ex. cepa Colombiana), com picos parasitêmicos entre o 20º e 30º dia de infecção. No presente trabalho, utilizou-se a cepa Y devido ao seu desempenho e respostas em ensaios biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (ANDRADE, 1974, 1985).

A via de administração (oral) utilizada neste trabalho também foi baseada nos relatos populares. Inicialmente o EBL foi misturado na água filtrada fornecida aos animais, mas observou-se que os animais infectados reduzem gradualmente o consumo de água, com a evolução da doença. Para assegurar que os animais recebessem a mesma dose do EBL, optou-se pela sonda orogástrica.

Levando em consideração que uma grande parte dos vegetais produz metabólitos que podem ser tóxicos para animais, foi necessária a investigação da toxicidade do EBL de *M. velutina*. Os resultados obtidos sugerem que a administração de EBL até a dose de 5g/kg de animal é atóxico ou apresenta baixa toxicidade sobre os camundongos, pois

não ocorreram mortes ou efeitos colaterais aparentes tais como: sonolência, irritabilidade, diarreia e regurgitação no período de observação que foi de 48 horas após a administração. De acordo com o CEME, quando a dose letal mediana é maior que 5g/kg de peso a determinação não deve ser realizada, por não apresentar parâmetro fidedigno.

Uma vez constatada a baixa toxicidade aguda do extrato, avaliou-se o efeito da administração de doses crescentes do EBL, até a dose de 200 mg/kg de animal por dia, sobre a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi*. Os resultados demonstraram que quanto maior a dose administrada menor a parasitemia e maior a sobrevivência, quando se compara com o grupo de animais infectados e não tratados (Figuras 01 e 02). Os animais tratados com a dose de 200 mg/kg apresentaram uma diminuição mais acentuada da parasitemia (90%) e maior sobrevivência (100%), quando comparados aos tratados com doses menores (Figura 03) Cabe também citar que em 30% dos animais do grupo tratado com EBL na dose de 200 mg/kg não foi detectada a presença de parasitos pela técnica de Brener (1972) (Tabela 01).

Após determinar a eficácia do EBL na dose de 200 mg/kg, estudou-se a influência do tratamento prévio de camundongos com EBL, administrado na dose de 200 mg/kg em diferentes períodos de tempo antes da infecção com *T. cruzi*. Os resultados deste experimento demonstraram que o pré-tratamento é eficaz (Figuras 04, 05 e 06), sendo melhor quando realizado um dia antes da infecção, onde foi observada uma redução mais acentuada da parasitemia (78%) e uma maior sobrevivência (60%). Embora em menor grau, a eficácia apresentada no pré-tratamento realizado no 3º e 7º dia antes da infecção sugerem que o EBL de *M. velutina* apresenta uma ação prolongada no organismo deste animal.

Os medicamentos já utilizados no tratamento etiológico de pacientes infectados com *T. cruzi* como o Benzonidazol, por apresentarem uma alta velocidade de depuração no organismo animal são indicados em duas doses diárias (SILVA, 1994). Quando os animais foram tratados com duas doses diárias de EBL (71,5 e 143 mg/kg), a redução média das parasitemias foi de 77% e 90% (Tabela 03, Figuras 07 e 08) e a sobrevivência foi de 40% e 80%, respectivamente. Neste experimento, também foram testados os efeitos da administração de Benzonidazol, cuja dosagem (duas doses diárias de 50 mg/kg) foi baseada nos procedimentos descritos por Ukumura e col (1990), onde foram encontrados uma redução média da parasitemia de 52% e sobrevivência de 20% dos animais no período de observação. Comparando os resultados obtidos com os

grupos de animais tratados com EBL e com Benzonidazol, o EBL nas doses administradas se mostrou mais eficaz para diminuir a parasitemia e promover maior sobrevivência dos animais (Figura 08 e 09). Cabe lembrar que, ao contrário do Benzonidazol, o nosso material de estudo é um extrato bruto de uma estrutura vegetal com função de reserva, onde a presença de inúmeros componentes é esperada.

