

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**ANDREÍSA TEIXEIRA DE CASTRO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ALCALOIDES  
PIPERIDÍNICOS OBTIDOS DAS FLORES DE *Senna spectabilis* (DC.) SOBRE  
*Schistosoma mansoni***

**ALFENAS-MG**

**2015**

**ANDREÍSA TEIXEIRA DE CASTRO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ALCALOIDES  
PIPERIDÍNICOS OBTIDOS DAS FLORES DE *Senna spectabilis* (DC.) SOBRE  
*Schistosoma mansoni***

Dissertação, requisito parcial, para obtenção do título de mestre, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Junior

**ALFENAS – MG**

**2015**

**ANDREÍSA TEIXEIRA DE CASTRO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ALCALOIDES  
PIPERIDÍNICOS OBTIDOS DAS FLORES DE *Senna spectabilis* (DC.) SOBRE  
*Schistosoma mansoni***

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 10/08/2015

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Unifal

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Instituição: Ufla

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Lívya de Figueiredo Diniz

Instituição: Unifal

Assinatura

Aos meus pais pelo incentivo e esforços durante toda minha vida, ao Vinícius pelo incentivo, apoio e compreensão e à Luísa, principal motivadora para alcançar meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, pela orientação, dedicação, paciência, por todos os ensinamentos e amizade. Muito obrigada pela oportunidade e confiança, por ser tão solícito e estar sempre presente, mesmo com tantas atribuições.

Ao Prof. Dr. Claudio Viegas Junior, pelos ensinamentos, confiança, dedicação e principalmente pela paciência e disponibilidade. Agradeço também à Prof. Dr. Daniela Aparecida Chagas de Paula, à Kris Simone e à Camila, e ao Matheus de Freitas pela paciência e atenção para esclarecer minhas dúvidas.

À Prof. Dr. Raquel Lopes Martins Souza pelos ensinamentos, atenção, por estar sempre disposta a ajudar, principalmente se o assunto for *Schistosoma mansoni*.

À Aline, pessoa essencial para realizar este trabalho. Obrigada por me ensinar tudo, pelo incentivo, e pelas horas agradáveis de trabalho.

Ao Matheus Siqueira e à Isabella pela imensa ajuda, por ouvirem meus desabafos, e por me concederem momentos de trabalho agradáveis.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade oferecida.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ, em especial ao Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho e à Patrícia, pela disponibilização dos camundongos, sem os quais não seria possível realizar o trabalho.

À Prof. Dr. Hermínia pelo apoio e ajuda oferecida.

À Maria Cristina da Conceição, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por disponibilizar os caramujos.

À técnica Gabriela, representando o laboratório BIOGEN, pela ajuda e disponibilidade enquanto técnica, e pela amizade e momentos compartilhados durante esse tempo.

À Raissa Prado por disponibilizar um pouco do seu tempo a me ensinar, e ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho pela ajuda e por socorrer em alguns apuros.

À todos os amigos do laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos; Daniela, Fábio, Amanda, Rayssa, Patrícia, Franciene, que estiveram presentes em todos os dias de trabalho, pelos momentos compartilhados, pelas risadas, pelas conversas informais, por tornarem as horas de trabalho mais agradáveis e por ter a certeza de ter construído amizades sinceras. Em especial à Juliana pela ajuda e apoio e pelas experiências

compartilhadas. E a todos os outros alunos vinculados ao laboratório que de alguma forma estiveram presentes diariamente.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEMIG.

Ao Vinícius, pelo companheirismo, apoio, dedicação, e à Luísa, por ser meu principal incentivo para seguir em frente; e por compreenderem meus momentos de ausência.

Aos meus pais e minhas irmãs pelo apoio, incentivo e esforços feitos para poderem me oferecer o melhor e para que eu pudesse concluir mais essa etapa.

Obrigada a todos que conheci nesses dois anos e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por parasitos do gênero *Schistosoma* e apresenta um significativo impacto social e econômico. Atualmente, o praziquantel (PZQ) é o medicamento utilizado para o tratamento da doença, indicado pela Organização Mundial da Saúde. No entanto, a dependência de um único fármaco é preocupante, pois com reinfecções constantes e repetição de tratamento pode ocorrer a seleção de cepas resistentes. Sendo assim, a busca por novas substâncias com atividade esquistossomicida é essencial. O gênero *Senna* é alvo de muitos estudos devido ao reconhecimento de sua grande diversidade biológica e propriedades farmacológicas. No presente trabalho foi avaliada a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato etanólico (EEt), frações do extrato (FAE e FDM), e de alcaloides majoritários obtidos das flores de *Senna spectabilis*. Dos alcaloides piperidínicos também foi avaliada a atividade cercaricida e seu efeito em interação com PZQ. Os vermes adultos de *S. mansoni* foram expostos a diferentes concentrações do EEt, FAE e FDM, e mistura de substância cassina/ espectralina para avaliação de viabilidade dos parasitos e cálculo de concentração inibitória de 50%. Foi avaliada a atividade excretora e lesões de tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos à mistura de alcaloides cassina/espectralina por meio de marcação com sondas fluorescentes. A viabilidade celular foi avaliada utilizando células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) por ensaio de redução de MTT. O extrato etanólico e a fração acetato de etila de *S. spectabilis*, em concentrações elevadas provocam diminuição da ovoposição, paralisação de sistema excretor e lesões de tegumento. A fração diclorometano exerce atividade significativa quando comparada ao controle, visto que tal atividade é resultado da maior concentração de alcaloides nesta fração. A mistura (cassina/ espectralina) causou paralisia total dos vermes adultos de *S. mansoni* além de inibir a atividade excretora e provocar lesões de tegumento consideráveis no parasito na concentração de 50,0 µg/mL. Em relação à atividade cercaricida, os alcaloides supracitados provocaram paralisação e perda de cauda a partir da concentração de 50,0 µg/mL, e exibiram resultados relevantes em sinergismo com PZQ. A mistura de alcaloides também exibiu baixo valor de DL<sub>50</sub> 34,7 µg/mL; e apresentou potencial citotóxico moderado CC<sub>50</sub> 132,1 µg/mL. Estes resultados são promissores quanto à atividade esquistossomicida, portanto requerem estudos mais aprofundados.

Palavras - chave: Esquistossomose. Senna. Alcaloides. Marcadores biológicos.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by parasites of the genus *Schistosoma* and presents a significant social and economic impact. Currently, praziquantel (PZQ) is the drug used for the treatment of the disease, indicated by the World Health Organization. However, the dependence on a single drug is concerning, since with constant reinfections and retreatment the emergence of resistant strains can occur. Therefore, the search for new compounds with schistosomicidal activity is essential. The genus *Senna* is the subject of many studies due to the recognition of its great biological diversity and pharmacological properties. In the present study, *in vitro* schistosomicidal activity was evaluated of the ethanolic extract, fractions from the extract and majoritarian alkaloids obtained from *Senna spectabilis* flowers. From the last two compounds, the cercaricidal activity and its effect in interaction with PZQ were also evaluated. The adult worms of *S. mansoni* were exposed to different concentrations of ethanolic extract (EEt), ethyl acetate (FAE) and dichloromethane (FDm) fractions, and mixtures of compounds cassina/espectralina for the assessment of parasites viability and calculation of the inhibitory concentration of 50%. The excretory activity and tegument lesions of adult worms of *S. mansoni* exposed to the mixture of alkaloids cassina/espectralina were evaluated through staining with fluorescent probes. Cell viability was assessed using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by MTT reduction assay. The (EEt) and (FAE) of *S. spectabilis*, in high concentrations, cause decrease in oviposition, excretory system shutdown and tegument lesions. FDm fraction has significant activity when compared to the control, as this activity is result of higher concentration of alkaloids in this fraction. The mixture (cassina/espectralina) caused complete paralysis of adult worms of *S. mansoni*, in addition to inhibit the excretory activity and lead to considerable tegument lesions in the concentration of 50.0µg/mL. Regarding cercaricidal activity, the above-mentioned alkaloids caused paralysis and tail loss starting at a concentration of 50.0 µg/mL, and relevant results were obtained in the synergism with PZQ. The alkaloids mixture also showed low DL<sub>50</sub> value 34.7µg/mL; and presented potential moderate cytotoxic CC<sub>50</sub> 132.1µg/mL. These results are promising regarding the schistosomicidal activity, therefore require further study.

Key-words: Schistosomiasis. Senna. Alkaloids. Biomarkers.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Abundância relativa de (-)-cassina e (-)-espectralina na mistura, determinada por EM.....	49
Tabela 2-	Análise da atividade esquistossomicida do extrato etanólico de <i>Senna spectabilis</i> .....	52
Tabela 3-	Análise da atividade esquistossomicida da fração acetato de etila de <i>Senna spectabilis</i> .....	55
Tabela 4-	Análise da atividade esquistossomicida da fração diclorometano de <i>Senna spectabilis</i> .....	58
Tabela 5-	Análise da atividade esquistossomicida da mistura de alcaloidescassina/espectralina de <i>Senna spectabilis</i> .....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Mapa da ocorrência de esquistossomose no mundo.....	20
FIGURA 2 -	Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil .....	21
FIGURA 3 -	Esquema do ciclo de vida do parasito <i>Schistosoma mansoni</i> .....	24
FIGURA 4 -	Estrutura química do Praziquantel.....	29
FIGURA 5 -	<i>Senna spectabilis</i> .....	34
FIGURA 6 -	Esquema de isolamento da mistura de alcaloides cassina/espectralina.....	37
FIGURA 7 -	Estrutura molecular das substâncias (-)-cassina e (-) espectralina .....	38
FIGURA 8 -	Esquema de obtenção dos parasitos e montagem das placas.....	42
FIGURA 9 -	Esquema de marcação dos parasitos com sonda resorufina.....	44
FIGURA 10 -	Esquema de marcação dos parasitos com sonda Hoechst.....	45
FIGURA 11 -	Cromatograma de íons totais da mistura cassina/espectralina .....	48
FIGURA 12 -	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	50
FIGURA 13-	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos ao extrato etanólico de <i>S. spectabilis</i> .....	51
FIGURA 14 -	Gráfico da atividade <i>in vitro</i> do extrato etanólico sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	53
FIGURA 15 -	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos à fração acetato de etila de <i>Senna spectabilis</i> .....	54
FIGURA 16 -	Gráfico da atividade <i>in vitro</i> da fração acetato de etila sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	56
FIGURA 17-	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos à fração diclorometano de <i>S. spectabilis</i> .....	57
FIGURA 18-	Gráfico da atividade <i>in vitro</i> da fração diclorometano sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	59

FIGURA 19 -	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos à mistura de alcaloides (cassina/espectralina).....	60
FIGURA 20 -	Vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos à mistura de alcaloides (cassina/espectralina) com paralisia flácida .....	61
FIGURA 21-	Gráfico da atividade <i>in vitro</i> da mistura de alcaloides (cassina/espectralina) sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	63
FIGURA 22 -	Efeito da associação de Praziquantel (0,5 µg/mL) com cassina/espectralina.....	64
FIGURA 23 -	Efeito da associação de Praziquantel (0,25 µg/mL) com cassina/espectralina.....	64
FIGURA 24 -	Marcação de danos no sistema excretor de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> pela sonda resorufina.....	66
FIGURA 25 -	Marcação de lesões no tegumento de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> pela sonda Hoechst.....	67
FIGURA 26 -	Cultura <i>in vitro</i> de cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	69
FIGURA 27 -	Atividade <i>in vitro</i> da mistura de alcaloides (cassina/espectralina) sobre a motilidade das cercárias.....	70
FIGURA 28 -	Atividade <i>in vitro</i> da mistura de alcaloides cassina/espectralina sobre a perda de cauda das cercárias .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$ -	Microgramas
AcCN-	Acetonitrila
ACh -	Acetilcolina
$\text{Al}_2\text{O}_3$ -	Alumina
C/E -	Mistura de alcaloides cassina/espectralina
CC-	Cromatografia em coluna
$\text{CC}_{50}$ -	Concentração citotóxica para 50% das células
CDC-	“Centers for Disease Control and Prevention”
CEUA-	Comissão de ética no uso de animais
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -	Diclorometano
$\text{CHCl}_3$ -	Clorofórmio
CPqRR/FIOCRUZ-	Centro de Pesquisas René Rachou/ Fundação Oswaldo Cruz
DL-	Dose Letal
DMSO-	Dimetilsufóxido
EEt-	Extrato etanólico
EM-	Espectrometria de massa
EtOAc-	Acetato de Etila
EtOH-	Etanol
FAE-	Fração acetato de etila
FDm-	Fração diclorometano
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz
HCl-	Ácido clorídrico
HPLC-	High Pressure Liquid Chromatography
MeOH-	Metanol
$\text{MgSO}_4$ -	Sulfato de Magnésio
$\text{NH}_4\text{OH}$ -	Hidróxido de Amônio
OMS -	Organização Mundial da Saúde
OXA -	Oxaminiquina
PBMC-	Células mononucleares do sangue periférico humano
Pgp-	P-glicoproteína
PZQ-	Praziquantel
SFB-	Soro Fetal Bovino
UFLC-	“Ultra Performance Liquid Chromatography”
$\mu\text{L}$ -	Microlitros

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	ESQUISTOSSOMOSE .....	19
2.2	CICLO DE VIDA DO PARASITO .....	22
2.3	DIAGNÓSTICO E PATOGENIA .....	24
2.4	CONTROLE .....	26
2.5	AÇÃO CURATIVA x PROFILÁTICA OU SUPRESSORA .....	27
2.6	RESISTÊNCIA .....	29
2.7	PLANTAS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	31
2.8	<i>Senna spectabilis</i> .....	33
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	MATERIAL VEGETAL .....	36
4.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DA PLANTA E ISOLAMENTO.....	36
4.3	DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ENTRE (-)-CASSINA E (-)- ESPECTALINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	38
4.4	ENSAIOS ESQUISTOSSOMICIDAS.....	38
4.4.1	<b>Parasitas e camundongos</b> .....	39
4.4.2	<b>Acondicionamento e infecção dos caramujos</b> .....	39
4.4.3	<b>Infecção dos camundongos e obtenção dos parasitos</b> .....	39
4.4.4	<b>Avaliação <i>in vitro</i> do extrato, frações do extrato e mistura de alcaloides cassina/ espectralina obtidos das flores de <i>Senna spectabilis</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	40
4.4.5	<b>Avaliação <i>in vitro</i> do efeito cassina/espectralina em associação com o PZQ sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	42

