

# ฤทธิ์การต้านมาลาเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

## Anti-Malarial Activity of *Andrographis paniculata* Extract

อุบลวรรณ ใจหาญ<sup>1\*</sup>, สมเดช ศรีชัยรัตนกุล<sup>2</sup>, ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์<sup>3</sup> และวรวิมล สมศักดิ์<sup>4</sup>

Ubonwan Jaihan, Somdet Srichairatanakool, Chairat Uthaipibull and Voravuth Somsak

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น <sup>2</sup>รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ <sup>3</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) <sup>4</sup>อาจารย์ สาขาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น

### Abstract

Malaria is a major problem around the world especially tropical and subtropical zones. Emergence of drug resistant malaria parasite is increasing and new effective compounds are urgently needed. Hence, we have investigated the antimalarial activity of *Andrographis paniculata* extract in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Andrographis paniculata* extract in a form of commercial herb capsule was used. ICR mice were infected intraperitoneally with  $1 \times 10^6$  iRBC of *P. berghei* ANKA strain. Several concentration of the extract was intraperitoneally injected on day 0, 1, 2, and 3 post-infection. On day 4, parasitemia was subsequently determined under microscope of Giemsa stained thin blood smear. Moreover, pyrimethamine treatment was used as a positive control. Finally, ED50 and ED90 were calculated. The results showed that *Andrographis paniculata* extract has antimalarial activity with ED50 of 22.3 mg/kg and ED90 of 154.3 mg/kg. However, further experiments should be performed in order to validate *Andrographis paniculata* extract as a novel antimalarial in the future.

**Keywords:** *Andrographis paniculata*, anti-malarial activity, malaria

### บทคัดย่อ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญโดยเฉพาะในเขตร้อนและร้อนชื้นของโลก และจากการที่เชื้อมาลาเรียมีการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการหายารักษามาลาเรียตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร ในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม-เบอร์เกียไอโดยใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ขายสำเร็จรูปในรูปแบบแคปซูล หนูทดลองสายพันธุ์ ICR ที่ถูกติดเชื้อ พลาสโมเดียมเบอร์เกียไอสายพันธุ์ ANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  เข้าทางช่องท้อง ทำการฉีดสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เข้าทางช่องท้องในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 หลังจากติดเชื้อ ในวันที่ 4 จะทำการนับจำนวนเชื้อที่เจริญเติบโตโดยการย้อมสเมียร์เลือดด้วยสี Giemsa และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคำนวณหาค่า ED50 และ ED90 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหนูทดลองได้โดยมีค่า ED50 เท่ากับ 22.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า ED90 เท่ากับ 154.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ควรจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาให้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นยาต้านมาลาเรียในอนาคต

**คำสำคัญ:** สารสกัดฟ้าทะลายโจร, ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย, มาลาเรีย

## บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่สำคัญและสามารถทำให้เสียชีวิตในผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนและร้อนชื้นของโลกรวมทั้งประเทศไทย (WHO 2009) ปัจจุบันยาต้านมาลาเรียไม่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีการพัฒนาทำให้เกิดการดื้อยา (Gregson and Plowe 2005) จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากที่จะต้องหายารักษาโรคมาลาเรียตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและป้องกันการดื้อยา ทางเลือกหนึ่งคือการหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรในธรรมชาติ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชันมักจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้งในจานเพาะเลี้ยงและในหนูทดลองได้ (Reddy, Gupta et al. 2007; Sannella, Messori et al. 2007; Koncarevic, Rohrbach et al. 2009; Kayano, Lopes et al. 2011; Okeola, Adaramoye et al. 2011; Abdel-Mageed, Backheet et al. 2012; Yenesew, Akala et al. 2012) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านกระบวนการอักเสบและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน (Sheeja, Shihab et al. 2006; Tripathi and Kamat 2007; Krithika, Verma et al. 2012) และเมื่อไม่นานมานี้ มีการรายงานว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ (Dua, Ojha et al. 2004; Mishra, Dash et al. 2009) แต่การศึกษาส่วนใหญ่จะใช้สารสกัดที่ทำการสกัดจากต้นฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม หรือใช้สารบริสุทธิ์ Andrographolite ซึ่งเป็นสารที่สำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการออกฤทธิ์ต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ทำสำเร็จรูปในรูปแบบของยาสมุนไพรแคปซูล เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียในหนูทดลองที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอ

## วิธีการทดลอง

### หนูทดลอง

หนูทดลองสายพันธุ์ ICR เพศเมีย (Outbred female ICR mice) น้ำหนักประมาณ 35-40 กรัม อายุระหว่าง 6-8 สัปดาห์ เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 22-25°C และให้แสงสว่างทุกๆ 12 ชั่วโมง หนูทดลองจะได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับหนูเมาส์ (Pellet Diet 082) และให้น้ำดื่มที่สะอาดตลอดการทดลอง

### เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้ใช้เชื้อพลาสโมเดียมเบอร์เกอไอสายพันธุ์ ANKA (*Plasmodium berghei* ANKA, PbANKA) ที่ก่อโรคมมาลาเรียในสัตว์จำพวกกัฒตะ (Rodent malaria parasites) เช่น หนูทดลอง ซึ่ง PbANKA นี้จะเป็นสายพันธุ์ปกติมาตรฐานที่มีความไวต่อยาคลอโรควิน (Chloroquine sensitive strain) และมีการเจริญเติบโตในหนูทดลองได้ดี โดยมีวงจรชีวิตในเลือดประมาณ 22-24 ชั่วโมง จึงจัดเป็นสายพันธุ์โมเดลที่ใช้ในการศึกษามมาลาเรียในสัตว์ทดลอง

### การเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ในหนูทดลอง

หนูทดลอง ICR จะถูกติดเชื้อ PbANKA ด้วยการฉีดเชื้อจำนวน  $1 \times 10^6$  เข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ซึ่งเชื้อจะเข้าไปเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง และสามารถตรวจติดตามการเจริญเติบโตได้ด้วยวิธี Microscopy โดยการนำเลือดจากหางหนูทดลองที่ติดเชื้อมาทำสเมียร์บนแผ่นสไลด์แก้วที่สะอาด จากนั้น

นำมาเชื่อมด้วยสี Wright-Giemsa และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด และคำนวณเป็น % Parasitemia

### ฟ้าทะลายโจร

ยาแคปซูลฟ้าทะลายโจร (ทะเบียนยาเลขที่ G 227/53) นำส่วนที่เป็นผงสารสกัดจากแคปซูลมาทำการเตรียมโดยชั่งสารสกัดปริมาณ 20 มิลลิกรัมนำมาละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำมาทำการเจือจางด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ให้ได้ความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง ตั้งแต่ 10-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

### การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในหนูทดลอง

หนูทดลอง 3 กลุ่มๆละ 5 ตัวจะได้รับสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง เป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน จากนั้นสังเกตอาการและความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหนูทดลอง รวมทั้งการเสียชีวิตของหนูทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

### ยาด้านมาลาเรียมาตรฐาน

ยาด้านมาลาเรียมาตรฐานที่ใช้ในการวิจัยนี้คือยาไพริเมธามีน (Pyrimethamine) โดยทำการเตรียมยา Stock solution ใน DMSO และทำการเจือจางต่อด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง ตั้งแต่ 0.05-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C