Nos experimentos realizados anteriormente, a redução média da parasitemia e o aumento da taxa de sobrevivência nos grupos de animais infectados e tratados com EBL em duas doses diárias de 143 mg/kg (Figuras 07 e 08) e em dose única diária de 200 mg/kg (Figuras 02 e 03) são bastante similares e permitem concluir que a ação máxima da dose de EBL administrado se prolonga por pelo menos 24 horas. Por conseguinte, nos experimentos posteriores foi estabelecido o tratamento em uma única dose a cada 24 horas.

A partir dos resultados das parasitemias determinadas nos experimentos anteriores, verificou-se uma variação no número de parasitos nos animais de um mesmo grupo. Esta variação foi mantida mesmo quando se utilizou um número maior de animais (n=10). No entanto, as diferenças entre as parasitemias dentro do grupo não foram significativas (Teste ANOVA), tornando possível a utilização de um número menor de animais (n=5). Esta redução está, também, de acordo com os princípios éticos internacionais para investigações que envolvam o uso de animais de laboratório, que recomenda a redução do número de animais, a um mínimo requerido para obtenção de resultados científicos válidos.

Inúmeros são os fatores que podem influenciar no desenvolvimento da infecção com *T. cruzi*, como o estado imunológico do organismo infectado e a interação parasito-hospedeiro. O extrato de *M. velutina* poderia estar atuando de diversas maneiras no hospedeiro, assim como poderia estar agindo diretamente sobre o parasito.

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*.

Gazzinelli e col. (1992) demonstraram que o NO, produzido por macrófagos ativados, está envolvido na eliminação intracelular do *T. cruzi*. Em adição, Thomson e col (1998) sugeriram que o NO poderia estar atuando indiretamente no *T. cruzi*, pois o mesmo ao ser convertido em peróxido de nitrito inibiria o mecanismo de transporte de cálcio na mitocôndria e no retículo endoplasmático do parasito, atuando também na homeostase de ATP.

No intuito de verificar o possível envolvimento do Sistema Óxido Nítrico no mecanismo de ação do extrato de *M. velutina*, no presente trabalho, estudou-se a influência de inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS) sobre os efeitos do EBL, pela administração de EBL e de inibidor de NOS em camundongos infectados com *T. cruzi*. A dosagem de inibidores (50 mg/kg de animal por dia) e o período de administração (15 dias) foram baseados nos procedimentos descritos por Vespa e col (1994).

Os resultados da associação de EBL com inibidor (NOARG ou L-NAME) demonstraram que os inibidores diminuem consideravelmente a ação do EBL sobre a parasitemia (Figuras 10 e 12). A sobrevivência de animais infectados foram monitoradas até 50º dia pós-infecção, onde foi constatada que a mortalidade foi mais acentuada para os grupos tratados com inibidor (GL e GP). Em contraste, a sobrevivência dos animais dos grupos tratados com EBL e inibidor (NOARG ou L-NAME) foi de 20% e o tratado com EBL foi de 80% (Figuras 11 e 13).

Ainda com relação aos experimentos realizados com inibidores de NOS, cabe citar que as evidências iniciais da atenuação dos efeitos do EBL de *M. velutina* foram obtidas com a utilização de N-monometil-L-arginina (L-NMMA), generosamente doado pelo Dr. Elmiro Santos Resende do Departamento de Clínica Médica desta Universidade. Neste experimento, animais infectados tratados com EBL (200 mg/kg por dia) e submetidos à administração intraperitoneal de uma suspensão de L-NMMA (50 mg/kg) apresentaram, em média, parasitemia 40% superior à dos animais tratados com EBL e sem inibidor (resultados não apresentados em virtude das dificuldades encontradas na solubilização deste inibidor em meio aquoso).