4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE EXCRETORA E LESÃO DE TEGUMENTO DOS VERMES ADULTOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> EXPOSTOS À MISTURA DE ALCALOIDES CASSINA/ESPECTALINA POR MEIO DE SONDAS FLUORESCENTES .....	43
4.5.1	<b>Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes</b> .....	43
4.5.2	<b>Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> exposto à mistura cassina/espectralina após marcação com a sonda resorufina</b> .....	44
4.5.3	<b>Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> exposto à mistura cassina/espectralina após marcação com a sonda Hoechst 33258</b> .....	45
4.5.4	<b>Microscopia de fluorescência (preparo das lâminas para leitura)</b> .....	45
4.6	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO DA MISTURA CASSINA/ESPECTALINA SOBRE CERCÁRIAS DE <i>Shistosoma mansoni</i> .....	46
4.7	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	46
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
5	<b>RESULTADOS</b> .....	48
5.1	DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ENTRE (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	48
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> SOBRE VERMES ADULTOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> .....	49
5.2.1	<b>Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do extrato etanólico de <i>Senna spectabilis</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	51
5.2.2	<b>Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da fração acetato de etila de <i>Senna spectabilis</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	53
5.2.3	<b>Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da fração diclorometano de <i>Senna spectabilis</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	56
5.2.4	<b>Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da mistura de substâncias (cassina/espectralina) de <i>Senna spectabilis</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	59
5.2.5	<b>Efeito <i>in vitro</i> da mistura de alcaloides cassina/espectralina em associação com PZQ sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	63

5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA EXCRETOR DE VERMES ADULTOS POR MEIO DE RESORUFINA EM INCUBAÇÃO COM (CASSINA/ESPECTALINA) <i>IN VITRO</i> .....	65
5.3.1	<b>Avaliação de danos no tegumento de vermes adultos expostos a (cassina/ espectralina) <i>in vitro</i> usando a sonda Hoechst 33258</b> .....	67
5.4	EFEITO <i>IN VITRO</i> DA MISTURA CASSINA/ESPECTALINA SOBRE CERCÁRIAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> .....	68
5.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	71
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
	<b>ANEXO</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Werneck, Hasselmann e Gouvêa (2011), as doenças negligenciadas correspondem a um grupo de doenças infecciosas que afetam predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis causando impacto na saúde infantil e na redução da produtividade da população trabalhadora em razão da desigualdade e exclusão social.

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Ela está incluída na lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e apresenta um significativo impacto social e econômico ( OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A doença é endêmica em regiões tropicais, onde, freqüentemente, milhões de pessoas vivem em áreas com risco de transmissão. Estima-se que mais de 207 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 250 mil morram por ano em todo o mundo por conseqüências da infecção (OLIVEIRA, et al., 2012; RAPADO et al., 2011; SILVA et al., 2013; WHO, 2014). No Brasil, a helmintose é causada por *Schistosoma mansoni*, afeta cerca de seis milhões de pessoas, e é descrita em quase todo o território nacional, mas com maior prevalência nos estados do Norte, Nordeste e em Minas Gerais (KATZ; PEIXOTO, 2000).

Atualmente, a quimioterapia é o recurso imediato para minimizar a prevalência desta doença em todo o mundo, segundo Hotez et al. (2007), e o medicamento indicado pela OMS para o tratamento é o Praziquantel (PZQ). No entanto, a dependência de um único fármaco é preocupante, principalmente em áreas endêmicas onde tratamentos repetidos são constantes, podendo favorecer a seleção de cepas resistentes ao medicamento. Sendo assim, a busca por novas substâncias com atividade esquistossomicida é um alvo essencial. Neste contexto, as plantas medicinais são fontes potenciais como candidatos a protótipos de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2012; KAMEL et al., 2011).

Temos conhecimento que os seres humanos usam plantas há milhares de anos para tratar doenças e distúrbios de saúde. É provável também que muitas destas plantas já foram identificadas e usadas como antiparasitárias. Ainda hoje as infecções por parasitos são tratadas muitas vezes por produtos vegetais ou metabólitos secundários isolados a partir deles (WINK, 2012).

Cada vez mais os pesquisadores de produtos naturais têm se esforçado no conhecimento e valorização de nossa biodiversidade na busca por novos protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. O gênero *Senna* possui cerca de 600 espécies distribuídas no mundo, e é alvo de muitos estudos devido ao reconhecimento de sua grande diversidade biológica e propriedades

farmacológicas atribuídas a seu perfil químico diversificado (SILVA et al., 2010a). Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular como laxante, analgésico, anti-inflamatório e antiulcerogênico (VIEGAS et al., 2004; PIVATTO et al., 2005).

No Brasil há ocorrência das espécies *Senna spectabilis*, *S. carnaval* e *S. excelsa* que possuem como constituintes predominantes os alcaloides piperidínicos, alvos de muitos estudos devido às atividades biológicas apresentadas principalmente relacionadas ao sistema nervoso central (OLIVEIRA SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2010a).

Em trabalho recente sobre *Senna spectabilis*, conhecida popularmente como cássia do nordeste ou canafistula de besouro, foi relatada também a atividade antiparasitária do extrato, frações, e dos mesmos alcaloides, (-)-cassina/(-)-espectralina, contra formas promastigotas de *Leishmania major* (ALBUQUERQUE MELO et al., 2014).

Neste cenário, tendo em vista a preocupação em relação à seleção de cepas resistentes ao único fármaco utilizado para o tratamento da infecção por *Schistosoma mansoni*, e os resultados relevantes e promissores previamente apresentados em estudos sobre a espécie *Senna spectabilis*, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre tal espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será descrito detalhes da doença, bem como ciclo de vida do parasito, diagnóstico e patogenia, controle, ação curativa, profilática e supressora, resistência ao fármaco; e ainda as plantas já descritas com atividade esquistossomicida, e detalhes sobre a espécie de estudo, *Senna spectabilis*.

### 2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose ou bilharziose é uma doença tropical negligenciada, causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. É uma doença ligada à pobreza, encontrada predominantemente em zonas precárias em sanitização ou água limpa, incluindo as regiões da África, Sul da Ásia e América do Sul e Central (RAPADO et al., 2013).

Esta doença está entre as infecções parasitárias mais prevalentes em todo o mundo, com importantes consequências econômicas e de saúde pública, sendo endêmica em 76 países (FIGURA 1) (RAPADO et al., 2011; WHO, 2014). Cerca de 779 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença, com aproximadamente 207 milhões de pessoas, em zonas tropicais e subtropicais atualmente infectadas, dos quais 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões apresentam a forma grave da doença. Estima-se que cerca de 250 mil pessoas morram por ano em todo o mundo devido às consequências da infecção pelo *Schistosoma* (CHITSULO et al., 2000; STEIN et al., 2006; VAN DER WERF et al., 2003). Nas Américas, a doença é mais prevalente na região do Caribe, Venezuela e Brasil, onde a doença é considerada endêmica (WHO, 2014).

As principais espécies responsáveis pelas formas clínicas da esquistossomose humana são *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Outras espécies afetam os seres humanos, (*S. mekongi* e *S. intercalatum*) mas a distribuição geográfica destas se limitaram a Ásia e África, respectivamente (SILVA et al., 2005, 2013).

Como a ocorrência das espécies varia de acordo com a área geográfica, condicionada pela presença dos hospedeiros intermediários, foi descrito que *S. mansoni* ocorre na América do Sul, ilhas do Caribe, e, juntamente com *S. haematobium*, na África e no Oriente Médio. A espécie *S. haematobium* também é observada em partes do Oeste e África Central, já *S. japonicum* e *S.*

*mekongi* ocorrem em vários países do Sudeste asiático, e *S. japonicum* também é encontrada na China e Filipinas (WHO, 2014).

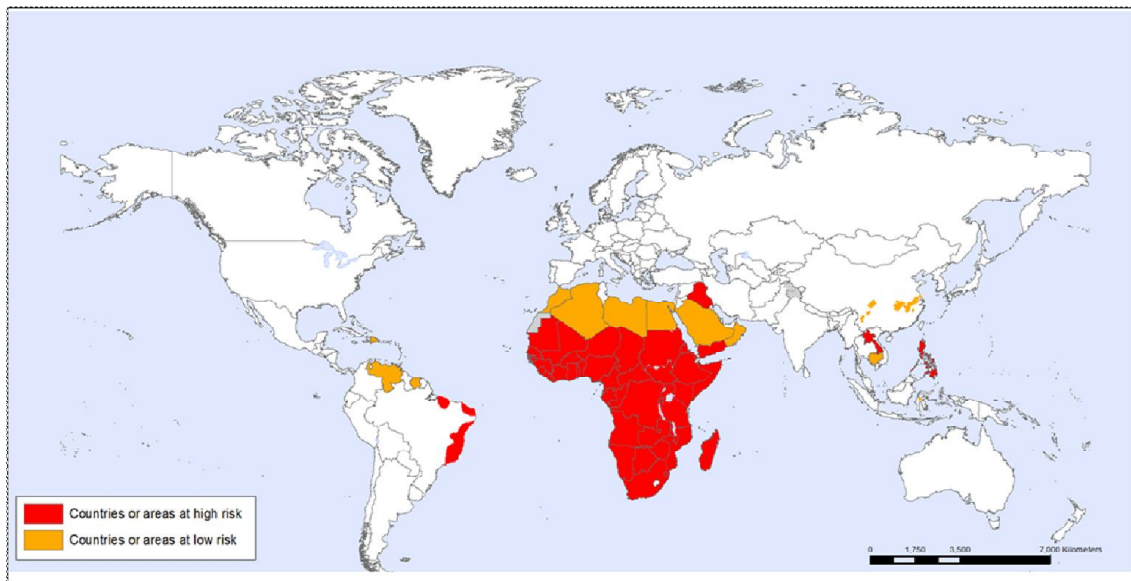


Figura 1- Mapa da ocorrência de esquistossomose no mundo.

Fonte: World Health Organization, 2012

Segundo Guimarães et al. (2012), no Brasil a esquistossomose, também chamada de barriga d' água, xistose e mal do caramujo, é causada pelo agente etiológico *S. mansoni*, cujo hospedeiro intermediário é um molusco do gênero *Biomphalaria*.

A helmintose afeta cerca de 6 milhões de pessoas no Brasil, sendo descrita em quase todo o território nacional (FIGURA 2), mas com maior prevalência nos estados do Norte, Nordeste e em Minas Gerais (KATZ; PEIXOTO, 2000). As regiões mais afetadas são caracterizadas por condições sanitárias precárias, pobreza e baixa escolaridade (MARTINS-MELO et al., 2014). Sua ocorrência também está diretamente relacionada com a presença do caramujo transmissor, que é o hospedeiro intermediário, do gênero *Biomphalaria* (*B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*) (SILVA et al., 2013). Estima-se que existam aproximadamente 25 milhões de pessoas em nosso país em risco de se infectarem (SILVA, et al., 2013).

Anteriormente, a esquistossomose era considerada uma doença tipicamente endêmica de áreas rurais. Entretanto, nas últimas décadas, ocorreu uma mudança no padrão de transmissão do parasito, principalmente devido à migração humana, como foi observado em diferentes regiões metropolitanas do país (KLOOS et al., 2008). No estado do Pernambuco há uma expansão gradual da doença em algumas regiões costeiras, devido ao êxodo de trabalhadores rurais para áreas urbanas, resultando em surtos incomuns de esquistossomose aguda (MELO et al., 2011). Um dos principais meios de facilitação para o contínuo aparecimento de novos casos dessa verminose é a

falta de instalações sanitárias adequadas, pois se trata de uma doença de veiculação hídrica (CANTANHEDE; FERREIRA; MATTOS, 2005).

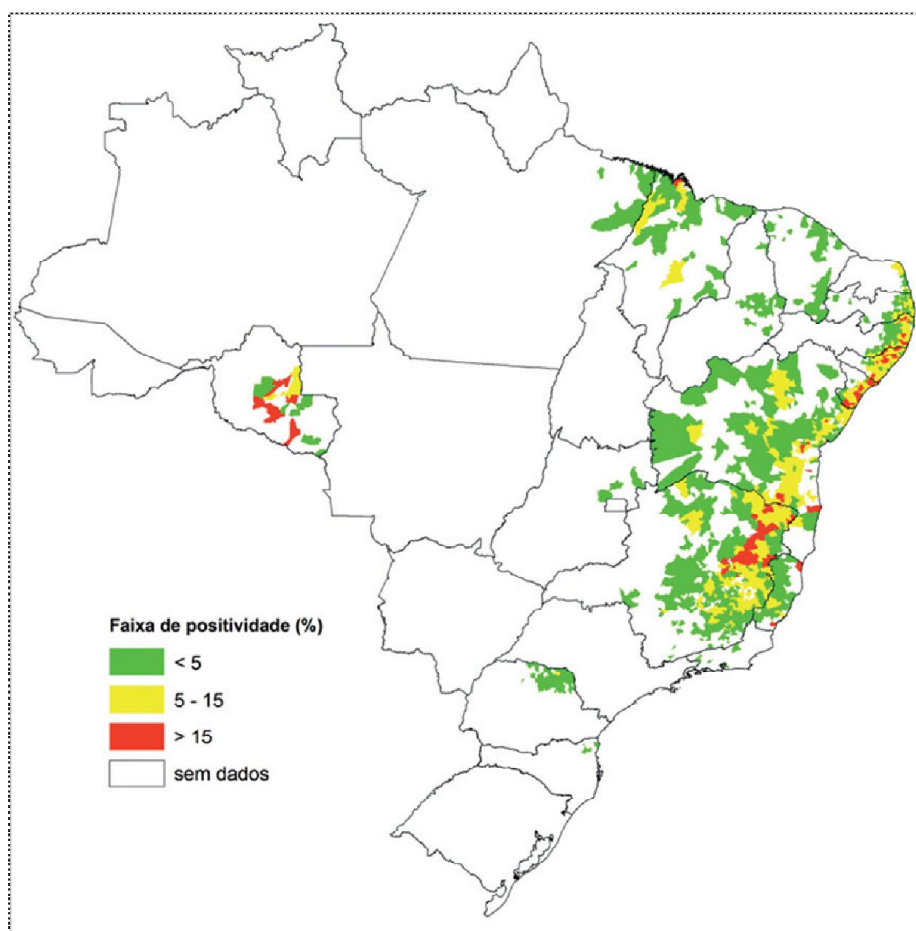


Figura 2- Mapa de distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos - Brasil, 2012.

Fonte: Vigilância da esquistossomose mansoni – Ministério da Saúde (2014).

