

AÇÃO DO ASPERGILLUS SP. SOBRE O TRYPANOSOMA CRUZI "IN VITRO"

O. CÁCERES (1), M. C. S. SALGUEIRO (2), E. KIMURA (3), G. MORAES (4)
e T. A. R. MACHADO (5)

RESUMO

Aspergillus sp. quando cultivado em meio líquido (Sabouraud), secreta substância letal para formas de cultura do *Trypanosoma cruzi*. Verificamos os seguintes efeitos sobre o *T. cruzi* quando em presença do filtrado obtido pelo crescimento do fungo naquele meio: lise dos epimastigotas e inibição de incorporação de timidina (^3H) por estas formas; inviabilidade das formas sanguícolas em meio LIT e perda da infectividade desses tripomastigotas sanguícolas para células HeLa e camundongos.

INTRODUÇÃO

Embora a doença de Chagas seja conhecida há várias décadas, ela continua sendo uma das parasitoses para a qual são poucos os recursos terapêuticos. Os quimioterápicos normalmente usados têm efeitos discutíveis, existindo muitas controvérsias quanto às suas utilidades práticas ^{6,7,21}. Entre as drogas que apresentaram alguma atividade na doença de Chagas estão a Fumagilina ^{1,4} a Stilomicina ^{10,18}; o Suramin; Nivaquina ¹¹; Aminoquinoleínas ¹²; Aureomicina ¹³; Nitrofuranos ^{5,16}; Acromicina ¹⁹; Spirotrypan ²¹; Iloticina ou Eritromicina ²³. Entre esses, alguns apresentaram resultados animadores durante a fase aguda da doença ⁷, porém o mesmo não acontece na fase crônica da moléstia.

Neste trabalho, apresentamos alguns resultados preliminares da ação de um fungo contaminante de cultura, *Aspergillus sp.*; ^{3,14,15} com a propriedade de inibir o crescimento e lisar as formas de cultura do *T. cruzi* e tornar avirulentas as formas sanguíneas para camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos — Os camundongos utilizados, apresentavam 16 a 20 g de peso corporal e 40 a 60 dias de idade no início dos experimentos.

T. cruzi — O *T. cruzi* utilizado foi o de cepa Y¹⁷, mantido em cultura em meio LIT (Liver Infusion and Tryptose) pH 7,2 a 28°C, a mais de 20 anos. As contagens dos tripanosomas de cultura foram feitas em câmara de Neubauer. As formas sanguíneas foram contadas em gota espessa ⁷. As lâminas com esfregaço de cultura de *T. cruzi* foram coradas conforme o método de Leishman.

Aspergillus sp. — O *Aspergillus sp.* contaminante de uma cultura de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 foi isolado em meio de ágar-Sabouraud, classificado e cultivado em Sabouraud-líquido. Após 15 dias à temperatura ambiente, a cultura foi filtrada em Seitz e dividida em 4 amostras, denominadas: A, B, C e D.

Cultura de Tecido — As células HeLa foram cultivadas e mantidas em estufa a 33°C ²⁰

Este trabalho foi patrocinado pela FAPESP, CNPQ e FEMESM

- (1) Prof. Titular de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Marília
- (2) Acadêmica — 6ª anista da Faculdade de Medicina de Marília
- (3) Profª Assist. do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP
- (4) Prof. Assist. do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Marília
- (5) Acadêmico — 3ª anista da Faculdade de Medicina de Marília

Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Medicina de Marília — C.P. 451 — São Paulo, Brasil
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo — C.P. 20.780 — São Paulo — Brasil

e infectadas com formas metacíclicas do *T. cruzi*, provenientes de cultura em meio HIL pH 6,7.

Atividade proteolítica — A presença de proteases secretadas pelo *Aspergillus* sp., no seu meio de cultura, foi determinada pelo método da Azocaseína⁹.