Uma vez comprovado o envolvimento do Sistema Óxido Nítrico, realizou-se a determinação indireta do NO, por meio de dosagens de NO₂ e NO₃ no soro de animais normais tratados com EBL numa única dose diária de 200 mg/kg por diferentes períodos de tempo. Na Figura 16 foram apresentadas as concentrações médias de NO₃ sérico, cujos resultados demonstram que o tratamento por 1 dia resultou numa maior concentração de NO₃, comparado aos outros grupos tratados por 3 e 7 dias. Estes últimos não apresentaram diferença significativa entre si. Os resultados da dosagem de NO₂ foram proporcionais aos do NO₃ (Figura 17), sendo que em cada animal, a concentração sérica de NO₂ foi cerca de 10 vezes inferior a de NO₃.

Considerando os resultados obtidos nos experimentos anteriores, para a dosagem indireta de NO no soro de animais infectados com *T. cruzi*, optou-se por fazer o tratamento com EBL por um período máximo de 14 dias e realizar somente a dosagem

do NO_3 , no período compreendido entre o 6º e 14º dia pós-infecção. Nestas condições, animais sacrificados entre o 8º e 12º dia apresentaram níveis séricos de NO_3 superiores aos demais animais do mesmo grupo (Figura 18). No entanto, estes valores foram inferiores aos encontrados no soro de indivíduos correspondentes que pertenceram ao grupo de animais infectados sem tratamento (GW). Ainda no grupo de animais infectados tratados com EBL (GY), este aumento foi menos acentuado durante o período analisado (Figura 19). Tais resultados indicam que a elevação dos níveis de NO_3 estaria correlacionada com a presença de parasitos no sangue, o que foi confirmado com os resultados da determinação da parasitemia destes mesmos animais (Figura 20), ou seja a elevação dos níveis séricos de NO foi precedida pelo aumento da parasitemia. Os resultados referentes ao grupo de animais infectados com *T. cruzi* e sem tratamento (GW), estão de acordo com dados obtidos por Vespa e col (1994) pela utilização de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

Com respeito aos valores da parasitemia apresentados na Figura 20, os mesmos se distinguiram consideravelmente dos resultados obtidos em experimentos anteriores (Tabelas 01 e 02). Cabe lembrar que neste experimento, ao contrário dos demais experimentos realizados no presente trabalho, cada valor numérico obtido nos ensaios quantitativos é derivado de um único animal por grupo, portanto, as variações individuais entre os animais ou mesmo no lote dos animais utilizado poderiam ter influenciado nos resultados. Uma outra possível explicação seria o período de tempo entre a coleta do sangue por punção cardíaca e a determinação da parasitemia.

Apesar das possíveis críticas, o experimento não foi repetido com um maior número de amostragens, em vista das restrições impostas em nosso laboratório no que diz respeito a manutenção e manipulação de materiais contaminados em equipamentos de uso comum como geladeira, centrífuga e espectrofotômetro. Ao lado do exposto, considerou-se que os resultados foram satisfatórios e conclusivos, uma vez que, conforme já mencionado, parte dos resultados obtidos estão em concordância com informações disponíveis na literatura.

Um outro aspecto abordado neste trabalho foi o estudo *in vitro* da ação tripanomicida da *M. velutina*, incubando-se o sangue contendo *T. cruzi* na presença do EBL. Conforme apresentado na Tabela 08, a contagem dos parasitos nas amostras de sangue, bem como a mobilidade dos parasitos, quando observadas, foram inferiores em relação a amostras incubadas na ausência do EBL. Tais resultados sugerem que, *in vivo*, o extrato estaria atuando a nível de células sanguíneas, confirmando o possível

envolvimento de macrófagos. No entanto, considerando-se que o EBL é uma mistura de vários componentes presentes no rizoma, permanece ainda a possibilidade da existência de princípios ativos que atuariam diretamente sobre o *T. cruzi*.

Em suma, os resultados apresentados e discutidos até o momento sugerem fortemente que a redução de tripomastigotas na corrente sanguínea de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com EBL de *M. velutina*, é resultante da atividade de Óxido Nítrico Sintase induzível (NOSi) presente nos macrófagos. Esta hipótese poderia ser melhor investigada por meio da utilização de inibidores específicos da NOSi, como o L-imino-etil-L-ornitina (L-NIO) (VESPA *et al.*, 1994), que apesar dos esforços, infelizmente, ainda não está disponível no nosso laboratório.