Em estudo feito por Nascimento e Oliveira (2014), com o objetivo de descrever as formas mais graves da doença e estimar a morbidade relacionada com os anos de vida perdidos e custos econômicos em 2010, foi constatado que no Brasil ainda há grande ocorrência de formas graves da doença, sendo Pernambuco o estado com maior número de casos. Outra informação relevante é que mais da metade dos indivíduos com doença na forma grave estavam em faixa etária economicamente ativa, e destes, cerca de 15% dos pacientes com 30 anos.

O Brasil ainda apresenta morbidade considerável decorrente da infecção pela esquistossomose, necessitando de mais medidas de saúde pública e investimentos para a prevenção e controle no que se trata de doenças ligadas à pobreza (NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2014).

## 2.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO

O *Schistosoma mansoni* é um helminto da classe Trematoda digenea com ciclo de vida heteroxeno complexo, caracterizado pela passagem por dois hospedeiros: o hospedeiro definitivo (vertebrado/humano) e o hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo). O humano é o principal hospedeiro definitivo, e dentro do organismo humano o parasito evolui em sua forma adulta, ocorre então a reprodução sexuada e a eliminação de ovos no ambiente através das fezes que podem levar a contaminação ambiental (SILVA et al., 2013).

Segundo Silva et al.(2013), o ciclo biológico do *Schistosoma* depende da presença do hospedeiro intermediário no ambiente. Caramujos gastrópodos, da família Planorbidae, do gênero *Biomphalaria* são organismos que favorecem a reprodução assexuada do helminto. Os caramujos vivem em coleções de água doce, geralmente com fluxo de água pequeno ou estagnado. No Brasil, as espécies de caramujos hospedeiros intermediários são a *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*; envolvidas na transmissão da esquistossomose.

As fases evolutivas do parasito consistem em verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercaria e esquistossômulo (KATZ; ALMEIDA, 2003). Os seres humanos adquirem a esquistossomose através da penetração ativa da cercaria na pele (DA SILVA et al., 2013). O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. O período decorrido entre a penetração das cercárias no homem e o encontro de ovos nas fezes dura cerca de 40 dias, assim como no molusco o ciclo assexuado também dura cerca de 40 dias (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Segundo Katz e Almeida (2003), a cercaria representa a segunda fase de vida livre do parasito. Ela passa pela parede do esporocisto e migra para as partes moles externas do caramujo. É uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática. O corpo mede 0,2 mm de comprimento por 0,07 mm de largura e a cauda, aproximadamente 300 mm. Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva. Para ocorrer sua completa penetração é necessária que suas glândulas de penetração liberem enzimas proteolíticas que vão provocar a digestão dos tecidos. Nesse processo, que pode durar até 15 minutos, a cercária perde sua cauda (REY, 2001, p.421).

Depois de atravessar a pele, após a infecção, a cercaria evolui para a forma parasitária primária chamada esquistossômulo. Este inicia o processo de migração através do sangue e circulação linfática, até que atinja o coração e os pulmões. Os esquistossômulos presentes nos vasos sanguíneos atingem o fígado, onde alimentam-se e evoluem para formas adultas (SILVA et

al., 2013). A localização dos vermes adultos pode variar para cada espécie. O *S. mansoni* habita mais freqüentemente nas veias mesentéricas inferiores que drenam o intestino grosso. (GRYSEELS et al., 2006).

Uma fêmea de *S. mansoni* tem a capacidade de fazer a postura de 300 ovos por dia, que só amadurecem uma semana após a ovoposição. A postura ocorre nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes (KATZ; ALMEIDA, 2003). De todos os ovos liberados pela fêmea, apenas cerca de 30% dos ovos chegarão ao ambiente externo dando continuidade ao ciclo. O restante ficará retido na mucosa intestinal ou será arrastado, pela circulação, para o fígado, dando origem ao quadro mais característico da esquistossomose: a reação inflamatória granulomatosa hepática (RAMOS, 2007).

Os ovos maduros do *S. mansoni* medem cerca de 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, tamanho considerado grande. A presença de um espinho lateral caracteriza o ovo e facilita a sua identificação (REY, 2001, p.418). Ao entrar em contato com a água, em condições adequadas de luminosidade, temperatura e oxigenação, os ovos maduros eclodem liberando uma larva ciliada, denominada miracídio. Essa larva nada ativamente sendo atraída por substâncias liberadas pelo molusco que se constitui o seu hospedeiro intermediário (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Após a penetração nas partes moles do molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas. É formado então, em 48 horas, um saco repleto de células germinativas, através da reorganização de células remanescentes. Esse saco é o esporocisto. Os esporocistos primários geram os secundários ou esporocistos filhos e as células germinativas, desse último, são transformadas em cercárias (KATZ; ALMEIDA, 2003). O contato com a água contaminada por cercárias é o fator de predisposição necessária para que ocorra a infecção humana (SILVA et al., 2013).

A figura 3, abaixo, representa o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

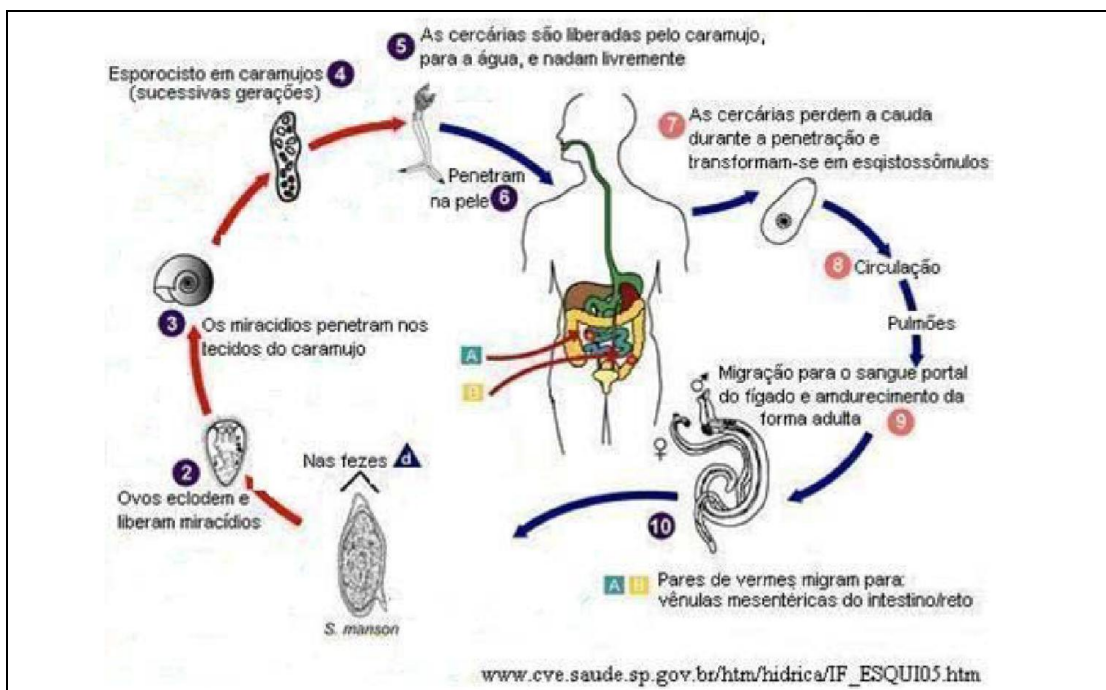


Figura 3- Esquema do ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*.

Fonte: CDC modificado por Fiocruz.

### 2.3 DIAGNÓSTICO E PATOGENIA

O diagnóstico pode ser realizado por meio de métodos diretos (exame de fezes, biópsias retal e hepática e pesquisa de antígenos circulantes dos parasitos) e indiretos (pesquisa de anticorpos circulantes no soro) (GRYSEELS et al., 2006). Os métodos de biópsia retal e hepática são cada vez menos utilizados por serem muito invasivos, são reservados para diagnósticos em condições muito especiais (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O método mais utilizado é o exame parasitológico laboratorial de fezes (método de Kato-Katz), onde pode ser constatada a presença de ovos do *S.mansoni* nas fezes do paciente. Este método é o mais recomendado pela OMS por ser o mais sensível, de fácil execução, além de ser o mais preciso qualitativa e quantitativamente. De acordo com Gryseels (2012), as medidas quantitativas são importantes para avaliar a carga parasitária e inferir sobre o risco de morbidade.

Outro método para o diagnóstico da esquistossomose são os testes sorológicos baseados em anticorpos. Apresentam boa sensibilidade, mas pode ocorrer reação cruzada com outras infecções, adicionalmente os níveis de anticorpos permanecem elevados mantendo positivo por muito tempo após a infecção ativa ter desaparecido. A principal aplicação médica deste método é

em trabalhos de campo, sendo mais úteis por diagnosticar a esquistossomose aguda quando o exame microscópico ainda é negativo (CLERINX; VAN GOMPEL, 2011; GRYSEELS, 2012).

Como as manifestações clínicas estão relacionadas com a fase de desenvolvimento do parasito no hospedeiro, dependendo da intensidade do parasitismo, a maioria dos indivíduos infectados pode permanecer assintomáticas. A progressão natural da doença também está relacionada com a espécie do parasito, sendo mais rápida em pacientes infectados por *S. japonicum* do que naqueles infectados por *S. mansoni* (SILVA et al., 2013).

A patogenia da esquistossomose mansônica e sua evolução crônica dependem de vários fatores como a cepa do parasito, a idade, o estado nutricional, a imunidade do hospedeiro e, principalmente, a carga parasitária (quantidade de parasitos que infectou o paciente). Sendo assim a doença tem uma evolução com gravidade variável (SILVA, DA et al., 2013).

A infecção pode ser dividida em duas fases distintas: a fase pré patente tem início com a invasão cercariana e termina quando a postura de ovos é iniciada e a fase patente que coincide com a produção de ovos e pode ser dividida em esquistossomose aguda e crônica (SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005). A fase inicial é estabelecida quando ocorre a penetração das cercárias na pele e presença de esquistossômulos no local, causando então a dermatite cercariana (GRENFELL et al., 2013).

A esquistossomose aguda sintomática pode aparecer de 3 a 7 semanas após a exposição e é caracterizada por tosse, febre, anorexia, dor abdominal, dor de cabeça, e hipereosinofilia. Nesta fase quando a reação inflamatória está bem estabelecida envolvendo predominantemente Th1 tendenciosa e elevados níveis de imunoglobulina no soro (LAMBERTUCCI, 2010). A fase aguda tardia ocorre após 40 a 90 dias após a infecção, e é caracterizada pela postura de ovos e uma resposta inflamatória predominantemente Th2. Suas manifestações clínicas variam de acordo com a carga parasitária e resposta imune do hospedeiro quando a fase crônica é estabelecida (GRENFELL et al., 2012).

A fase aguda raramente é observada em populações endêmicas, esse fato se justifica pela exposição ambiental inicial de crianças com idade precoce (de 2 a 4 anos) e pelo fato de muitas crianças de áreas endêmicas provavelmente terem nascido de mães que tiveram esquistossomose durante a gravidez, adquirindo, portanto, anticorpos através do aleitamento materno. Indivíduos que visitaram áreas endêmicas recentemente são mais propensos a apresentarem os sintomas agudos por não terem tido contato anterior com o parasito (CALDAS et al., 2008).

A forma crônica da doença (fase tardia) começa a partir do 4º mês após a infecção e pode durar vários anos (SILVA et al., 2013). Nessa fase a doença pode se apresentar em formas como hepatointestinal, hepática, hepatoesplênica compensada e hepatoesplênica descompensada, que

são caracterizadas por inflamação granulomatosa, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e eosinofilia (CALDAS et al., 2008; SILVA et al., 2013). A maioria dos portadores da doença que residem em áreas endêmicas é assintomática nessa fase, porém em alguns há progressão dos sinais da doença em diferentes órgãos como fígado e baço, incluindo desenvolvimento de fibrose periportal do fígado, resultando na forma grave da doença. Nesse estágio da doença o paciente pode ter hipertensão portal, esplenomegalia, varizes esofágicas e hematêmese recorrente.

## 2.4 CONTROLE

A esquistossomose ainda continua sendo um sério problema de saúde pública, mesmo com diagnóstico e tratamento definidos. O medicamento utilizado para o tratamento leva ao controle da morbidade, impedindo a evolução da doença para a fase crônica, porém é necessário que haja um controle da transmissão, que visa interromper o ciclo evolutivo do parasito e, conseqüentemente o surgimento de novos casos.

O controle da transmissão está ligado diretamente à ações de órgãos governamentais, como o saneamento básico, instalação de água e esgoto nas casas, mudanças no meio ambiente, educação sanitária, combate aos caramujos, além do diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A ampla difusão dos hospedeiros intermediários; a freqüência do contato humano com a água em atividades de trabalho agrícola, doméstico e/ou por lazer; a falta de água potável; as limitações do tratamento individual e em massa e à escassez de abordagens preventivas associadas às ações curativas nos serviços de educação e saúde são fatores que dificultam o controle da esquistossomose (GRIMES et al., 2014).

Medidas complementares para o controle da esquistossomose estão relacionadas a ações voltadas para o hospedeiro intermediário em áreas com alta prevalência. As seguintes ações podem ser consideradas: pesquisa de campo em coleções hídricas para determinar o potencial de transmissão, elaborar medidas de saneamento ambiental para dificultar a proliferação e desenvolvimento dos caramujos, bem como evitar a contaminação dos recursos hídricos por homens infectados com ovos de *S. mansoni*. É importante também o tratamento químico da água em que caramujos estiverem presentes, ou o controle biológico com a introdução de espécies competitivas na coleção hídrica (SILVA et al., 2013).

Outra medida relevante é a identificação de indivíduos infectados em áreas endêmicas através de exames de fezes a cada dois anos, deve ser feito o tratamento desses indivíduos para diminuir a carga parasitária e controlar a disseminação da doença (SILVA et al., 2013).

A educação para a saúde é fundamental para as pessoas que vivem em áreas endêmicas. Devem-se desenvolver estratégias e materiais educativos adequados às realidades locais e formar pessoas capazes de estimular o compartilhamento de informações formais e não formais para colaborar com a divulgação e reflexão sobre as formas de transmissão, prevenção e tratamento da doença, buscando assim uma mudança de comportamento das comunidades ( KATZ; ALMEIDA, 2003; SILVA et al., 2013).