Experimentos — A amostra A foi subdividida em 6 frações de 200 ml cada uma, aqui representada em algarismos romanos. A fração I foi utilizada em diferentes proporções (de 1,6 a 13% V/V) nas culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 a 28°C. A fração II foi adicionada na proporção de 20% (V/V) em cultura de *T. cruzi* em meio LT pH 7,2, medindo-se a incorporação de Timidina (³H), Uridina (³H) e Leucina (³H) pelos flagelados. Foram feitas duas culturas em LIT pH 7,2 com inóculo inicial de 9×10^6 *T. cruzi*/ml, incubados durante 20 horas a 28°C, contendo uma delas 20% de fração II (cultura A) e a segunda 20% de meio Sabouraud (cultura S). Após esse período de incubação, foi feita a contagem dos flagelados. A cultura S apresentou 15×10^6 *T. cruzi*/ml e a cultura A, 6×10^6 *T. cruzi*/ml. A cultura S foi distribuída em 3 frascos com 3 ml cada uma (S₁, S₂ e S₃) e a cultura A em 6 frascos com 3 ml cada uma (A₁, A₂ e A₃) e (L₁, L₂ e L₃), respectivamente. As frações L₁, L₂ e L₃ foram centrifugadas, lavadas com salina estéril e os sedimentos ressuspensos em meio LIT pH 7,2 íntegro. A seguir foi adicionada solução de Timidina (³H) nas culturas S₁, A₁ e L₁; Uridina (³H) em S₂, A₂ e L₂ e Leucina (³H) em S₃, A₃ e L₃ para uma atividade específica de 9 µc/ml em todos os frascos. Após 3 horas de incubação a 28°C, as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm 4°C (Centrifuga Sorvall RC-2B) por 10 minutos e lavadas com salina 0,9% por três vezes. A seguir foi adicionado ácido tricloroacético 5% e as suspensões foram congeladas e descongeladas 3 vezes em banho de gelo seco, filtradas em membranas de Millipore, plaqueadas e a radioatividade contada no cintilador LS-100 da Beckman.

A fração III foi aquecida a 100°C de 1 a 60 minutos e a seguir utilizada em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 na proporção de 10% (V/V).

A fração IV foi adicionada em cultura de *T. cruzi* em meio HIL 6,7, contendo 10×10^7 flagelados/ml com 40% de formas tripomasti-

gotas na proporção de 10% (V/V), incubando-se a preparação a 28°C durante 4 horas. A seguir a cultura (10 ml) foi centrifugada a 3.000 rpm a 4°C (Sorvall RC-2B), por 10 minutos e lavada com salina 0,9% estéril, por três vezes. Os flagelados foram ressuspensos em salina (10 ml). Dessa preparação adicionamos 0,1 ml em cada uma das dez culturas de células HeLa, mantidas a 33°C em laminula fluante de 1 a 5 dias. Diariamente duas laminulas eram lavadas com salina a 0,9%, coradas e fixadas em lâminas de vidro, pesquisando-se a presença de células infectadas ao exame microscópico. Paralelamente, realizamos o mesmo experimento com a fração IV aquecida a 100°C durante 60 minutos.

A fração V foi adicionada em meio LIT pH 7,2 a 28°C a 10% (V/V) contendo sangue de camundongos infectados a 6 dias e que apresentavam intensa parasitemia. Estas culturas, que apresentavam inicialmente 16×10^3 tripomastigotas/ml, foram observadas durante 6 dias consecutivos, fazendo-se as contagens de flagelados diariamente. Culturas controles sem a fração V e com a fração V aquecida a 100°C durante 1 hora, foram igualmente observadas.

A fração VI foi adicionada em sangue de camundongos, contendo 9×10^4 flagelados por ml, na proporção de 10% (V/V). Esta preparação, após permanecer por 24, 48 e 72 horas a 10°C, para prevenir o crescimento de eventuais bactérias contaminantes, foi injetada em 18 camundongos divididos em 3 lotes, A, B, e C. No lote A, dois camundongos receberam a preparação mantida a 10°C por 24 horas, dois a de 48 horas e dois a de 72 horas. Outro lote, B, de 6 camundongos recebeu igual tratamento com sangue infectado com *T. cruzi* com a adição da fração VI aquecida a 100°C durante 60 minutos. Em todos os animais foi injetado aproximadamente 2×10^3 flagelados. Sangue de camundongo, não tratado com a fração VI e obedecendo as mesmas condições anteriores foi injetado em um terceiro lote (C) de 6 camundongos. Os camundongos dos lotes A e B foram sacrificados 30 dias após a infecção. O sangue de cada camundongo foi reinoculado em dois novos camundongos.