No que diz respeito a mecanismos de ação de drogas já testadas no tratamento específico da doença de Chagas, o Nifurtimox apresenta uma ação tripanomicida centrada na produção de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxílicos (OH \cdot) e lipoperóxidos. Esses, por sua vez, interagem com outras biomoléculas tais como lípidos, aminoácidos e ácidos nucleicos, os quais constituem estruturas celulares como a membrana plasmática, proteínas e material genético. Sendo o *T. cruzi* deficiente em mecanismos de desintoxicação, ou seja, apresenta menor concentração ou ausência de enzimas como Glutathione Peroxidase (bem como da Glutathione no estado reduzido), Catalase e Superóxido Dismutase, ele se torna mais susceptível aos radicais livres (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 1996). Apesar do conhecimento dessas informações, o Nifurtimox não foi utilizado nos estudos comparativos realizados no presente trabalho, pelas dificuldades encontradas na aquisição deste medicamento. O Benzonidazol envolve um efeito direto sobre síntese de macromoléculas e uma ação inibitória direta sobre o DNA topoisomerase do *T. cruzi*. (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 1996).

Considerando que o NO pode atuar no núcleo, alterando a estrutura das bases nitrogenadas por meio da nitrosilação de desoxiribonucleotídeos e consequente deaminação das bases nitrogenadas, causando danos na molécula de DNA (KRÖNCKE *et al.*, 1997), investigou-se a possível genotoxicidade do EBL administrado em animais normais. Para tanto, foi analisada a formação de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea. Os resultados demonstraram que os animais dos grupos tratados com EBL não apresentaram efeitos genotóxicos, sendo que os valores determinados para estes animais foram menores que os encontrados no grupo sem tratamento (Tabela 06 e Figura 21). O hemograma desses animais foi realizado no Laboratório Central do Hospital das

Clínicas da Fundação de Assistência, Estudo e Pesquisa de Uberlândia da UFU, onde não foram observadas alterações na contagem global das células sanguíneas.

No intuito de se conhecer as principais classes químicas constituintes do EB de *M. velutina*, foi realizada a triagem fitoquímica do extrato bruto de *M. velutina*. Dentro das principais classes químicas encontradas, destacou-se a presença de taninos e terpenóides (Tabela 07), os quais possivelmente possuem efeitos antiparasitários (ROBBERS *et al*, 1997).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o extrato bruto de *Mandevilla velutina* possui componente(s) capaz(es) de atuar sobre a parasitemia de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, reduzindo significativamente o número de parasitos durante a infecção, sendo que esta redução pode estar correlacionada com o Sistema Óxido Nítrico.

Por fim, as inúmeras informações derivadas do presente trabalho poderiam ser reforçadas ou acrescidas com a realização de outros experimentos, sobretudo pela utilização de recursos não disponíveis no momento, como o inibidor específico de NOSi, Nifurtimox, animais isogênicos, diferentes cepas de *T. cruzi* e materiais para fracionamento do EBL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, H.O., TEIXEIRA, V.P.A., GOBBI, H., ARAÚJO, W.F. Alterações quantitativas do sistema nervoso autônomo intracárdico em chagásicos crônicos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 41, p. 171-174, 1983.
- AMATO-NETO, V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 1, p. 63-64, 1998.
- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65, 1974.
- ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18 (supl), p. 39, 1985.
- APPEZZATO, B. **Desenvolvimento anatômico e propagação vegetativa de *Mandevilla velutina* vari. gabra (Muell-Arg) WOODSON-APOCINACEAE**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1988, 100 p. (Dissertação, Mestrado).
- BARRETO, A.C.P., SERRO AZUL, L.G., MADY, C., IANNE, B.M., VIANNA, C. B., BELLOTI, G., PILEGGI, F. Forma indeterminada de doença de Chagas: uma doença polimorfa. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 55, p. 347-353, 1990.
- BELDA NETO, F.M., BUAINAIN, A., OLIVEIRA, L.C., SOUZA, D. M. Estudo da atividade de extratos vegetais sobre formas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (supl. I), p. 176, Nov, 1988.
- BÉRENGER, A.R., OLIVEIRA, A.A., SOARES, R.O.A., FERNANDEZ-FERREIRA, E., GIBALDI, D., RIBEIRO DOS SANTOS, R., FIGUEREDO, M., KAPLAN, M.A.C. Atividade tripanosomicida de *Rheedia longifolia* Planchon e Triana. **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, p. 58, 14-17 de Out, 1998.
- BRENER, Z. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 460, 1979.
- BUAINAIN, A., POZETTI, G.L., BELDA, F.M. Estudos da atividade de extratos vegetais sobre o desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* cultivado em meio de Warren. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (supl. I), Nov, p. 176, 1988.
- CALIXTO, J.B., NICOLAU, M., YUNES, R.A. The selective antagonism of bradykinin action on rat isolated uterus by crude *Mandevilla velutina* extract. **British Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 729-731, 1985.