No trabalho de Tlamçani; Er-Rami, (2014), do Marrocos, ressalta-se o implemento de estratégias de controle como: triagem de pessoas infectadas e tratamento quimioterápico, eliminação do hospedeiro intermediário, educação e comunicação a fim de evitar a contaminação da água e prevenção da infecção da população por meio de saneamento e higiene, que foram bem estabelecidas em três fases; fase de controle, eliminação e consolidação e conseguiram reduzir a prevalência da infecção a zero absoluto.

Podemos dizer que as estratégias de controle podem ser eficazes desde que sejam bem estabelecidas e tenham o apoio dos órgãos governamentais juntamente com os programas de controle dos países.

## 2.5 AÇÃO CURATIVA x PROFILÁTICA OU SUPRESSORA

Diversas drogas já foram indicadas para o tratamento da esquistossomose desde 1918, porém muitas delas não são usadas mais, algumas delas são tártaro emético, compostos antimoniais trivalentes, lucantone, niridazol e hicantone (HOTEZ et al., 2007). Em pacientes infectados por *Schistosoma*, é indicado o tratamento antiparasitário para todos, e o medicamento atua na cura da infecção (SILVA et al., 2013).

Os medicamentos disponível no mercado brasileiro utilizados para o tratamento é o praziquantel. Ele possui boa eficácia, em torno de 80%, é bem tolerado e possui baixa toxicidade.

A oxaminiquina (OXA) já foi muito utilizada para o tratamento da esquistossomose também, porém seu uso foi descontinuado, pois esse fármaco tem alto custo e possui eficácia somente contra a espécie *Schistosoma mansoni*, portanto seu uso foi reduzido pela substituição do PZQ (PICA-MATTOCCIA et al., 2006).

O Praziquantel (PZQ) (FIGURA 4) foi descoberto em 1972 na Alemanha como resultado da pesquisa realizada pelas indústrias E. Merck e Bayer A. G e em 1978, o PZQ foi sintetizado na China. É um anti-helmíntico pertencente à classe das pirazinoisoquinolonas que foi introduzido no tratamento da esquistossomose (CIOLI et al., 2014). Caracteriza-se por ser um pó branco cristalino, de sabor amargo praticamente insolúvel em água (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

Ele encontra-se disponível em formas farmacêuticas de 600 mg, sendo administrado em dose única de 50 mg/kg para adultos e 60 mg/kg para as crianças. Os efeitos colaterais são leves, como cefaléia leve, vertigem, náuseas, diarreia e dor abdominal, e não há nenhuma evidência de efeitos tóxicos graves (GRYSEELS et al., 2006). Ele atua no organismo nos dois primeiros dias após a penetração da cercaria. Após este tempo, e por um período de aproximadamente quatro semanas, o PZQ não é mais efetivo e então os parasitos podem continuar seu desenvolvimento, progredindo a vermes adultos, podendo haver a eliminação de ovos de vermes que se desenvolveram após a administração do PZQ. Quando o tratamento é repetido, a eficácia do fármaco aumenta, indicando que os vermes imaturos são capazes de sobreviver à exposição ao PZQ (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; LIANG et al., 2010).

Dependendo do estágio da doença, as doses e o tempo de tratamento podem variar. Em pacientes de áreas endêmicas são recomendadas doses menores, pois o objetivo principal é redução da intensidade da infecção e do risco de morbidade. A patologia de órgãos geralmente diminui substancialmente dentro de semanas ou poucos meses após tratamento, podendo ser observado por radiografia ou exame ultra-sonográfico (GRYSEELS, 2012; SILVA, DA et al., 2013).

O mecanismo de ação do PZQ pode ser resumido em três etapas: influxo de cálcio, contração muscular e modificação na superfície do tegumento (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008). Mesmo com este conhecimento sabe-se que o mecanismo de ação do praziquantel não está totalmente claro, e isso impede o desenvolvimento de fármacos análogos (CIOLI et al., 2014). O fármaco paralisa e mata os vermes dentro de poucas horas, mas não mata os ovos e esquistossômulos e não evita a reinfecção. Essas desvantagens são significativas pois podem resultar em baixas taxas de cura em áreas onde a esquistossomose é hiperendêmica (OLIVEIRA et al., 2012).

Como o uso da OXA era limitado à América do Sul, onde há maior ocorrência da espécie *Schistosoma mansoni*, não houve competitividade no mercado farmacêutico, e o PZQ por ser eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, tornou-se mais lucrativo e houve redução no custo (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; DOENHOFF et al., 2009). O PZQ

é, portanto, indicado pela OMS devido ao baixo custo, a alta eficácia, a segurança, a facilidade de distribuição; e ele ainda é eficaz contra outros trematódeos e cestódeos, importante para áreas onde ocorre o poliparasitismo. Todas essas vantagens tornam o PZQ o melhor medicamento para o tratamento de populações endêmicas. O que deixam os pesquisadores em alerta é o fato do PZQ não ser eficaz contra formas jovens de *S. mansoni* e a forma continuada, indiscriminada, de sua utilização nas regiões de endemia geram conseqüências como a seleção de cepas resistentes, fazendo-se necessário o estudo de fontes alternativas de protótipos de candidatos a fármacos.

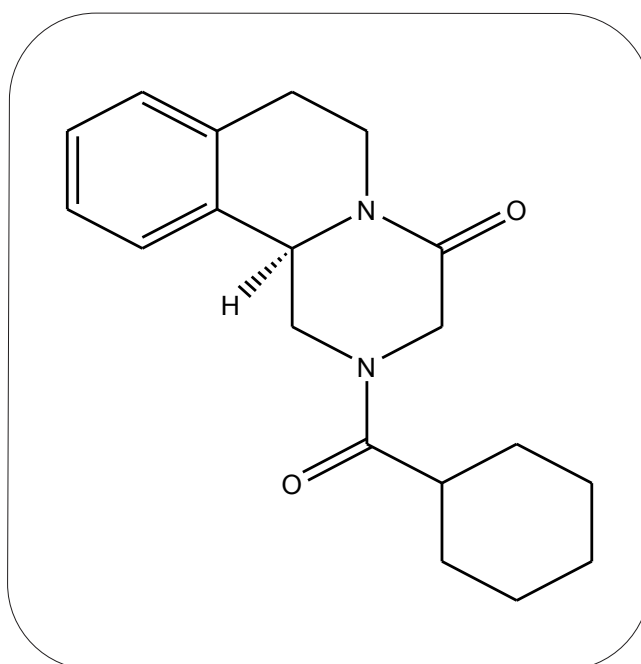


Figura 4- Estrutura química do Praziquantel.  
Fonte : DOENHOFF, CIOLI, UTZINGER, 2008.

## 2.6 RESISTÊNCIA

Pesquisadores acreditam que o PZQ, assim como outros medicamentos num futuro próximo terá seu uso limitado com a seleção de cepas resistentes. Trabalhos a cerca deste assunto têm surgido, e acredita-se que é preciso propor soluções para tal fato (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

Alerta sobre a seleção de parasitos resistentes surgiu no Senegal e Egito. No Senegal a taxa de cura reportada em pacientes após tratamento com dose oral recomendada foi muito baixa, de 18

a 36%, quando o esperado era de 60 a 90%. No Egito foram encontrados ovos viáveis nas fezes de pacientes tratados, após tratamentos consecutivos, em testes laboratoriais (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

Há especulação sobre a característica da resistência ser de caráter genético dominante, que tem uma dimensão mais ampla ao se pensar que a resistência pode ser expressa em todos os estágios de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* (QI; CUI, 2013). No intuito de investigar tal fato vem sendo feitos estudos sobre a estabilidade genética e dinâmica das populações com infecção de *Schistosoma mansoni*, porém ainda não há esclarecimento sobre tal hipótese (BLANK et al., 2010; BLANTON et al., 2011; PICA-MATTOCCIA et al., 2009).

Em laboratórios, por meio da pressão sucessiva ao PZQ foram isoladas cepas resistentes e sensíveis ao PZQ (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; WANG; WANG; LIANG, 2012). No trabalho de Mwangi et al. (2014), foram usados miracídeos obtidos das fezes de lavradores do Kenya portadores da infecção com parasitos com baixa sensibilidade ao PZQ para infectar caramujos *Biomphalaria* e as cercárias provenientes foram usadas para infecção dos camundongos; após cinco passagens com administração de dose crescente de PZQ conseguiu-se obter parasitos com reduzida sensibilidade ao PZQ, comprovando que a pressão do fármaco pode levar à resistência. A indução de resistência a caramujos foi demonstrada no trabalho de (COUTO et al., 2011), e no trabalho de Couto et al. (2010), a diminuição da sensibilidade ao PZQ é comprovada com o uso de sondas fluorescentes.

Há relatos de viajantes que adquiriram a infecção em áreas endêmicas e ao voltar para áreas não endêmicas, não conseguiram curar a infecção (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

Como os mecanismos de ação do PZQ ainda não estão totalmente elucidados, há dificuldade também de estudar os mecanismos de resistências, e estes, portanto continuam sendo especulados, sem afirmações claras (CIOLI et al., 2014; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; WANG; WANG; LIANG, 2012). O que se pode afirmar é que há alguns indícios que apontam para o desenvolvimento da resistência como o tratamento com doses subcurativas, frequência de tratamento principalmente nas regiões endêmicas, e alteração da dosagem utilizada. É necessário um monitoramento adequado da qualidade do medicamento e acompanhamento de novos indícios de desenvolvimento de resistência pelos programas de controle da doença (DOENHOFF et al., 2009).

Tais fatos incentivaram novos estudos em busca de terapias alternativas que podem substituir ou complementar a utilização de PZQ no tratamento da esquistossomose mansônica (DOENHOFF et al., 2009; PICA-MATTOCCIA et al., 2009).

Ainda, a utilização racional de fármacos e a administração de associações dos mesmos são maneiras alternativas de prevenir a ocorrência de resistência (ARAUJO et al., 2008a).

## 2.7 PLANTAS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

A esquistossomose é alvo de grandes preocupações atualmente, pois devido a falta de vacina disponível comercialmente, a terapia do paciente é fortemente dependente da quimioterapia com PZQ, como a OMS recomenda. Mas alertas sobre a resistência ao fármaco e possível recorrência da infecção incentivam a busca por novos protótipos de fármacos, possivelmente a partir de recursos naturais (ABDEL-HAFEEZ et al., 2012; MANTAWY; ALI; RIZK, 2011).

Segundo Wink (2012), as plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários com atividades biológicas interessantes, como propriedades citotóxicas, anti-parasitárias e anti-microbianas. Estas drogas interferem frequentemente em alvos centrais nos parasitos, tais como DNA (intercalação, alquilação), integridade da membrana, microtúbulos e sinal de transdução neuronal.

Os principais compostos identificados dos extratos de diferentes polaridades incluem: diterpenos, lactonas, sesquiterpenos, flavonóides, saponinas, taninos e polifenóis apresentados por SOUSA et al. (1991 citado por OLIVEIRA et al., 2012).

De acordo com Mantawy et al. (2011), um dos primeiros exemplos documentados de plantas utilizadas para a manutenção da saúde e tratamento de diversas doenças é o alho, portanto há um interesse nos benefícios potenciais desta planta desde a antiguidade. Tem sido relatado que o alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*) são utilizados em todo o mundo com aplicação para diferentes doenças, como infecções, lesões, disfunções gastrointestinais e doenças cardiovasculares. O tratamento com óleos de alho ou cebola normalizou a função de enzimas hepáticas e melhorou a capacidade antioxidante da infecção por *S. mansoni*, com uma redução significativa da carga de vermes e número de ovos. O autor concluiu que o tratamento com esses agentes podem atuar melhorando o sistema imunológico do hospedeiro (MANTAWY; ALI; RIZK, 2011).

Trabalhos com a artemisinina e seus derivados já demonstraram eficácia, possuindo excelentes propriedades contra malária (WHITE, 2008). Ensaios com a mesma planta mostraram que ela também é eficaz contra todas as espécies de esquistossomose humana (ABDUL-GHANI et al., 2011; KEISER; VARGAS; DOENHOFF, 2010; LI et al., 2012; UTZINGER et al., 2011).

Estudos detalhados *in vivo* revelaram que esquistossômulos são susceptíveis a artemisinina, e que uma redução moderada de vermes adultos também pode ser observada. (LI et al., 2012; UTZINGER et al., 2011; XIAO; CATTO, 1989). Uma vantagem da artemisinina sobre o PZQ é sua capacidade para evitar a reinfeção, uma vez que provou ser muito eficaz na indução de resistência de alto nível contra o *S. mansoni* em camundongos (EL-BESHBISHI et al., 2013). Além disso, a artemisinina é de origem vegetal e provou ser segura em humanos (EL-BESHBISHI et al., 2013).

A espécie *Baccharis trimera*, pertence à família Asteraceae, é conhecida pelo nome popular de carqueja, e é nativa das regiões sul e sudeste do Brasil. A infusão das partes aéreas desta planta é vastamente utilizada na medicina popular para o tratamento de reumatismo, diabetes, disfunções hepáticas, inflamatórias processos, angina e má circulação sanguínea. As plantas desta família são extensivamente estudadas quanto sua composição química e atividade biológica, como para efeitos antimicrobianos e anti-inflamatório, e algumas delas já têm sido usadas no desenvolvimento de drogas, inseticidas e outros produtos (VERDI et al., 2005). Ensaios *in vitro* do óleo essencial desta mesma espécie realizados por De Oliveira et al. (2012), mostraram uma significativa diminuição da motilidade dos vermes e uma taxa de mortalidade de 100%, 30h depois de terem sido expostos ao óleo essencial na concentração de 130 µg/mL. No que se refere às alterações morfológicas, o óleo essencial de *B. trimera* induziu uma descamação na superfície do tegumento, bem como a destruição de tubérculos e as espinhas, o que resultou em zonas lisas da superfície do corpo. Nas fêmeas além da destruição do tegumento, houve também destruição das ventosas orais e acetabular.

A piplartina é um amido encontrado em diversas plantas do gênero *Piper* (família Piperaceae). As espécies de *Piper* são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do país e a piplartina é encontrado em várias partes das plantas, especialmente na raiz. Várias atividades biológicas de piplartina foram exploradas tais como agentes antitumorais, propriedades antinociceptivas, antidepressivos e ansiolíticos, bem como a agregação antiplaquetária, insecticidas, antifúngicas, antiparasitárias e propriedades esquistossomicidas. O efeito da piplartina isoladas de *Piper tuberculatum* contra esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada *in vitro*, e os resultados revelaram que piplartina é um composto eficaz contra larvas (causando a morte destas), e vermes adultos de *S. mansoni*, provocando destruição tegumentar extensa (MORAES et al., 2011).