A amostra B (4 litros) foi liofilizada (Liofilizador Virtis) e a seguir utilizada em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 para concentração final de 1 mg de liofilizado por

ml de meio. Parte dessa amostra foi dissolvida em água aquecida a 100°C durante 60 minutos antes da sua adição nas culturas.

As amostras C e D foram extraídas (5x) com clorofórmio e éter etílico, respectivamente, na tentativa de obtenção do "princípio ativo". Ambas foram separadas em funil e cristalizadas à vácuo, a primeira a 50°C e a segunda a 45°C. A seguir foram dissolvidas em glicerol, para concentração final de 0,1 mg/ml e utilizadas em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2. As atividades proteolíticas das amostras A, B, C e D foram medidas pelo método de azocaseína⁹, fazendo preparações que continham 200 µl de azocaseína (5,25 mg/ml de água), 100 µl de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 7,4 e 1,8 ml de amostra (A, B, C ou D). Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi interrompida por adição de 150 µl de ácido tricloroacético 70% e deixada em repouso em banho de gelo por 15 minutos. A seguir foi filtrada em Whatmann n.º 1, neutralizada com

200 µl de NaOH 10 N, permanecendo em repouso por 10 minutos e a densidade óptica lida em 440 nm no Espectrofotômetro EEL.

Reagentes — Os reagentes utilizados nestes experimentos foram adquiridos da Merck A.G. Darmstadt, exceção feita aos compostos radioativos, que foram obtidos na Volk Radiochemical Company.

RESULTADOS

Aspecto geral do *Aspergillus* sp. — Na Fig. 1 podemos ver o aspecto geral do *Aspergillus* sp., em meio de ágar-Sabouraud. Quando o fungo foi cultivado em Sabouraud-líquido à temperatura ambiente da ordem de 20°C o seu crescimento foi muito rápido, ocupando toda a superfície líquida, quatro dias após o inóculo. A ação letal sobre o *T. cruzi* de cultura, começou aparecer por volta do 8.º dia, atingindo a atividade máxima por volta do 15.º dia, após o inóculo.

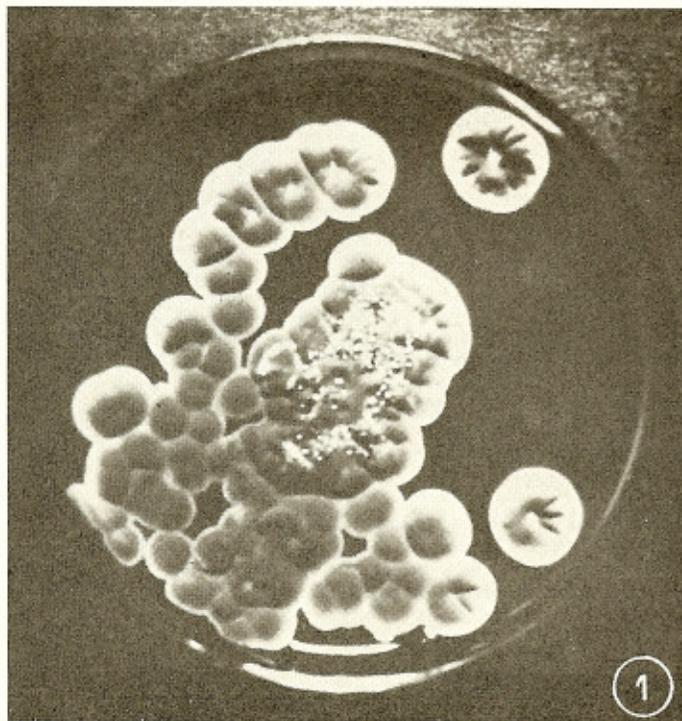


Fig. 1 — Aspecto geral do fungo contaminante *Aspergillus* sp. após 120 horas do inóculo em meio ágar-Sabouraud