### การทดสอบฤทธิ์ด้านมาลาเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ PbANKA ในหนูทดลอง จะใช้วิธีมาตรฐานในการทดสอบ 4-day suppressive test (Peters, Portus et al. 1975) แบ่งหนูทดลองออกเป็นกลุ่มๆละ 5 ตัว ทำการฉีดเชื้อ PbANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  เข้าทางช่องท้อง หลังจาก 2 ชั่วโมงต่อมา จะทำการฉีดสารสกัดฟ้าทะลายโจรเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 10-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน โดยหนูทดลองกลุ่ม Placebo จะฉีด PBS และกลุ่มควบคุมบวกจะฉีดยาไพริเมธามีน จากนั้นจะทำการนับจำนวนเชื้อ PbANKA (% Parasitemia) ในหนูทดลองทุกตัวด้วยวิธี Microscopy ดังกล่าวข้างต้นและทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) จากสูตรด้านล่าง

$$\% \text{ Inhibition} = \% \text{ Parasitemia of treated group} \times 100$$

$$\% \text{ Parasitemia of Untreated group}$$

### สถิติ

การแสดงผลการศึกษาในรูปแบบกราฟเส้นและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ED50 และ ED90 จะใช้วิธี Nonlinear regression (variable slope) ของโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism Software

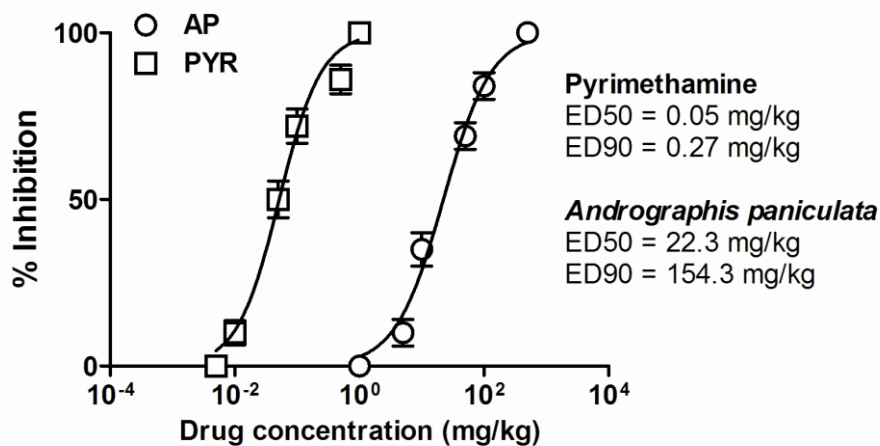
## ผลการทดลอง

## การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในหนูทดลอง

หนูทดลองที่ได้รับการฉีดสารสกัดฟ้าทะลายโจรเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษและความผิดปกติต่อหนูทดลอง ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้

## ฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร

ในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ในหนูทดลองได้ โดยมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 22.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า ED<sub>90</sub> เท่ากับ 154.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดฟ้าทะลายโจรยังคงมีฤทธิ์ที่ไม่ดีเท่ากับยาต้านมาลาเรียไพริเมทามีนซึ่งมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า ED<sub>90</sub> เท่ากับ 0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดฟ้าทะลายโจร หนูทดลองจะติดเชื้อ PbANKA จำนวน  $1 \times 10^6$  และได้รับการฉีดสารสกัดฟ้าทะลายโจรหรือยาไพริเมทามีนเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 4 วันและทำการคำนวณหา % Inhibition, AP = สารสกัดฟ้าทะลายโจร PYR = Pyrimethamine

## การอภิปรายผล

การที่เชื้อมาลาเรียมีการดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น ทำให้ต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยสามารถหาได้จากสารสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จากสารประกอบเดิมเป็นต้นแบบ หรือทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีในธรรมชาติ ซึ่งสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่งานวิจัยนี้ให้ความสนใจคือสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร โดยฟ้าทะลายโจรที่ใช้ในการศึกษานั้น เป็นฟ้าทะลายโจรที่ทำการสกัดและทำออกมาขายในรูปแบบของยาสมุนไพรแคปซูล และค่อนข้างได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคและให้ความสนใจพืชสมุนไพร จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเพื่อคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในสัตว์ทดลอง การวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ PbANKA ในหนูทดลองได้โดยไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลอง เนื่องจากฟ้าทะลายโจรมีองค์ประกอบสำคัญคือ Andrographolite ที่สามารถเป็นสาร