## 2.8 *Senna spectabilis*

O gênero *Senna* possui cerca de 600 espécies distribuídas no mundo, e é alvo de muitos estudos devido ao reconhecimento de sua grande diversidade biológica e propriedades farmacológicas (ALBUQUERQUE MELO et al., 2014; SILVA et al., 2010, 2011a). *Senna spectabilis* (FIGURA 5) é uma árvore de médio a grande porte pertencente à família Fabaceae, endêmica na América Central, América do Sul e África, comumente encontrada nos países africanos tropicais e subtropicais, Colômbia e Brasil (JOTHY et al., 2012; SILVA et al., 2010b, 2010c).

No Brasil esta planta é conhecida popularmente por “canafístula de besouro” e “cássia-donordeste”, empregada principalmente para paisagismo por sua característica de porte médio e à exuberância de suas flores. Na região do nordeste brasileiro esta espécie é usada como forrageira para ovinos e caprinos tendo em vista seu alto valor nutricional, servindo de recurso alternativo na época da seca (ALBUQUERQUE MELO et al., 2014; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2010c).

Ela é bastante difundida na medicina popular, utilizada como laxante, analgésico, anti-inflamatório e antiulcerogênico (PIVATTO et al., 2005; VIEGAS et al., 2004).

O gênero *Senna* se diferencia quimicamente pela ocorrência de alcaloides piperidínicos tipo alcaloides 2,6-dialquil-piperidin-3-óis, raros na natureza (JUNIOR et al., 2006). Estes alcaloides têm sido isolados das folhas, flores e frutos de *Senna*, tais como (-)-cassina e (-)-espectralina, que são os constituintes majoritários, além da 3-*O*-acetilespectralina, 7-hidroxispectralina, iso-6-espectralina, dentre outros (SRIPHONG et al., 2003; VIEGAS et al., 2004, 2007). Tais substâncias atualmente recebem atenção especial no que diz respeito a planejamento de novos fármacos por serem consideradas substâncias híbridas carboidrato-lipídicas (SILVA et al., 2010a; TAKAHATA et al., 2003).

O extrato etanólico desta planta, assim como algumas frações de extrato e alcaloides isolados das folhas, flores e frutos apresentaram atividades sedativa e anticonvulsivante (SILVA et al., 2011a), antimicrobiana e antioxidante (JOTHY et al., 2012), antiinflamatória (SILVA et al., 2012), e principalmente atividades relacionadas ao sistema nervoso central (OLIVEIRA SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2010a).

Em relação à atividade antiparasitária, recentemente foi descrita a atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania major* de *S. spectabilis*. Entretanto ainda há poucos

estudos nessa área, sem informações conclusivas sobre o mecanismo de ação envolvido e ausência de ensaios *in vivo* (ALBUQUERQUE MELO et al., 2014).

Tendo em vista a importância de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco para o tratamento da esquistossomose e as diversas propriedades farmacológicas já descritas sobre a espécie *Senna spectabilis*, este trabalho tem por finalidade avaliar a atividade esquistossomicida do extrato total, frações do extrato e substâncias obtidas a partir das flores desta espécie.

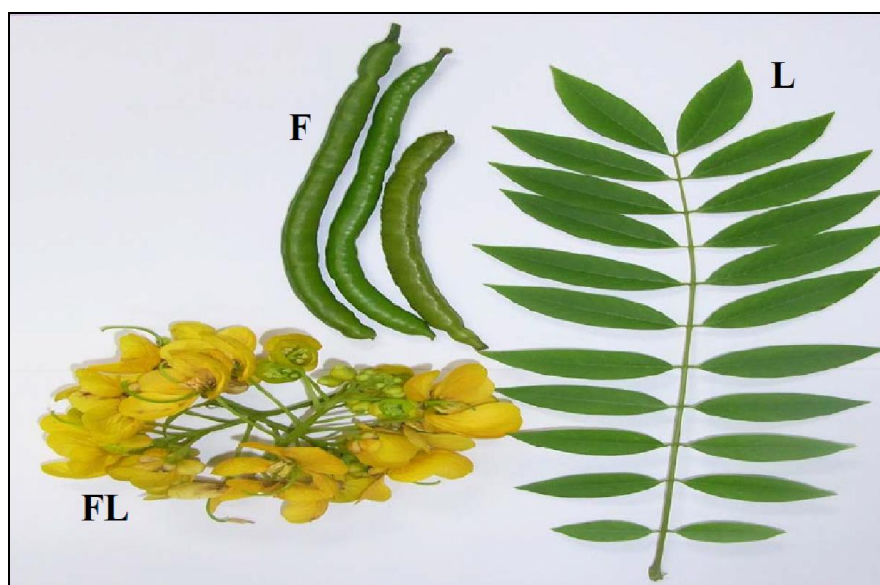


Figura 5- *Senna spectabilis*. FL: flores, F: frutos e L: folhas de *Senna spectabilis* (DC).  
Fonte: JOTHY, S.L. et al., 2012.

### 3 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos geral e específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade esquistossomicida do extrato etanólico, frações de extrato e dos alcaloides majoritários isolados a partir das flores de *Senna spectabilis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade *in vitro* do extrato, frações de extrato e da mistura de alcaloides (cassina/espectralina) obtidos das flores de *S. spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.
- b) Determinar dose letal de 50% (DL<sub>50</sub>), dose letal de 90% (DL<sub>90</sub>) e dose letal de 100% (DL<sub>100</sub>) das substâncias-alvo em vermes adultos de *S. mansoni*.
- c) Avaliar o efeito da associação *in vitro* de PZQ com a mistura de alcaloides (cassina/espectralina).
- d) Avaliar danos causados no sistema excretor e tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*, pelo uso de sondas (marcadores moleculares).
- e) Avaliar o efeito cercaricida da mistura de substâncias (cassina/espectralina) *in vitro*.
- f) Determinar a concentração citotóxica com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir será descrita a metodologia utilizada neste trabalho.

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (flores de *S. spectabilis*) foi coletado na região de Araraquara-SP, em janeiro de 2013. A exsicata está depositada no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo sob registro SP 370.917.

### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DA PLANTA E ISOLAMENTO

As flores de *S. spectabilis* foram secas em estufa a 40°C durante 24h, seguido de moagem. O material vegetal foi então submetido à maceração em EtOH por 7 dias. A cada dois dias o extrato foi filtrado e concentrado e, ao material sólido residual, foi adicionado mais 3L de solvente. Ao final, todo o extrato etanólico foi concentrado, redissolvido em MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2), e particionado, sucessivamente, com hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOAc. A fração solúvel em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, que sabidamente continha a maior concentração de alcaloides, foi concentrada, obtendo-se 39 g de material bruto. Esta fração bruta foi redissolvida em 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e extraída com HCl aquoso a 40% (3x50 mL); as frações aquosas combinadas foram ajustadas a pH 9 usando NH<sub>4</sub>OH concentrado. A solução aquosa básica resultante foi exaustivamente extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seca sobre MgSO<sub>4</sub> seco, e concentrada, fornecendo 9g de uma fração alcaloídica bruta. Esta porção alcaloídica então submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica (CC) de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutra, eluída com gradiente de EtOH/CHCl<sub>3</sub>/hexanos (1:7:2), fornecendo uma mistura dos alcaloides piperidínicos (-)-cassina/(-)-espectralina (4,82 g, FIGURAS 6 e 7), além de uma mistura complexa de outros metabólitos alcaloídicos mais polares.

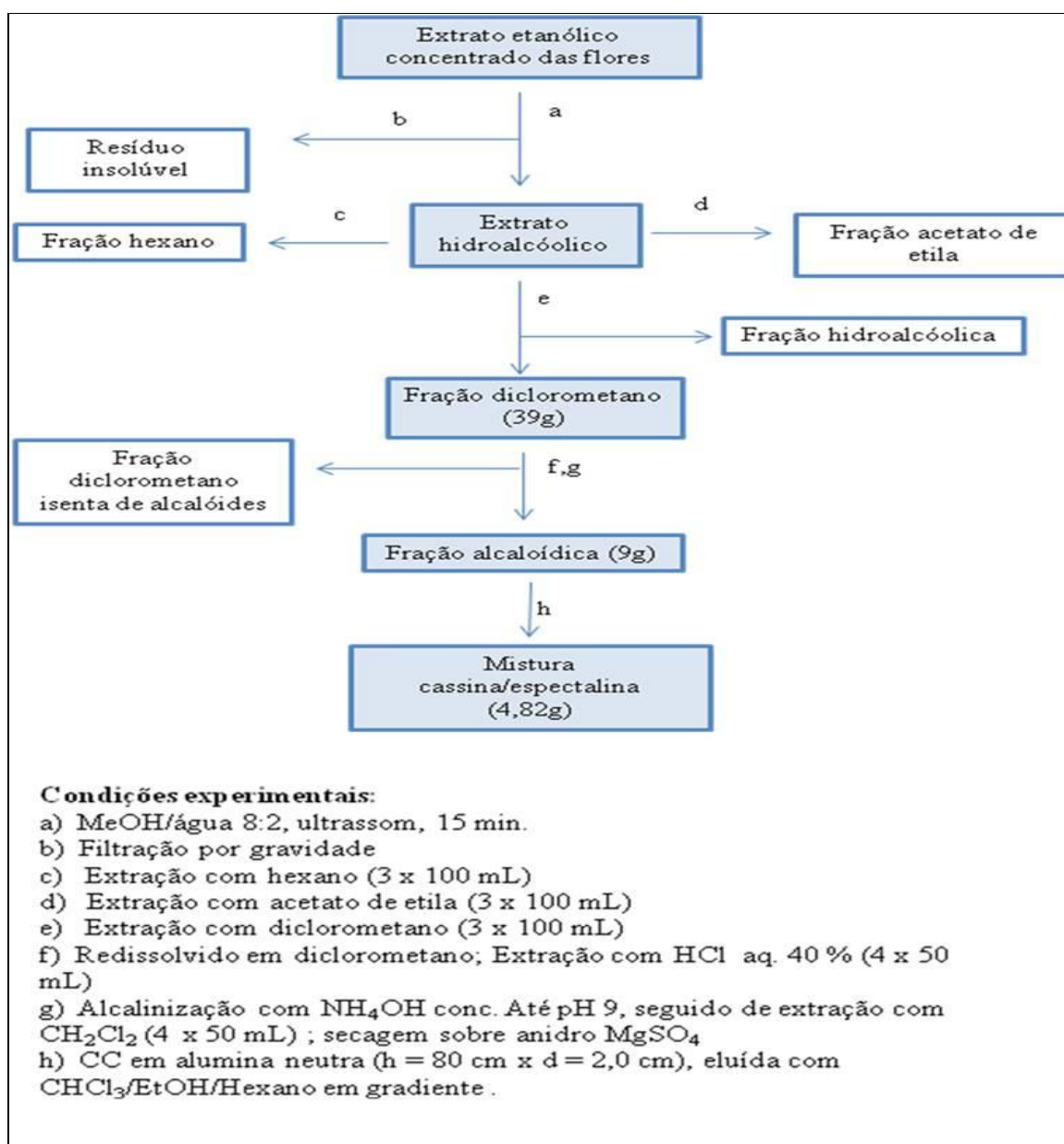


Figura 6- Esquema de isolamento da mistura de alcaloides cassina/espectralina.

Fonte: Da autora.

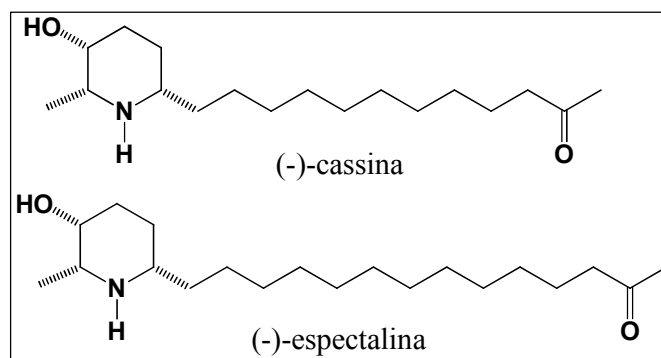


Figura 7- Estrutura molecular das substâncias (-)-cassina e (-)-espectralina.

Fonte: Viegas, C. et al., 2004.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ENTRE (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A fim de se determinar a proporção de (-)-cassina e (-)-espectralina na mistura pura obtida por CC, uma pequena alíquota foi analisada por espectrometria de massas. A amostra foi dissolvida em AcCN (grau HPLC, J. T. Baker-EUA) na concentração de 1 mg/mL e 10  $\mu$ L dessa solução foi injetada diretamente em equipamento de Cromatografia Líquida UFLC (Proeminence-MS 8030, Shimadzu). A análise foi feita por ionização por *electrospray* (ESI), em analisador do tipo triplo quadrupolo. O experimento realizado foi o *scan* total da amostra de 100-1000  $m/z$  com voltagem (*inface* e agulha de ionização) de 4,5 kV. A abundância relativa de (-)-cassina e (-)-espectralina na amostra foi determinada por comparação intensidade absoluta dos picos dos seus respectivos íons de 298,20 e 326  $m/z$ . Não foi necessária análise cromatográfica, sendo que a amostra estava pura e composta somente por estas duas substâncias, que apresentam padrões de fragmentação conhecidos (PIVATTO et al., 2005). Além disso, elas apresentam os mesmos sítios de ionização e, portanto, o mesmo padrão de fragmentação.

#### 4.4 ENSAIOS ESQUISTOSSOMICIDAS

A seguir será descrito a metodologia utilizada para os ensaios esquistossomicidas.

#### 4.4.1 Parasitos e camundongos

A cepa LE (Luiz Evangelista) de *Schistosoma mansoni* é rotineiramente mantida por passagens em série em modelos *Biomphalaria glabrata* e camundongos da linhagem swiss. Esta cepa vem sendo mantida durante mais de 30 anos no Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) e do CEUA da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob número de registro 544/2013.

#### 4.4.2 Acondicionamento e infecção dos caramujos

Os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram mantidos em laboratório dentro de um aquário com água corrente e boa oxigenação, apresentando pH entre 7,2 a 7,8 e isenta de cloro, cobre ou zinco. A linhagem da espécie citada é susceptível às cepas de *Schistosoma mansoni*, mantidas em laboratório.

A infecção desses moluscos, como rotina, foi realizada com 10 miracídios por caramujo, deixando-os juntos por algumas horas. As larvas (miracídios) do parasito foram obtidas a partir do fígado dos camundongos infectados de acordo com o método descrito por (KATZ; PELLEGRINO; PEREIRA, 1968).