Atividade do *Aspergillus* sp. "in vitro" — Como pode ser observado na Fig. 2, a atividade

do filtrado (fração I) sobre o crescimento do *T. cruzi* foi bastante drástica, diminuindo ra-

pidamente o número de flagelados nas culturas. Com 1,6% do filtrado (V/V), houve um período de inibição de crescimento, seguido de multiplicação dos flagelados. Com 3,3%, a inibição foi completa, notando-se alterações morfológicas profundas após 48 horas de ação do filtrado A. Na Fig. 3 podemos observar o aspec-

to dos tripanosomas após a ação da fração I do filtrado A em diferentes intervalos de tempo, notando-se alterações morfológicas e diminuição do número de flagelados. Após 72 horas de incubação a 28°C, a lise dos tripanosomas foi completa com 10% de filtrado A.

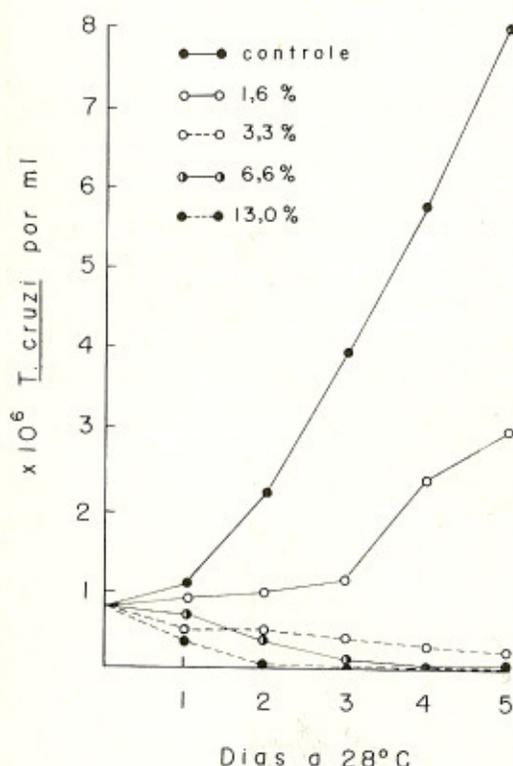


Fig. 2 — Efeito do filtrado A no crescimento do *T. cruzi* em fase de multiplicação exponencial em meio LIT, pH 7,2. As concentrações do filtrado variaram de 1,6 a 13% em relação ao meio LIT (V/V). Neste caso, observou-se clara diminuição do número de flagelados, a medida que aumentamos o volume do filtrado A.