ด้านและทำลายอนุมูลอิสระ ลดความเป็นพิษที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ลดกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง การยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็ง รวมทั้งสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียได้ (Dua, Verma et al. 2009; Mishra, Dash et al. 2009; Krithika, Verma et al. 2012; Shao, Zheng et al. 2012; Yan, Chen et al. 2012; Guan, Tee et al. 2013) แต่จากงานวิจัยที่มีการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียนั้น มักจะเป็นการสกัดจากต้นฟ้าทะลายโจรสดมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม หรือใช้สารสกัดบริสุทธิ์ Andrographolite ที่มีขาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่มีการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่เป็นยาสมุนไพรแคปซูล และสามารถให้ผลที่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย แม้ว่าปริมาณของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้นั้นยังมีปริมาณที่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับยาไพริเมธามีน แต่ก็เป็นการศึกษาในเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการต้านมาลาเรีย และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเกี่ยวกับกลไกการยับยั้ง ฤทธิ์ในการรักษาและการป้องกันโรคมาลาเรียจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

### กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น, ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีน-ลิแกนด์และชีววิทยาโมเลกุล ไบโอเทค สวทช.

### เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Mageed, W. M., E. Y. Backheet, et al. (2012). "Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*." *Fitoterapia* 83(3): 500-507.
- Dua, V. K., V. P. Ojha, et al. (2004). "Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*." *J Ethnopharmacol* 95(2-3): 247-251.
- Dua, V. K., G. Verma, et al. (2009). "*In vitro* antiprotozoal activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*." *Phytother Res* 23(1): 126-128.
- Gregson, A. and C. V. Plowe (2005). "Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates." *Pharmacol Rev* 57(1): 117-145.
- Guan, S., W. Tee, et al. (2013). "Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity." *Br J Pharmacol* 168(7): 1707-1718.
- Kayano, A. C., S. C. Lopes, et al. (2011). "*In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*." *Malar J* 10: 112.
- Koncarevic, S., P. Rohrbach, et al. (2009). "The malarial parasite *Plasmodium falciparum* imports the human protein peroxiredoxin 2 for peroxide detoxification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(32): 13323-13328.
- Krithika, R., R. Verma, et al. (2012). "Antioxidative and cytoprotective effects of andrographolide against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in HepG2 cells." *Hum Exp Toxicol*.

- Mishra, K., A. P. Dash, et al. (2009). "Anti-malarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin." *Malar J* 8: 26.
- Okeola, V. O., O. A. Adaramoye, et al. (2011). "Antimalarial and antioxidant activities of methanolic extract of *Nigella sativa* seeds (black cumin) in mice infected with *Plasmodium yoelli nigeriensis*." *Parasitol Res* 108(6): 1507-1512.
- Peters, W., J. H. Portus, et al. (1975). "The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity." *Ann Trop Med Parasitol* 67(2): 155-171.
- Reddy, M. K., S. K. Gupta, et al. (2007). "Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L." *Planta Med* 73(5): 461-467.
- Sannella, A. R., L. Messori, et al. (2007). "Antimalarial properties of green tea." *Biochem Biophys Res Commun* 353(1): 177-181.
- Shao, Z. J., X. W. Zheng, et al. (2012). "Andrographolide exerted its antimicrobial effects by upregulation of human beta-defensin-2 induced through p38 MAPK and NF-kappaB pathway in human lung epithelial cells." *Can J Physiol Pharmacol* 90(5): 647-653.
- Sheeja, K., P. K. Shihab, et al. (2006). "Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 28(1): 129-140.
- Tripathi, R. and J. P. Kamat (2007). "Free radical induced damages to rat liver subcellular organelles: inhibition by *Andrographis paniculata* extract." *Indian J Exp Biol* 45(11): 959-967.
- WHO(2009)."World Health Organization, World Malaria Report."  
[http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html).
- Yan, J., Y. Chen, et al. (2012). "Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes." *Cell Biol Toxicol* 28(1): 47-56.
- Yenesew, A., H. M. Akala, et al. (2012). "The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burtii*." *Acta Trop* 123(2): 123-127.