Os caramujos foram transferidos para uma estufa para serem mantidos a 28°C. Após 30 dias, os caramujos foram colocados individualmente em beakers de vidros com água e expostos à iluminação artificial para a eliminação de cercárias (KATZ; PELLEGRINO; PEREIRA, 1968).

#### 4.4.3 Infecção dos camundongos e obtenção dos parasitos

Camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade pesando em média 20g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos

em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água, em todo experimento.

As cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa LE (Belo Horizonte), usadas para infecção dos camundongos foram fornecidas pelo moluscário do CPqRR.

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único becker, originando um “pool” de cercárias LE provenientes de caramujos. De cada becker foi retirado uma alíquota de aproximadamente 0,3 mL para a contagem com auxílio de uma lupa. As alíquotas foram ajustadas a fim de se obter uma concentração equivalente a 100 cercárias, em um volume de 0,3 mL.

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Katz, Pellegrino e Pereira (1968).

Camundongos com quarenta e cinco dias de infecção foram submetidos a eutanásia por “overdose” de cloridrato de cetamina 10,0% (Ketamina Agener) e cloridrato de xilazina 2,0% (Rompun) dissolvidos em solução salina, administrado por via intraperitoneal ( $\pm$  0,2 mL por animal). Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos por meio da perfusão retrógrada do fígado, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965): posteriormente à exposição das vísceras abdominais e do coração, a veia porta foi seccionada, na altura dos rins, com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa. Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração foi injetado meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,2%), obtendo-se assim, os parasitos que foram lavados cuidadosamente com RPMI-1640.

#### 4.4.4 Avaliação *in vitro* do extrato, frações do extrato e mistura de alcaloides cassina/ espectralina obtidos das flores de *Senna spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os parasitos recuperados foram levados para capela de fluxo laminar, lavados mais uma vez com o meio de cultura RPMI-1640 estéril e, em seguida foram cultivados em placas de cultura de seis poços (quatro casais por poço) em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5,0 % soro fetal bovino inativado pelo calor e 1,0 % de penicilina e (10000 IU/mL) e estreptomicina (10,0 mg/mL) (Sigma, EUA), conforme representado na (FIGURA 8).

Após um período de 30 minutos de adaptação, as amostras (extrato etanólico, frações acetato de etila e diclorometano e mistura de substâncias cassina/espectralina de *S.spectabilis*)

foram adicionadas às culturas em diferentes concentrações. O extrato etanólico e a fração acetato de etila foram testados nas concentrações de 150,0; 100,0; 75,0; e 50,0 µg/mL e a fração diclorometano e a mistura (cassina/espectralina) foram testados nas concentrações de 150,0; 100,0; 75,0; 50,0; 40,0 e 30,0 µg/mL. Como controle, foi utilizado PZQ (2,0 µg/mL), meio de cultura suplementado, e o solvente usado para dissolver as amostras, (metanol a 1%v/v) Após adicionar os compostos, as placas de cultura foram levadas para estufa a 37°C e 5,0% de CO<sub>2</sub>, e analisados após 2 horas e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas os poços foram lavados, para retirar as amostras do contato com os parasitos, por meio da remoção do meio de cultura dos poços (2 mL) e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por cinco vezes (ou até perceber que os compostos foram retirados, por meio da observação da coloração do meio). Cada poço foi observado após 2 e 24 horas de contato com as amostras, e após a lavagem, por mais 7 dias diariamente para avaliar se os parasitos iriam recuperar após retirá-los do contato com as amostras, comparado - os com os controles. Os testes foram realizados em triplicatas e as observações foram documentadas. As culturas foram analisadas utilizando microscopia invertida (Microscópio Nikon Eclipse TS 100, aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x). Os parasitos foram avaliados e comparados aos controles, quanto a quantidade de parasitos acasalados, movimentação, contração/encurtamento, morfologia, desprendimento de tegumento e ovoposição.

A determinação da DL<sub>100</sub> (dose letal para 100% dos vermes), da DL<sub>90</sub> (dose letal para 90% dos vermes) e DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% dos vermes) foram realizadas pelo programa de computador GraphPadPrism (versão 5.0).

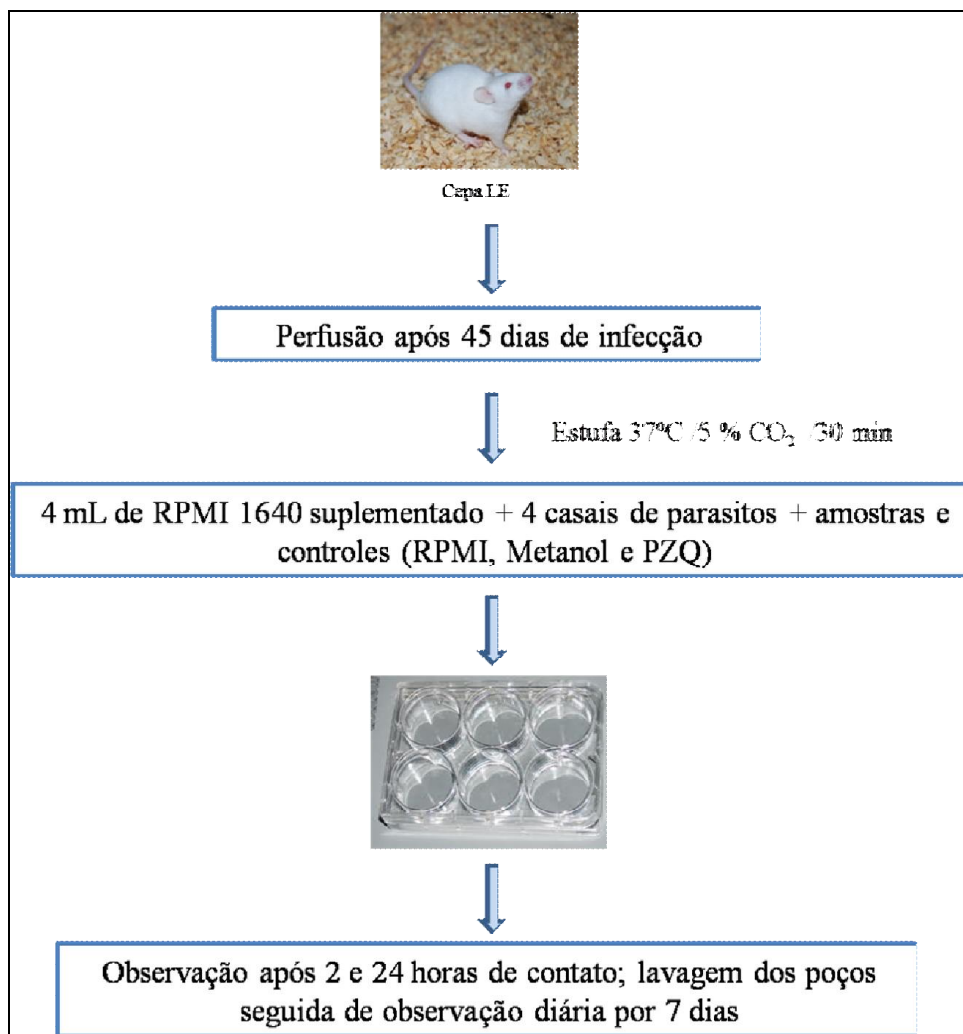


Figura 8- Esquema de obtenção dos parasitos e montagem de placas.  
Fonte: Da autora.

#### 4.4.5 Avaliação *in vitro* do efeito cassina/espectralina em associação com o PZQ sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Após um período de 30 min de adaptação, as amostras (cassina/espectralina solubilizados em metanol em uma concentração de 5,0 mg/mL e PZQ solubilizado em RPMI-1640 em uma concentração de 0,8 mg/mL) foram adicionados as culturas seguindo o esquema PZQ/mistura cassina e espectralina nas seguintes proporções  $\mu\text{g/mL}$ : 0,5/23,8; 0,5/11,9; 0,5/6,0 e 0,25/23,8; 0,25/11,9; 0,25/6,0. Para o controle 10 poços foram usados; quatro contendo PZQ nas concentrações de 2,0; 0,5; 0,25 e 0,125  $\mu\text{g/mL}$ , quatro com a mistura de alcaloides

cassina/espectralina a 23,8; 11,9; e 6,0 µg/mL; um poço contendo somente o meio de cultura suplementado e o outro com metanol (que foi usado para solubilizar a mistura de alcaloides, na concentração de 23,8 µg/mL). As placas foram incubadas na estufa a 37°C e 5,0% de CO<sub>2</sub>, e analisadas por duas horas e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas, os poços foram lavados, para que os compostos testes fossem retirados do contato com os parasitos.

Cada poço foi observado por 2 e 24 horas de contato com as amostras e após a lavagem prosseguiu com observação diária por 7 dias para avaliar a capacidade de recuperação dos vermes após retirá-los do contato com as amostras, comparando-os com os controles. Os parâmetros avaliados foram movimentação, acasalamento, contração /encurtamento, morfologia, desprendimento de tegumento e ovoposição. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

#### 4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE EXCRETORA E LESÃO DE TEGUMENTO DOS VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni* EXPOSTOS À MISTURA DE ALCALOIDES CASSINA/ESPECTALINA POR MEIO DE SONDAS FLUORESCENTES

Para avaliar o dano causado no sistema excretor e no tegumento do parasito, foram usadas as sondas resorufina e Hoechst 33258, respectivamente.

##### 4.5.1 Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes

Para avaliar o efeito da mistura cassina/espectralina sobre o funcionamento do sistema excretor e sobre a camada superficial do tegumento do verme adulto de *S. mansoni*, foram realizados experimentos utilizando dois marcadores fluorescentes (sondas) e microscopia de fluorescência.

A resorufina é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina), de natureza fluorescente e um modulador/substrato da P-glicoproteína (Pgp), utilizada por Sato et al. (2002).

A Hoechst 33258 (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) é uma sonda hidrofílica e fluoresce somente quando se liga ao DNA das células (COUTO et al., 2010).

#### 4.5.2 Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *Schistosoma mansoni* exposto à mistura cassina/espectralina após marcação com a sonda resorufina

Posteriormente à perfusão, os vermes adultos foram lavados e transferidos para placas de cultura de seis poços como descrito no item 4.4.4.

Foi adicionado em cada poço 10,0  $\mu\text{L}$  de resorufina (solução estoque a 10 mg/mL), e posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5,0 %  $\text{CO}_2$  por 30 minutos. Após este período, foram adicionados nos poços 10,0  $\mu\text{L}$  de metanol (controle negativo), solução estoque de PZQ, 0,8 mg/mL (controle positivo) e diferentes concentrações de uma solução estoque da mistura cassina/espectralina (40, 50 e 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo que um dos poços conteve apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado (controle negativo). Estas placas foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período, os parasitos foram lavados cinco vezes com meio de RPMI-1640 suplementado e preparados para a visualização no microscópio de fluorescência (FIGURA 9). Todos os testes foram realizados em triplicatas.

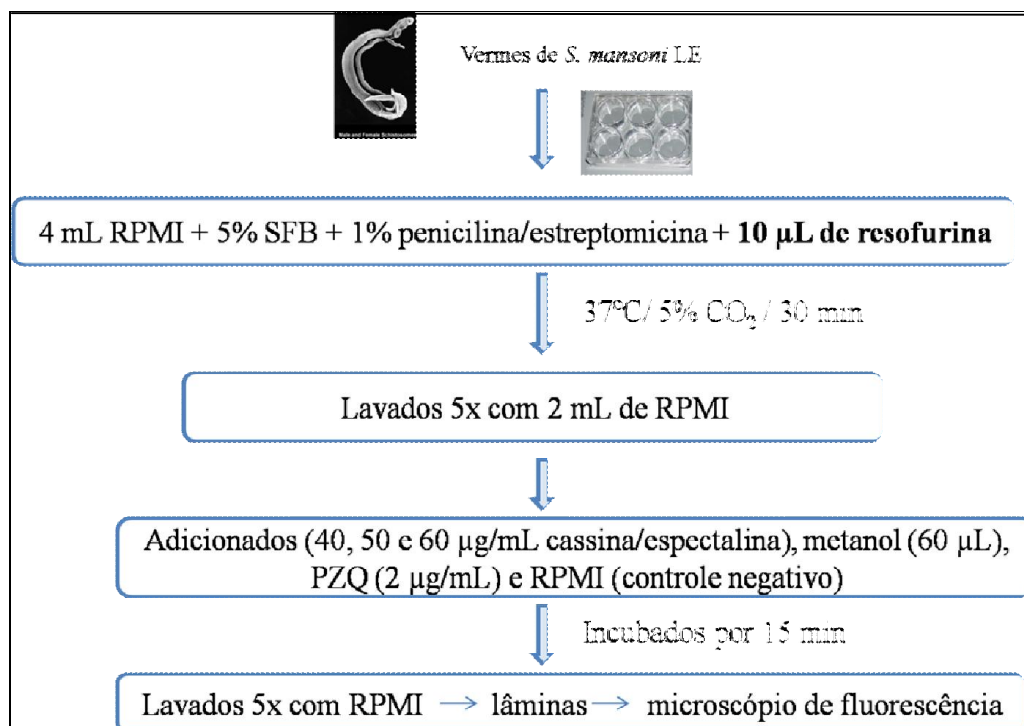


Figura 9- Esquema de marcação dos parasitos com sonda resorufina.

Fonte: Da autora.

#### 4.5.3 Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de *Schistosoma mansoni* exposto à mistura cassina/espectralina após marcação com a sonda Hoechst 33258

Seguiu o mesmo procedimento anterior após a perfusão, porém após colocar os parasitos na placa foram adicionados os compostos nos poços: 10,0  $\mu$ L de metanol (controle negativo), PZQ, 2  $\mu$ g/mL (controle positivo) e diferentes concentrações de uma solução estoque da mistura cassina/espectralina (40, 50 e 60  $\mu$ g/mL), sendo que um dos poços conteve apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C com 5,0 % CO<sub>2</sub> e fez-se a lavagem dos poços como descrito anteriormente. Foram adicionados 10,0  $\mu$ L de sonda Hoechst 33258 em cada poço, seguindo de incubação por 15 a 20 minutos. Após este período foi realizada a lavagem dos poços novamente e as lâminas foram preparadas para visualização no microscópio de fluorescência (FIGURA 10).