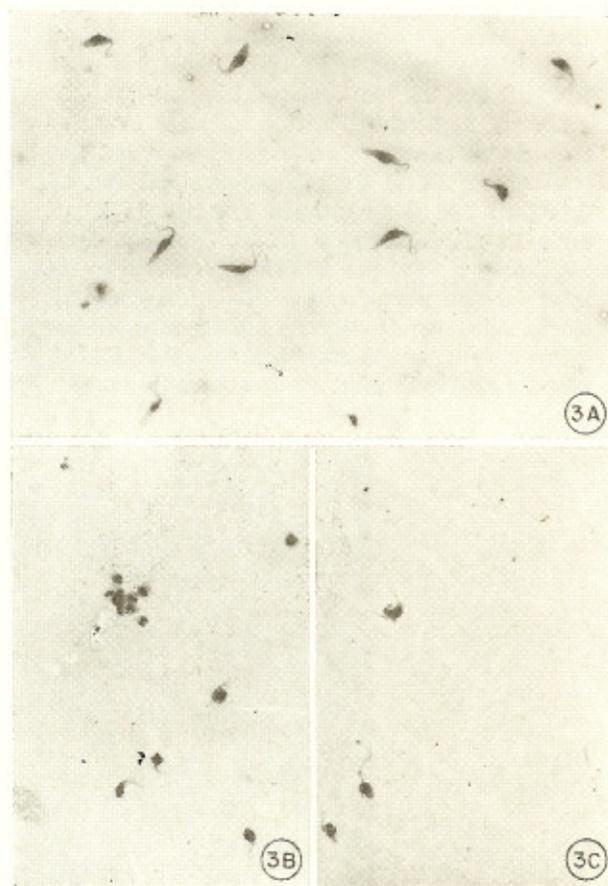


Fig. 3 — Aspecto geral da cultura do *T. cruzi* em meio LIT, pH 7,2 na presença e na ausência do filtrado A. 3A) — Cultura normal após 48 horas de incubação a 28°C. 3B) — Após 24 horas de incubação com 10% de filtrado A. 3C) — Após 48 horas de incubação com 10% de filtrado A. Em 3C pode ser observado que os tripanosomas sofreram degeneração quase completa. Coloração Leishman com 1000 X de aumento.

Incorporação de timidina (³H), uridina (³H) e leucina (³H) pelo *T. cruzi* tratado com o filtrado A (fração II) em meio LIT pH 7,2 — Como pode ser observado na Tabela I, a incorporação desses precursores de DNA, RNA e proteínas, foi fortemente inibida na presença do filtrado. Porém, após a lavagem dos flagelados da cultura A com salina e reincuba-

ção em meio LIT íntegro, somente a incorporação de timidina (³H) continuou inibida (L₁); a de uridina (³H) e leucina (³H) voltaram ao normal; (L₂) e (L₃), respectivamente. Neste caso, utilizamos volumes de filtrado A (fração II) em proporção de 20% (V/V), com a finalidade de diminuir o tempo para obtenção de efeito tripanocida. Procedendo dessa forma

podemos medir a incorporação dos radioisótopos durante a fase de crescimento exponencial onde a diferença de incorporação dos precursores marcados, pelo flagelado tratado e controle, é mais acentuada.

TABELA I

Efeito do filtrado A (fração II) na incorporação de precursores de DNA, RNA e proteínas. (S) cultura com 20% de Sabouraud-líquido (V/V). (A) cultura com 20% de filtrado A, fração II (V/V) e (L) cultura com 20% de filtrado A, fração II (V/V). Após 20 horas de incubação a cultura L foi centrifugada, lavada com salina e ressuspensa em meio novo (LIT pH 7,2)

Precursores marcados	cpm por 10 ⁶ T. cruzi								
	S ₁	A ₁	L ₁	S ₂	A ₂	L ₂	S ₃	A ₃	L ₃
Timidina	433	11	180	—	—	—	—	—	—
Uridina	—	—	—	80	10	81	—	—	—
Leucina	—	—	—	—	—	—	8	5	8
% inibição de incorporação	—	97	59	—	88	0	—	32	0

Efeito da temperatura sobre a atividade lítica do filtrado A (fração III) a 10% (V/V) em cultura de T. cruzi em meio LIT pH 7,2 — A fração III do filtrado A foi dividida em 6 partes iguais e aquecidas em banho de água a 100°C, por 1, 5, 10, 30 e 60 minutos. Uma das frações não foi aquecida. Os resultados expressos na Tabela II, mostram que a atividade lítica do filtrado A sobre o T. cruzi de cultura em meio LIT pH 7,2 permaneceu quase inalterada mesmo com aquecimento de uma hora a 100°C.

TABELA II

Efeito da temperatura na atividade inibidora do filtrado A (fração III) sobre o crescimento do T. cruzi em meio LIT pH 7,2 com 10% de filtrado (V/V)

Dias a 28°C	Tempo de aquecimento a 100°C (minutos)						
	0	1	5	10	30	60	controle
	crescimento em milhões de T. cruzi/ml						
1	30	30	30	30	30	30	30
3	2	5	8	10	15	19	52
5	0	0	0	2	4	5	86

Atividade do filtrado A (fração IV) em cultivo de tecido infectado com T. cruzi — Os tripanosomas de cultura HIL pH 6,7 com 40%

de formas tripomastigotas, previamente tratados com 10% de filtrado A durante 4 horas, tornaram-se avirulentos para células de cultivo de tecido (células HeLa), mesmo quando esse filtrado foi aquecido a 100°C durante 60 minutos. A cultura controle apresentou uma proporção de 1 célula infectada para cada 30 normais, enquanto que as culturas com formas pré-tratadas não apresentaram células infectadas em 2.000 campos microscópicos médios examinados.