- CALIXTO, J.B., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. The competitive antagonistic effect of compounds from *Mandevilla velutina* on kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 1133-1142, 1988.
- CALIXTO, J.B., ZANINI, J.C., CRUZ Jr., A.B., YUNES, R.A. Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit Arachidonic Acid-induced ear oedema in mice, but not rat stomach contraction. **Prostaglandins**, v. 41, n. 5, p. 515-526, May, 1991.
- CANÇADO, J.R., CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p. 23-8, 1985.
- CHEIDER, L.M., PAIVA, S.R., SOARES, R.O.A., FERNANDEZ-FERREIRA, E., GIBALDI, D., RIBEIRO DOS SANTOS, R., FIGUEREDO, M., KAPLAN, M.A.C. Avaliação da atividade tripanosomicida de *Clusia criuva* Cambess. **XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Águas de Lindóia, p. 58, 14-17 de Out, 1998.
- CHIARI, E., OLIVEIRA, A.B., RASLAN, D.S. Natural flavonoids - A novel series of chemical compounds actives against blood forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (supl. I), Nov, p. 176, 1988.
- COVER, B., GUTTERIDGE, W. E. A primary for drugs to prevent transmission of Chagas's disease during blood transfusion. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 76, p. 50-57, 1982.
- CRUZ, F.S., LOPES, J.N.C., GONÇALVES, D.C.R.G. Inibitory activity of plant extract *Vanillomopsis erytropappa* against *Trypanosoma cruzi*, both in vitro and infected blood. **XII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas**, p. 136, Caxambú, 5 a 7 de Nov, 1985
- CUNHA, L.C. **Quimioprofilaxiz da doença de Chagas experimental; Avaliação da atividade de *Zanthoxylum minutiflorum***. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 1993, 132 p.(Dissertação de Mestrado).
- CUNHA-NETO, E., KALIL, J. Autoimunidade na Doença de Chagas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 4, n. 2, p. 92-100, Mar./Abr. 1994.
- DIAS, J. P. C. Doença de Chagas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.56, p. 58-82, 1989.
- DUTRA, W.O., COLLEY, D.G., CANÇADO, H.R., GASEENELLI, G., PARRA, J.C. Molecular characterization of mononuclear cells in the peripheral blood of patients with Chagas's disease. **Segundo Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular**, Campos do Jordão, p.102-122, Maio, 1992