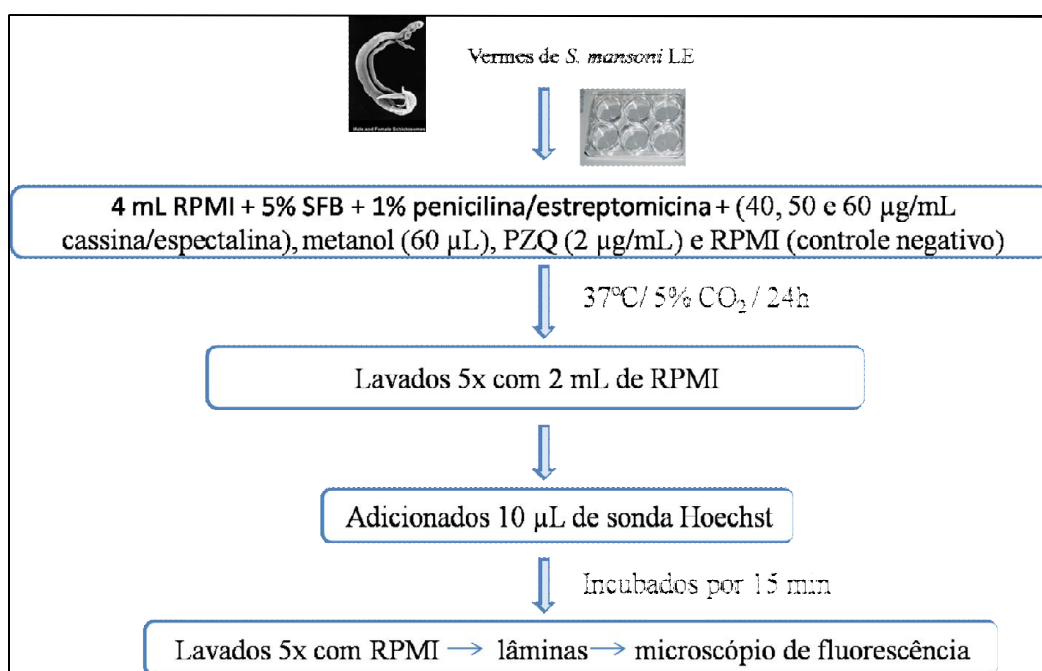


Figura 10- Esquema de marcação dos parasitos com sonda Hoechst.  
Fonte: Da autora.

#### 4.5.4 Microscopia de fluorescência (preparo das lâminas para leitura)

Ao final de cada experimento, os parasitos foram transferidos para lâminas delimitadas por pequenas quantidades de vaselina, a fim de evitar o extravasamento dos parasitos para fora da lâmina.

Os parasitos foram colocados nas lâminas com pequena quantidade de meio de cultura e em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (Zeiss Axio Scope A1, software Axio Vision LE) utilizando filtro Rodamina para resorufina e DAP para Hoechst 33258.

#### 4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA MISTURA CASSINA/ ESPECTALINA SOBRE CERCÁRIAS DE *Shistosoma mansoni*

*Biomphalaria glabrata* infectados foram induzidos a eliminar cercárias expondo-os à luz por uma hora, em água desclorada. Aproximadamente 30 cercárias (100,0 µL) foram colocadas em uma placa de 24 poços com 900,0 µL de água desclorada expostos a 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 150,0 µg/mL da mistura de alcaloides cassina/espectralina. Após 1, 2, 4, 6 e 8 horas, a motilidade, contração, e perda da cauda foram observadas utilizando microscopia invertida (LIANG et al., 2010; WANG; WANG; LIANG, 2012).

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas utilizando 1% de metanol e água desclorada como controle negativo e PZQ a 12,5 µg/mL como controle positivo.

#### 4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada utilizando um ensaio de MTT modificado, com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), obtidas a partir de voluntários saudáveis por meio de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, nº1077) por centrifugação de densidade gradiente.

O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente

proporcional ao número de células viáveis. Este teste foi primariamente sugerido por Mosmann (1983).

A suspensão de células de PBMC normais a uma concentração de  $6,8 \times 10^6$  células/mL foram distribuídas numa placa de 96 poços, 100  $\mu$ L de células em cada poço com 20  $\mu$ L de compostos testes e 180  $\mu$ L de meio RPMI, seguindo com diluição seriada e incubação a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Neste ensaio, as concentrações utilizadas foram de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91  $\mu$ g/mL do composto. Após o período de incubação, a morfologia das células dos poços de controle e de teste foram observadas ao microscópio. Posteriormente adicionou-se 10  $\mu$ L do corante MTT (5 mg/mL) por poço e as células foram incubadas novamente por mais um período de 4 horas (MOSMANN, 1983). Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado 100  $\mu$ L de DMSO por poço para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 15 min e a absorvância para cada amostra foi medida num leitor de micro placas espectrofotométrica a 570 nm. Os valores de absorvância obtidos a partir de células de controle não tratados, foram tomados como 100% viáveis (DIAS et al., 2012). Os dados foram analisados por regressão linear para obter os valores de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células).

#### 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPadPrism (versão 5.0). A regressão linear foi usada para obtenção do valor de DL<sub>50</sub>, 90 e 100. Diferenças significativas foram determinadas por meio da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* de comparações múltiplas com um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

A seguir serão descritos os resultados do trabalho.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO ENTRE (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA

No espectro de massas da mistura de (-)-cassina e (-)-espectralina (FIGURA 11) foi observado que estes dois alcaloides estão praticamente puros na mistura, sendo os fragmentos de 298,2 e 326,3 m/z atribuídos aos respectivos íons moleculares  $(M+H)^+$ . A análise do espectro confirmou dados anteriores (PIVATTO et al., 2005), em que a (-)-cassina é majoritária na mistura, numa proporção de 57% em relação à (-)-espectralina (TABELA 1). Portanto, todo o trabalho experimental foi conduzido com uma mistura de (-)-cassina e (-)-espectralina na proporção 57:43.

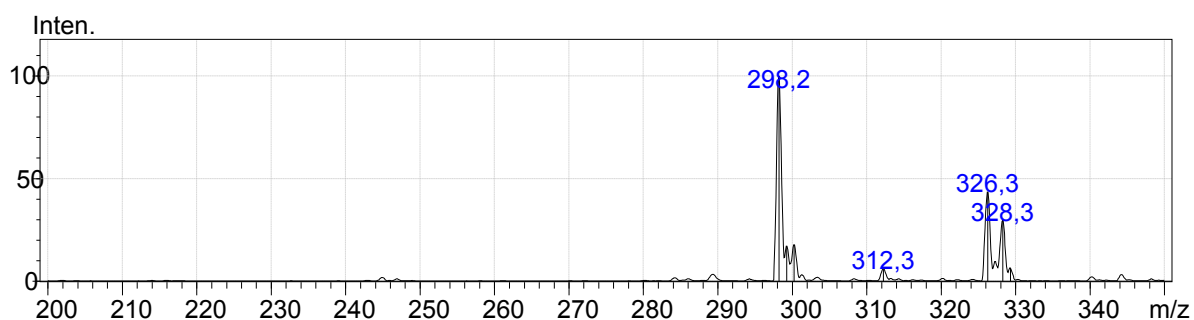


Figura 11- Cromatograma de íons totais da mistura de cassina e espectralina por injeção direta, utilizando acetonitrila como solvente (1 mg/mL).

Fonte: Da autora.

**Tabela 1:** Abundância relativa de (-)- cassina e (-)- espectralina na mistura, determinada por EM.

Substância	m/z	Intensidade absoluta	Intensidade relativa	Fragmento principal	Fragmentação	Padrão de fragmentação (Pivatto et al. 2005)
Cassina	298,20	15206026	100,00	[M+H] <sup>+</sup>	279,6; 108,8	280 [M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (Intensidade relativa 100), 109 não atribuído (Intensidade relativa 10)
Espectralina	326,25	6596588	43,38	[M+H] <sup>+</sup>	308,2; 141,0	308 [M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (Intensidade relativa 10), 141 não atribuído (Intensidade relativa 8)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* SOBRE VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni*

A atividade dos compostos: extrato etanólico, fração acetato de etila, fração diclorometano e mistura cassina/espectralina foi comparada aos controles de meio RPMI 1640 suplementado, PZQ (2µg/mL) e controle de metanol na maior concentração da substância testada (30µL).

Nos controles de RPMI 1640 e metanol os parasitos movimentavam-se normalmente. A maioria encontrava-se acasalada, com sistema excretor ativo, e não havia lesões de tegumento visíveis a microscopia. A taxa de ovoposição foi alta (275 a 340 ovos) e no último dia inclusive com a eclosão de miracídios (FIGURA 12 A, B, C e D).

No controle de PZQ, após duas horas, alguns parasitos já estavam parados, contraídos e outros com muito pouca movimentação a não ser das ventosas, na maioria das vezes. Após 24 horas todos já estavam mortos, contraídos e com lesões de tegumento (FIGURA 12 E e F). O PZQ exibiu atividade já prevista provocando paralisação e desprendimento de tegumento nos vermes adultos em até 24 horas de contato com o fármaco.

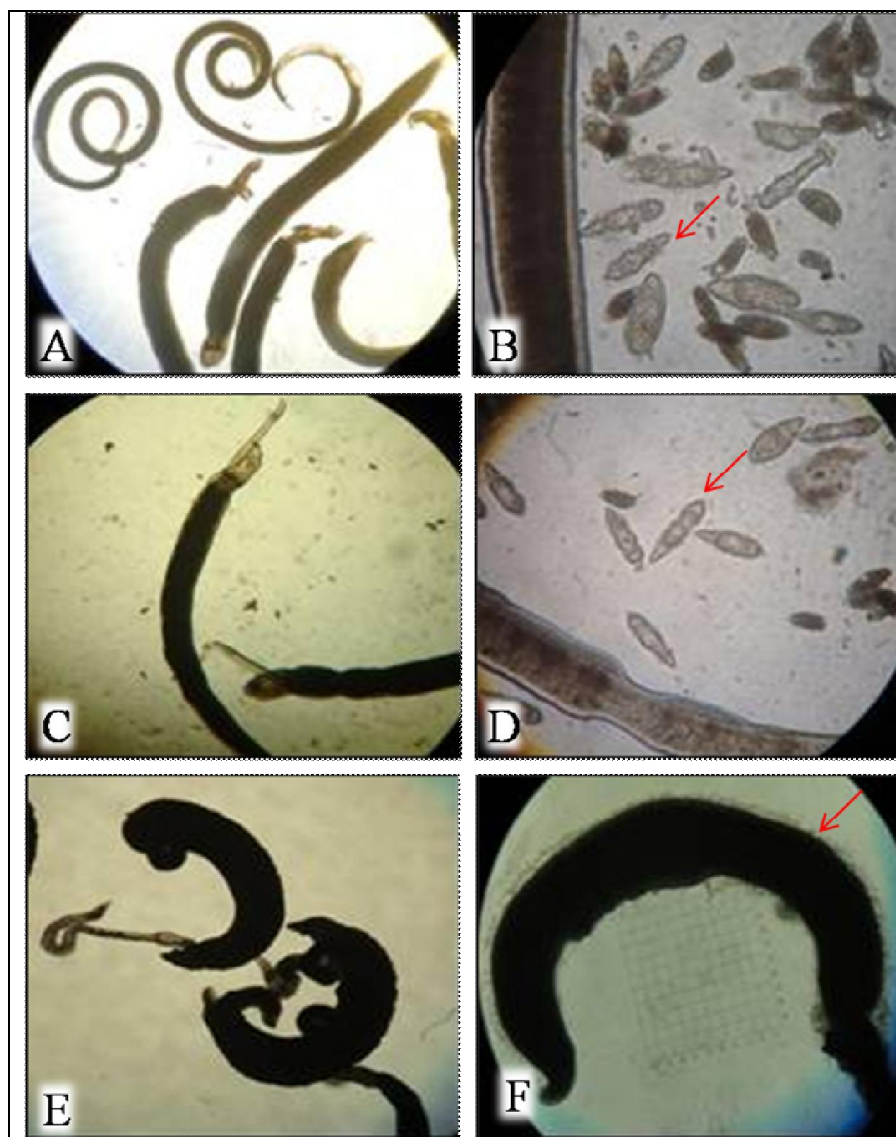


Figura 12- Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Controle RPMI (A e B); controle de metanol (C e D) e controle de PZQ (E e F). A: Vermes adultos macho e fêmeas e presença de ovos com 24 horas de cultura; B: ovos de *S. mansoni* em vários estágios de desenvolvimento e miracídeos eclodidos (seta); C: vermes adultos acasalados e ovos com 24 horas de cultura; D: ovos em vários estágios de desenvolvimento e miracídeos eclodidos (seta); E: vermes adultos acasalados e contraídos com 24 horas de incubação; F: macho com desprendimento de tegumento em todo seu contorno (seta) com 24 horas de incubação.

Os vermes adultos em cultura dos controles de RPMI e metanol mantiveram desenvolvimento normal permanecendo viáveis até o fim do experimento (8º dia); e como esperado houve eclosão de miracídeos no sétimo dia de cultura.

### 5.2.1 Avaliação da atividade *in vitro* do extrato etanólico de *Senna spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Vermes adultos de *S. mansoni* foram expostos a quatro concentrações diferentes (50,0; 75,0; 100,0 e 150,0  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato de *S. spectabilis*. Nas três primeiras concentrações os parasitos mantiveram movimentação e acasalamento normais, não possuíam lesões de tegumento e houve postura de ovos em grande quantidade ao longo dos oito dias de observação. Na maior concentração (150,0  $\mu\text{g/mL}$ ) após 24 horas os parasitos movimentavam menos, poucos ainda permaneciam acasalados. Não houve lesões de tegumento, mas a morfologia estava alterada, com os vermes alongados e alguns com sistema digestivo parado; além de postura de ovos em menor quantidade. No oitavo dia haviam ovos inviáveis e alguns parasitos parados (FIGURA 13).



Figura 13- Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos ao extrato etanólico de *Senna spectabilis*.

Fonte: Da autora.

Nota: A: Casal de vermes expostos a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , com ovoposição após 24 horas de incubação (aumento 10x). B: ovos em diferentes estágios de desenvolvimento no sexto dia de incubação com 75  $\mu\text{g/mL}$  de extrato etanólico (aumento 20x). C: Vermes adultos não acasalados expostos a concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$  de extrato, apresentavam aspecto alongado, algumas fêmeas com sistema digestivo parado, porém algumas ainda estavam ovopondo (seta) (aumento 4x).