Viabilidade das formas sanguíneas de T. cruzi em meio LIT pH 7,2 contendo 10% de filtrado A (fração V) (V/V) — Sangue de camundongos (0,2 ml) com parasitemia de 8×10^4 tripanosomas/ml foi inoculado em meio LIT pH 7,2 contendo 10% de filtrado para uma concentração final de 16×10^3 flagelados/ml. Após 4 dias de incubação a 28°C, encontramos tripanosomas na forma de amastigotas na cultura controle e nenhuma forma nas culturas com filtrado A. Na cultura controle apareceram formas epimastigotas em divisão após 4 dias de incubação. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela III.

TABELA III

Efeito do filtrado A (fração V) sobre o T. cruzi sanguínea, em meio LIT pH 7,2 a 10% (V/V). A — Sangue infectado + LIT pH 7,2. B — Sangue infectado + LIT pH 7,2 + filtrado A. C — Sangue infectado + LIT pH 7,2 + filtrado A pré-aquecido a 100°C por 60 minutos

Dias a 28°C	Crescimento: nº de T. cruzi/ml (x 10 ³)		
	A	B	C
1	16	11	12
3	16	2	3
6	21	0	0

Avirulência das formas sanguíneas do T. cruzi tratadas com filtrado A (fração VI) — Como pode ser visto na Tabela IV, sangue de camundongos com 9×10^4 tripanosomas/ml, previamente tratado com filtrado A (aquecido ou não a 100°C por 60 minutos) durante 24, 48 e 72 horas a 10°C, mostrou-se inócuo quando injetado em camundongos, não se constatando a presença de flagelados no sangue, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Os camundongos do grupo controle morreram todos entre o 9.º e 15.º dia após a infecção. Os camundongos

dos grupos A e B foram sacrificados 30 dias após a infecção. O sangue desses camundongos subinoculado em novos camundongos não provocou infecção.

TABELA IV

Avirulência do *T. cruzi* sanguícola, previamente tratado com filtrado A (fração VI) e mantido a 10°C, durante 24, 48 e 72 horas. Um total de 18 camundongos foi dividido em 3 lotes (A, B e C) com 6 animais cada um. Os lotes A e B foram inoculados com tripanosomas previamente tratados com filtrado A natural e aquecido a 100°C, respectivamente. O lote C é o controle. Cada subgrupo de A, B e C tem 2 camundongos cada um

Tempo de incubação a 10°C (horas)	Parasitemia: 7 dias após a infecção em nº de <i>T. cruzi</i> /ml de sangue (x 10 ⁴)								
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	C ₂	C ₃
24	0	—	—	0	—	—	9	—	—
48	—	0	—	—	0	—	—	3	—
72	—	—	0	—	—	0	—	—	4

Efeito do filtrado B (amostra liofilizada) sobre o *T. cruzi* de cultura em meio LIT pH 7,2

— Esta amostra dissolvida em água (5 mg/ml), foi adicionada em cultura de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 para uma concentração final de 1 mg de liofilizado por ml de meio. O liofilizado determinou a lise total dos flagelados após 24 horas de incubação a 28°C, mesmo quando previamente aquecido a 100°C durante 60 minutos.

Efeito dos filtrados C e D (extração com clorofórmio e éter etílico) sobre o *T. cruzi* de cultura em meio LIT pH 7,2 — As extrações feitas com clorofórmio e éter etílico, aquecidos ou não a 100°C, também apresentaram atividade lítica sobre os flagelados de cultura em meio LIT pH 7,2. Contudo, a extração com clorofórmio foi a mais ativa, alterando bastante a morfologia dos tripanosomas em apenas 5 horas de ação e lisando totalmente a cultura em 24 horas de incubação a 28°C. A extração com éter etílico apresentou atividade inferior a do filtrado A.