- FRAGATA-FILHO, A.A., SILVA, M.A.D., BOAINAIN, E. Tratamento etiológico da doenças de Chagas nas fases aguda e crônica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 192-197, Mar/Abr, 1994.
- GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., HIENRY, S., JAMES, S.L., SHER, A. The microbicidal actividof interferon- γ -treated magrophages against *Trypanosoma cruzi* involves and L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **European Journal of Immunology**, v.22, p. 2501-2506, 1992.
- GEISSMAN, T.A., CROUT, D.H.G. General aspects of alkaloid biosynthesis, alkaloid derived from ornithine, lysine and nicotinic acid, in **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**, 1 ed Freeman. Cooper & Company, USA, p. 428-463, 1969.
- GONZALES, J., PEREIRA, J., ESTRADA, M., LOYOLA, A., MORAES, G., ARAYA, J., SAGUA, H. *In vitro* action of vegetable natural products on *Trypanosoma cruzi*. **XII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas.**, p. 136, Caxambú, 5 a 7 de nov, 1985.
- GRANGER, L.D., TAINTOR, R.R., BOOCKVAR, K.S., HIBBS, J.B.J. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using Nitrate Reductase in Griess reaction. **Methods in Enzymology**, v. 268, p.142-188,1996.
- HARRISON, D.G. Normal and pathophysiology considerations of endotelial regulation of vascular tone and their relevance to nitrate therapy. **American Journal of Cardiology**, v. 70, n. 24, p. 11B-17B, 1992.
- HENRY, Y. Nitric oxide, a biological effector. **European Biofiscal Journal**, v. 20, p. 01-15, 1991.
- HIGUCHI, M.L. Doença de Chagas. Importância do parasita na patogenia da forma crônica cardíaca. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 64, n.3, p. 251-254, 1995.
- HÖLSCHER, C., KÖHLER, G., MÜLLER, U., MOSSMANN, H., SCHAUB, G. A., BROMBACHER, F. Delective Nitric Oxide effector lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide syntase. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1208-1215, 1998.
- JÁCOME, R.L.R.P., RASLAN, D.S., DOLABELA, M., LOPES, M.T.P., CHIARI, E., OLIVEIRA, A.B. Atividade citotóxica, tripanosomicidade e antitumoral dos extratos de cascas de *Apisdosperma parviflorum* A. **XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Águas de Lindóia, p. 56, 14-17 de Out, 1998.
- KELM, M. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF realease fron cultured endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 54, p. 237-44, 1992.

- KNOWLES, R.G., MONCADA, S. Nitric Oxide in mammals. **Journal of Biochemistry**, v. 298, p. 249-258, 1994.
- KRÖNCKE, K.D, FEHSEL, K., KOLD-BACHOFEN, V. Nitric oxid: Cytotoxicity versus Cytoprotection- How, Why, When and Where?. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.1, n. 2, p. 107-120, 1997.
- LAFUENTE, C. Uso de tubos de microematócitos para diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas e Malária. **Animales de la Belge de Médecine Tropicale**, v. 65, p. 95-99, 1985.
- LANNI, B.M., MADY, C. Terapêutica da fase crônica da doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico?. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n.1, p. 59-61, 1998.
- LIU, R.H., HOTCHKISS, J.H. Potential genotoxicity and chronically elevated nitric oxide: A review. **Mutation Research**, v. 339, n. 2, p.73-89, Jun, 1995.
- MARZINZIG, M., NUSSLER, A.K., STADLER, J., MARZINZIG, E., BARTHLEN, W., NUSSLER, N.C., BEGER, H.G., MORRIS, S.M., BRÜCKENR, U.B. Analytical Methods: Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: Nitrite, Nitrate and S-Nitrosothiols. **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, p.177-189, 1997.
- MILEI, J., STORINO, R.A., BEIJELMAN, R., GRANA, D., BASOMBRI, M.A. Morphometry of skeletal muscle involvement in mice infected or preimmunized with live attenuated *Trypanosoma cruzi*. **Jornal de Medicina de Buenos Aires**, v. 51, p. 529-532, 1991.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de Plantas Mediciniais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v.12, p. 03-09, 1994.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas & Plantas Mediciniais**. 8 ed, São Paulo: Editora Hemus, p. 09-16, 1997.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M.A., FERNANDEZ, M.A., FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor α and interferon γ on macrophage activation against intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **European Journal of Immunology**, v.22, p.301-307, 1992.
- NATHAN, C., XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13725-12728, 1994.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, p. 73-105, 1995.
- NEVES, P.C.A., NEVES, M.C.A., CRUZ, A.B., SANT'ANA, A.E.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A2 and phospholipase C. **European Journal of Pharmacology**, v. 243, p. 213-219, 1993.

- OMS. **Control de la enfermedad de Chagas: informe de un Comité de Expertos de la OMS** (Serie de informes técnicos de la OMS; 811) Ginebra, 1-102, 1991.
- PEDROSA, R.C., CANÇADO, J.R., DECACHE, W. Estudos longitudinais do eletrocardiograma na Doença de Chagas desde a fase aguda. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 163-173, Jul./Set. 1993.
- PEREIRA, C.A.B. Teste estatístico para proporções em problemas de citogenética. IN: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.R., MONTELEONE-NETO, R., (eds.), **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética, p.113-121, 1991.
- PETRAY, P., ROTTENBERG, M.E., CRINSTEIN, S., ANDERSÖRN. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 193-199, 1994.
- PIMENTA, D., FERNANDEZ-FERREIRA, E., SOARES, R.O.A., GIBALDI, D., RIBEIRO DOS SANTOS, R., FIGUEREDO, M., KAPLAN, M.A.C. Avaliação da atividade tripanosomicida *in vitro* de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. (Chapéu de couro). **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, p. 58, 14-17 de Out, 1998.
- PINTO, F. H., RIBEIRO, R. D., NETO, F. M. B., PRADO Jr, J. C. Estudos comparativos da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitonal, utilizando-se duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, p. 133-40, 1986.
- REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 150-1, 1992.
- RIBEIRO, A.L.P., ROCHA, M.O.M.C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 301-314, 1998.
- RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T.C.B., FERNANDEZ-FERREIRA, E., SOARES, R.O.A., GIBALDI, D., RIBEIRO DOS SANTOS, R. Avaliação da atividade tripanosomicida *in vitro* de *Physalis angulata*. **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, p. 56, 14-17 de Out, 1998.
- ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. **Farmacognosia & Farmacobiocologia**, 1 ed. São Paulo: Editora Premier, p.1-347, 1997.
- ROCHA, M.E., FERNANDEZ-FERREIRA, E., RIBEIRO, I.M., SOARES, R.O.A., GIBALDI, D., RIBEIRO DOS SANTOS, R., FIGUEREDO, M., KAPLAN, M.A.C. Atividade tripanosomicida de *Norantëa brasilienses Choisy*. **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, p.57, 14 a 17 de Out, 1998.

- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia*, 4 ed., São Paulo: Manole, p. 18.1-18.19, 1997.
- SCHLEMPER Jr, B.R., ÁVILA, C.M., COURA, J.R., BRENER, Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Santa Catarina, v. 16, p. 23-30, Jan./Mar. 1983.
- SHERLOCK, I. A. Parasitemia constante durante 24 horas consecutivas na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Salvador, v. 17, p. 137-144, Jul./Set. 1984.
- SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v.31, p. 9-15, 1975.
- SILVA, J.S, VESPA, G.N.R., CARDOSO, M.A.G., ALIBERTI, J.C.S., CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infection and Immunity*, v. 63, p.4862-4867,1995.
- SILVA, P. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1203, 1994.
- SIQUEIRA-BATISTA, R., MIRANDA-FILHO, N., QUINTAS, L.E.M., CORRÊIA, A. D. Digitálicos. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 49, p. 246-248, 1992.
- SIQUEIRA-BATISTA, R., CORRÊA, A.D., HUGGINS, D.W. *Moléstia de Chagas*. 1 ed, Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, p.1-180, 1996.
- SNYDER, S.H., BREDTE, D.S. Biological roles of Nitric Oxide. *Scientific American*, v. 36, p. 28-35, May, 1992.
- STORINO, R.A., MILEI, J. *Miocardíopatia chagásica crônica*. Buenos Aires: Editorial Club de Studio, p. 250, 1986.
- THOMSON, L., GADELHA, F., PELUFFO, G., VERCESI, A., RADI, R. Disruption of calcium and ATP homeostasis induced by peroxynitrite in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, A 10, Caxambú, 16 a 20 de Mai, 1998.
- UKUMURA, M., AMATO-NETO, V., MITSURU, K., TAKAMATSU, N.K., ISHIKAWA, P.S., LIZUZA, F.H., IRIYA, K. Atividade terapêutica do Benzonidazol em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e imunodeprimidos por associação de Ciclosporina com Prednisona. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, p. 260-261, v. 45, n. 6, 1990