Atividade proteolítica das amostras A, B, C e D — Como pode ser observado na Tabela V, as amostras A e B apresentaram atividade azocaseinólítica. Estas amostras quando aquecidas a 100°C durante 60 minutos perderam essa capacidade. Nas amostras C e D essa atividade foi medida nas fases clorofórmio e éter

etílico e nas suas respectivas fases aquosas. Constatamos efeito proteolítico somente nas frações aquosas.

TABELA V

Efeito proteolítico das amostras A, B, C e D sobre a azocaseína em unidades de absorvância a 440 nm. A absorvância da amostra A está expressa em unidades/ml de filtrado A, as de B, C e D por mg de liofilizado ou precipitado.

Amostras	A	B	C	D
Absorvância	0,300	1,200	0,0	0,0

As amostras A e B, quando pré-aquecidas apresentaram absorvância igual a zero, enquanto que as fases aquosas das extrações C e D tiveram absorvâncias iguais a 0,280 e 0,290 unidades por ml de filtrado, respectivamente.

DISCUSSÃO

O *Aspergillus* sp. utilizado neste trabalho, apresenta algumas características, tais como, morfologia, coloração e crescimento, semelhantes ao *Aspergillus fumigatus*. Contudo, deve tratar-se de um mutante deste, ou mesmo de um outro fungo desse grupo ainda não caracterizado. É fato conhecido de longa data que fungos do grupo *Aspergillus* produzem dezenas de substâncias com efeito antimicrobiano de largo espectro, atuando contra vírus, bactérias, protozoários e células tumorais^{6,14, 15,22}. Além desses antibióticos, esse fungo também secreta proteases, quando cultivado em meio líquido. Entre os antibióticos produzidos pelo *Aspergillus fumigatus*, com ação anti-protozoário, são mais conhecidos a fumagilina^{1,4} e a tripacidina². Além desses, são conhecidos a fumigatina, a fugamicina e o ácido aspergílico, cujos espectros de ação não estão bem caracterizados. Desses antibióticos apenas a fumagilina^{1,4} e a tripacidina² foram utilizadas na quimioterapia experimental da Doença de Chagas. Como a fumagilina é termolábil e o nosso material é termoestável, fica excluída a possibilidade de ser esse o único antibiótico, responsável pela lise do *T. cruzi* “in vitro” em nossa preparação. Quanto a tripacidina, ficou constatado que apresenta atividade contra *T. cruzi* apenas “in vitro”, não estando bem caracterizado seu papel “in vivo”.

Os resultados de nosso experimento sugerem a presença de alguma substância tripano-

cida, excretada pelo *Aspergillus* sp. durante o seu crescimento e que apresentou características de termoestabilidade até 100°C e é pouco solúvel em éter etílico e bastante solúvel em clorofórmio.

O efeito lítico observado, poderia ser devido às proteases excretadas por esse fungo, porém, como as preparações aquecidas por 1 hora a 100°C e extraídas com clorofórmio, também provocam a lise dos tripanosomas e não apresentam atividade azocaseinolítica, podemos excluir essa possibilidade. Já a inibição de incorporação de timidina (³H) pelo *T. cruzi*, sugere que essa substância tem algum efeito na síntese de DNA desse flagelado. Contudo, o mais interessante do ponto de vista prático, é o fato das formas tripomastigotas tornarem-se avirulentas para células de cultivo de tecido e para camundongos, quando pré-incubadas com o filtrado A. Sabendo-se que as infecções com as formas tripomastigotas sanguíneas, provocam intensa parasitemia em camundongos, 5 a 7 dias após a inoculação e a morte durante os 15 primeiros dias, o fato de não ter sido constatada infecção dos camundongos 7 dias após o inóculo e a sobrevivência de todos após 15 dias é um dado promissor. Isto, sem dúvida, abre uma perspectiva para o campo da imunização contra a Doença de Chagas.

Quanto ao efeito terapêutico dessa preparação para camundongos infectados com *T. cruzi*, nossos resultados são preliminares e ainda não permitem chegar a uma conclusão, ficando esse material para uma futura publicação.