- URBINA, J.A., PAYARES, G., MOLINA, J., SANOJA, C., LIENDO, A., LAZARD, K., PIRAS, M.M., PIRAS, R., PEREZ, N., WINCKER, P., RYLEY, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas's disease using D0870. *Science*, v. 273, p. 969-970, 1996.
- 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. 36, p. 5177-5182, 1994.
- WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas**, 1 ed., Germany, p. 320, 1984.
- WANDERLEY, D.M.V. Epidemiologia da Doença de Chagas. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 4, n.2, p. 77-84, 1994.
- WAZLAWIK, E., DA SILVA, M.A., PERTES, R.R., CORREIA, J.F., CALIXTO, J.B., RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacology*, v. 49, n. 4, p. 433-437, 1997.
- WILLIAMSON, E.M., OKPAKO, D.T., EVANS, F.J. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material**, 1 ed., v.1, British: Library British, p. 221, 1996.
- WIRTH, J.J., KIERSZENBAUM, F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanozoma cruzi* in presence of bacterial endotoxin. *Journal of Immunology*, v. 141, p.286-288, 1988.

TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF THE CRUDE EXTRACT OF *Mandevilla velutina* ON *Trypanosoma cruzi*-INFECTED MICE

Chagas' disease is one of the most important parasitic infections in the most part (countries) several areas of Latin America, including Brazil, due to its high incidence and prevalence as well as the socioeconomic repercussion that this endemic disease causes to the countries. Despite the efforts, a very reduced number of trypanocidal drugs has been indicated for the specific treatment of the disease, all of them with side effects that restrict the use. In the area of side effects limitation Uberlandia, there are popular reports about the use of extract of the rhizome of *Mandevilla velutina* to chagasic patients. This study was developed to investigate the activity of this extract on parasitemia and mortality of mice infected with 5×10^4 blood-derived trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain). The extract was obtained by triturated fragments of the rhizome in 15% cereal alcohol, which was subsequently lyophilized (EBL) and further suspended in distilled water. The EBL when orally administered to mice showed to have a low toxicity to the animals. Increasing doses of EBL (up to 200 mg/kg) administered to *T. cruzi*-infected mice showed a reduction of blood parasitemia and increase of survival in a dose-dependent manner. The previous treatment of animals with a dose of 200 mg/kg was shown effective on the decrease of parasitemia, mainly when the treatment was carried out 24 hours before the infection. When infected animals were treated with two daily doses of EBL (71.5 and 143 mg/kg) for 30 days and parasitemia compared with those animals treated with Benzonidazol (two daily doses of 50 mg/kg), it was verified that EBL was more effective than Benzonidazol. To investigate the possible involvement of the nitric oxide (NO) system in the mechanism of action of EBL, infected animals were treated with EBL and inhibitors of NOS (NOARG or L-NAME), where an attenuation of the EBL effects was observed. By measuring the NO_2 and NO_3 serum levels of normal and EBL-treated animals, a significant increase in the concentrations of NO_2 and NO_3 was verified in the later. When parasitemia and the NO_3 serum levels of EBL-treated were compared to those untreated animals, it was observed that the untreated animals showed higher parasitemia and NO_3 levels between 8th and 14th day pos-infection. The trypanocidal activity promoted by EBL was also tested *in vitro* on blood samples containing *T. cruzi* and incubated with EBL (24 and 48 hours), resulting in reduction of counting the trypomastigote forms. In the genotoxic potential of EBL, the results suggest that EBL has a protective effect in the formation of micronucleated erythrocytes. In the phytochemical screening, the presence of several chemical classes was verified including tannins and terpenoids that can have antiparasitic activity. The results obtained in this study suggest that the crude extract of *M. velutina* presents components which are capable to reduce the parasitemia of *T. cruzi* infected mice and this may be correlated with the nitric oxide system.

Anexo 1 - Fotos da *Mandevilla velutina* (Apocinaceae).



Foto1 - Parte Vegetativa da *M. velutina*



Foto1 - Raiz da *M. velutina*

FU-00010120-1