SUMMARY

Action of *Aspergillus* sp. on *Trypanosoma cruzi* «in vitro»

Aspergillus sp. when cultured in a liquid medium (Sabouraud), secretes a substance which is lethal to culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Filtrates of culture media in which *Aspergillus* sp. had been grown added to *T. cruzi* cultures produced the following effects: lysis of epimastigotes and inhibition of the ³H thymidine uptake by these forms, inviability of blood stream forms in LIT medium and loss of infectivity of these tripomastigotes for HeLa cells and for mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMLEDER, H. & JARPA, A. — Ensayos de quimioterapia en la Enfermedad de Chagas experimental. IX — Fumagilina. *Bol. Chil. Parasitol.* 7: 38-39, 1952.
2. BALAN, J.; EBRINGER, L. & NEMEC, P. — Trypacidin a new antiprotozoal antibiotic. *Naturwissenschaften* 5: 227-237, 1964.
3. BALAN, J.; EBRINGER, L. & NEMEC, P. — Occurrence of anti-protozoal antibiotics in lower fungi. *Progr. Antimicrob. Anticancer Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother.* 1: 489-491, 1970.
4. BEKKER, Z. E. — Fumagillin production by a variety of *A. fumigatus*. *Antibiotiki* 2: 14-16, 1957.
5. BRENER, Z. — A atividade terapêutica da furaltadone, furazolidone e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Hospital (Rio)* 60: 947-952, 1961.
6. BRENER, Z. — Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv. Pharmacol. & Chemother.* 13: 1-44, 1975.
7. BRENER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 389-396, 1962.
8. CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. — Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 14: 447-450, 1967.
9. CHARNEY, J. & TOMARELLI, R. M. — A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171: 501-505, 1947.
10. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & PEREIRA DA SILVA, L. H. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV — Effect of the aminonucleoside of stylomycin on mouse infections. *Exptl. Parasitol.* 8: 496-501, 1959.
11. GALLIARD, H. & BOUTET, R. — Modifications de l'évolution et de la virulence d'une souche de *Trypanosoma cruzi* Chagas sous l'action de divers produits chimiothérapeutiques et antibiotiques. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.* 26: 5-18, 1951.
12. GOBLE, F. C. — Studies on experimental Chagas's in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.* 37: 408-414, 1951.
13. JARPA, A. — Ensayos de quimioterapia del *Trypanosoma cruzi*. I — Aureomicina. *Bol. Chil. Parasitol.* 4: 49-50, 1949.
14. KUBEKA, W. — *Aspergillus* Revision. *Oesten, Apoth. Ztg.* 27: 681-684, 1973.
15. KUTKOVA, M. & BETINA, V. — Chromatographic study of antibiotics produced by strains of

- the species *A. fumigatus*. *Chem. Zvest.* 20: 439-445, 1966.
16. PACKCHANIAN, A. — Chemotherapy of experimental Chagas disease with thirty antibiotics. *Amer. J. Trop. Med.* 2: 243-264, 1953.
 17. PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo* 20: 191-201, 1953.
 18. PEREIRA DA SILVA, L. H. & KIRCHNER, E. — Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine, carbidium sulphate and the aminonucleoside of stylomycyn. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 16-23, 1962.
 19. PORTER, N. J. — Achromycin: A new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiotics & Chemother.* 2: 409-410, 1952.
 20. RIBEIRO, L. V.; KIMURA, E. & FERNANDES, J. F. — Factors affecting the density of intracellular infection of tissue culture cells by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 29: 295-308, 1969.
 21. ROMANA, C. — Ensayos de antibioticos y quimioterapicos en enfermedad de Chagas. *An. Inst. Med. Reg.* 3: 255-263, 1953.
 22. SEMENOV, M. N. — An antibiotic produced simultaneously with fumagillin. *Antibiotiki* 10: 219-222, 1965.
 23. TORREALBA, J. F. — La iloticina y la enfermedad de Chagas. Otros experimentos con el mismo antibiótico. *Gac. Med. (Caracas)* 61: 309-313, 1953.

Recebido para publicação em 23/6/1977.