A avaliação quanto à motilidade, acasalamento, morfologia, postura de ovos, contração e despreendimento de tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* após contato com extrato etanólico de *S. spectabilis* está representada a seguir (Tabela 2).

**Tabela 2:** Análise da atividade esquistossomicida do extrato etanólico de *Senna spectabilis*

Substância	Concentração (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	8° dia
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
Metanol	30 µL	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EEt	50	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EEt	75	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EEt	100	+++	+	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EEt	150	+++	+	+/-/-	+/-/+	-/-	-/-
PZQ	2	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+

Fonte: Da autora.

Nota: Extrato Etanólico.+++ movimento normal, + pouco movimento, - sem movimento. +/+/- acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ ausência de ovos, +/+/+ acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ presença de ovos, -/-/- vermes desacasalados/sistema digestivo parado/ausência de ovos, +/-/- acasalados/sistema digestivo parado/ ausência de ovos. -/- Ausência de contração e encurtamento/ausência de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/- presença de contração e encurtamento/ ausência de desprendimento e/ ou bolha no tegumento, ++ presença de contração e encurtamento/presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento. Controle: controle RPMI; Metanol: Controle metanol; EEt: Extrato etanólico; PZQ: Praziquantel.

Para matar 50% dos vermes adultos expostos ao extrato etanólico (DL<sub>50</sub>) seria necessária uma concentração de 495,4 µg/mL; para matar 90 (DL<sub>90</sub>) e 100% (DL<sub>100</sub>) dos parasitos as concentrações foram 831,7 µg/mL e 915,8 µg/mL, respectivamente. Tais valores são altos e não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados aos controles (FIGURA 14).

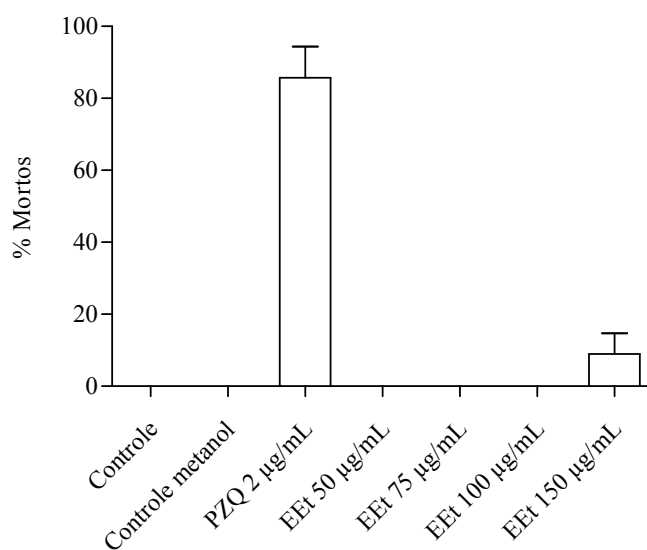


Figura 14- Gráfico da atividade *in vitro* do extrato etanólico sobre a viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos.

### 5.2.2 Avaliação da atividade *in vitro* da fração acetato de etila de *Senna spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os parasitos foram expostos às mesmas concentrações do extrato total. Somente nas maiores concentrações (100,0 e 150,0 µg/mL) houve lesões de tegumento e alguns parasitos encontravam-se parados no oitavo dia. Nas concentrações de (50,0; 75,0 µg/mL) os parasitos mantiveram movimentação, acasalamento e ovoposição normais (FIGURA 15).

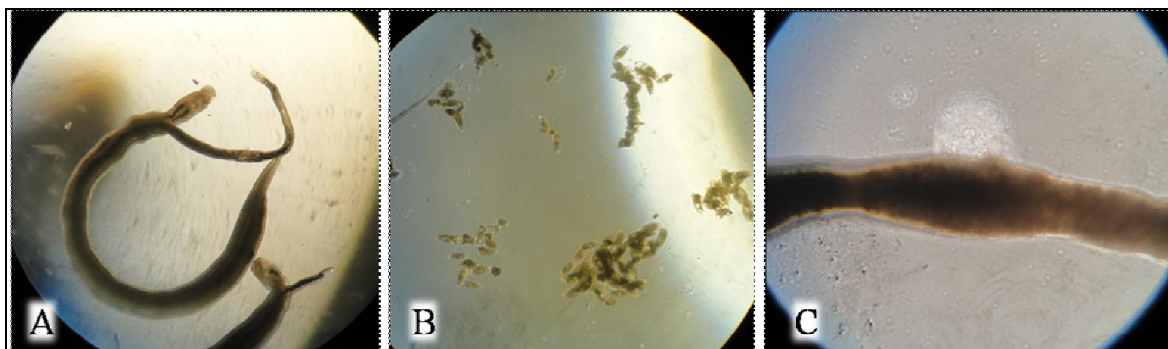


Figura 15- Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à fração acetato de etila de *Senna spectabilis*.

Fonte: Da autora.

Nota: A: Casais de vermes expostos a concentração de 50,0  $\mu\text{g/mL}$  após 24 horas de incubação (aumento 4x); B: aglomerados de ovos em estágio de desenvolvimento avançado com seis dias de incubação expostos a concentração de 75,0  $\mu\text{g/mL}$  (aumento 10x); C: Macho apresentando bolhas de tegumento ao ser exposto a 150,0  $\mu\text{g/mL}$  da fração acetato de etila aumento 40x).

A seguir, na Tabela 3, está representada a avaliação da atividade da fração acetato de etila de *S. spectabilis* após o período de exposição dos vermes adultos de *S. mansoni*, seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente.

**Tabela 3:** Análise da atividade esquistossomicida da fração acetato de etila de *Senna spectabilis*

Substância	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	$\geq 24\text{h}$	2h	$\geq 24\text{h}$	2h	8° dia
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
Metanol	30 $\mu\text{L}$	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
FAE	50	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
FAE	75	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
FAE	100	+++	+	+/+/-	+/-/+	-/-	-/+
FAE	150	+++	+	+/-/-	+/-/+	-/-	-/+
PZQ	2	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+

Fonte: Da autora.

Nota: Fração acetato de etila.+++ movimento normal, + pouco movimento, - sem movimento, +/+/- acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ ausência de ovos, +/+/+ acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ presença de ovos, -/-/- vermes desacasalados/sistema digestivo parado/ausência de ovos, +/-/- acasalados/sistema digestivo parado/ ausência de ovos. -/- Ausência de contração e encurtamento/ausência de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/- presença de contração e encurtamento/ ausência de desprendimento e/ ou bolha no tegumento, -/+ ausência de contração e encurtamento/ presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento, ++ presença de contração e encurtamento/presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento.

Controle: Controle RPMI; Metanol: Controle metanol; FAE: Fração acetato de etila; PZQ: Praziquantel.

Os valores de  $DL_{50, 90}$  e  $100$  foram respectivamente 553,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 943,9  $\mu\text{g/mL}$  e 1041,5  $\mu\text{g/mL}$ , e assim como os valores de concentração dose letal calculados para o extrato etanólico, não apresentaram diferença estatística significativa de mortalidade comparados ao controle de metanol (FIGURA 16).

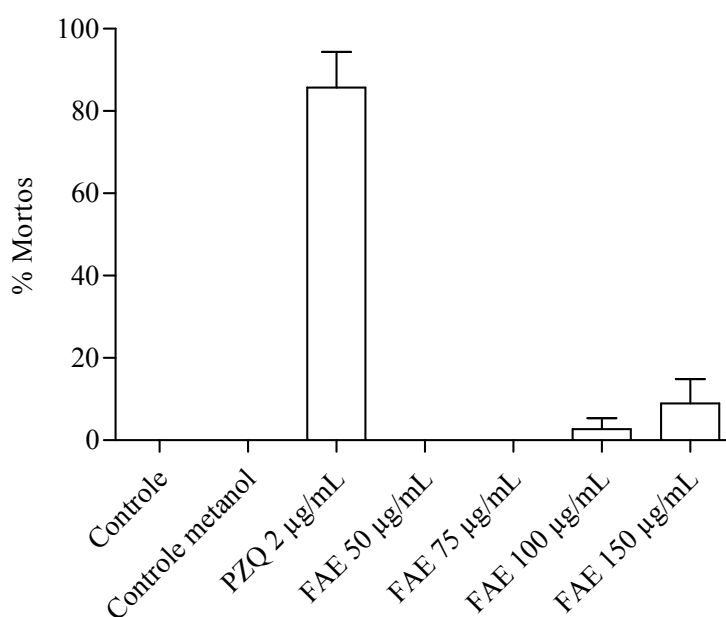


Figura 16- Gráfico da atividade *in vitro* da fração acetato de etila sobre a viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos.

### 5.2.3 Avaliação da atividade *in vitro* da fração diclorometano de *Senna spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Vermes adultos foram expostos à fração diclorometano nas concentrações de 30,0; 40,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 µg/mL. Após as primeiras duas horas de contato, os parasitos encontravam-se alongados se comparados ao controle. Nas concentrações de 30,0; 40,0 e 50,0µg/mL a fração diclorometano foi pouco efetiva; os vermes encontravam-se acasalados, não houve lesões de tegumento e houve ovoposição em pequena quantidade. Nas outras concentrações, após 24 horas, os parasitos ainda estavam alongados, com lesões de tegumento (bolhas e desprendimento). Os parasitos estavam parados com sistema digestivo também sem movimentação e não houve postura de ovos; permanecendo assim ao longo dos oito dias (FIGURA 17).



Figura 17- Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à fração diclorometano de *Senna spectabilis*

Fonte: Da autora.

Nota: A: vermes adultos expostos a concentração de 75µg/mL após 24 horas de incubação, alongados e não acasalados (aumento 4x); B: Macho com bolhas no tegumento (seta exposto a concentração de 75µg/mL (aumento 40x); C: fêmea com bolhas no tegumento (seta), exposta a concentração de 100 µg/mL (aumento 20x).

As figuras 17 B e C mostram os parasitos com alterações morfológicas apresentando lesões de tegumento e sistema digestivo também danificado, sem atividade. Na tabela abaixo (TABELA 4), está representado os resultados da avaliação da atividade da fração diclorometano sobre os vermes adultos.

**Tabela 4:** Análise da atividade esquistossomicida da fração diclorometano de *Senna spectabilis*.

Substância	Concentração(µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	8° dia
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
Metanol	30 µL	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
FDm	30	+	+	+/+/-	+/-/+	-/-	-/-
FDm	40	+	+	+/+/-	+/-/+	-/-	-/-
FDm	50	+	+	+/+/-	+/+/-	-/-	-/+
FDm	75	+	+	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
FDm	100	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
FDm	150	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
PZQ	2	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+

Fonte: Da autora.

Nota: Fração Diclorometano.+++ movimento normal, + pouco movimento, - sem movimento, +/+/- acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ ausência de ovos, +/+/+ acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ presença de ovos, -/-/- vermes desacasalados/sistema digestivo parado/ausência de ovos, +/-/- acasalados/sistema digestivo parado/ ausência de ovos, +/-/+ acasalados/ morfologia alterada/ presença de ovo -/- Ausência de contração e encurtamento/ausência de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/- presença de contração e encurtamento/ ausência de desprendimento e/ ou bolha no tegumento, -/+ ausência de contração e encurtamento/ presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/+ presença de contração e encurtamento/presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento. Controle: Controle RPMI; Metanol: Controle metanol; FDm: Fração diclorometano; PZQ: Praziquantel.

Os valores de DL<sub>50</sub>, 90 e 100 para este composto foram respectivamente 83,5 µg/mL; 122,3 µg/mL e 132,0 µg/mL. A sobrevivência foi significativamente menor nos parasitos tratados com a fração diclorometano nas concentrações de 75,0; 100,0 e 150,0 µg/mL se comparado ao controle (FIGURA 18).

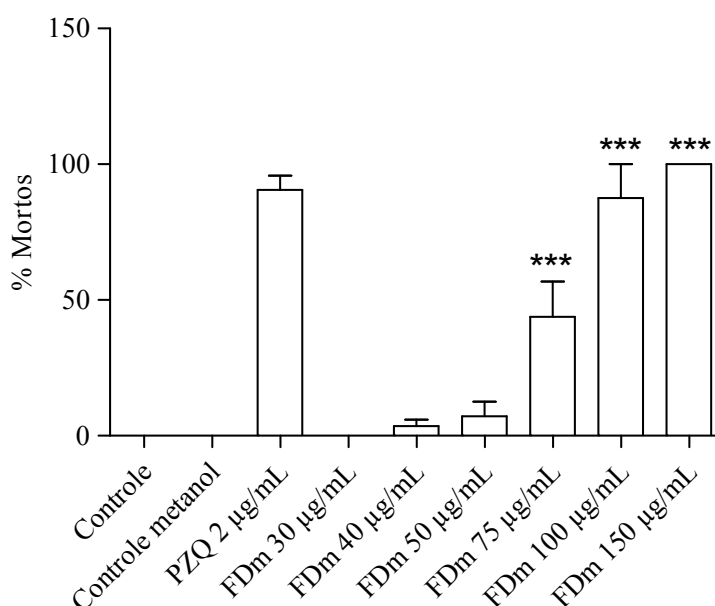


Figura 18- Gráfico da atividade *in vitro* da fração diclorometano sobre a viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos.  
\*\*\* P <0,0001.

A partir da análise dos helmintos e dos valores obtidos de concentração inibitória pode-se inferir que a fração diclorometano, nas maiores concentrações testadas, exibiu uma atividade significativa sobre os vermes.

#### 5.2.4 Avaliação da atividade *in vitro* da mistura de substâncias (cassina/espectralina) de *Senna spectabilis* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

A mistura de substância isolada (cassina/espectralina) foi adicionada à cultura de vermes adultos de *S. mansoni* nas concentrações de 30,0; 40,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 µg/mL, seguindo então a observação e avaliação de sua atividade sobre os parasitos por oito dias. Após duas horas de contato com a substância os parasitos encontravam-se parados e alongados, somente na maior concentração (150,0 µg/mL) eles apresentavam as extremidades enroladas. Após a lavagem (24 horas), ao retirá-los do contato com a substância, os que estavam expostos às duas menores concentrações (30,0 e 40,0 µg/mL) movimentavam muito pouco mas ao final do experimento, no 8º dia encontravam-se parados. Já os que estavam expostos às concentrações maiores (50,0; 75,0;

100,0 e 150,0  $\mu\text{g/mL}$ ) permaneceram sem movimentação. Em todas as concentrações havia parasitos com lesões de tegumento, e não houve acasalamento e ovoposição (FIGURA 17).

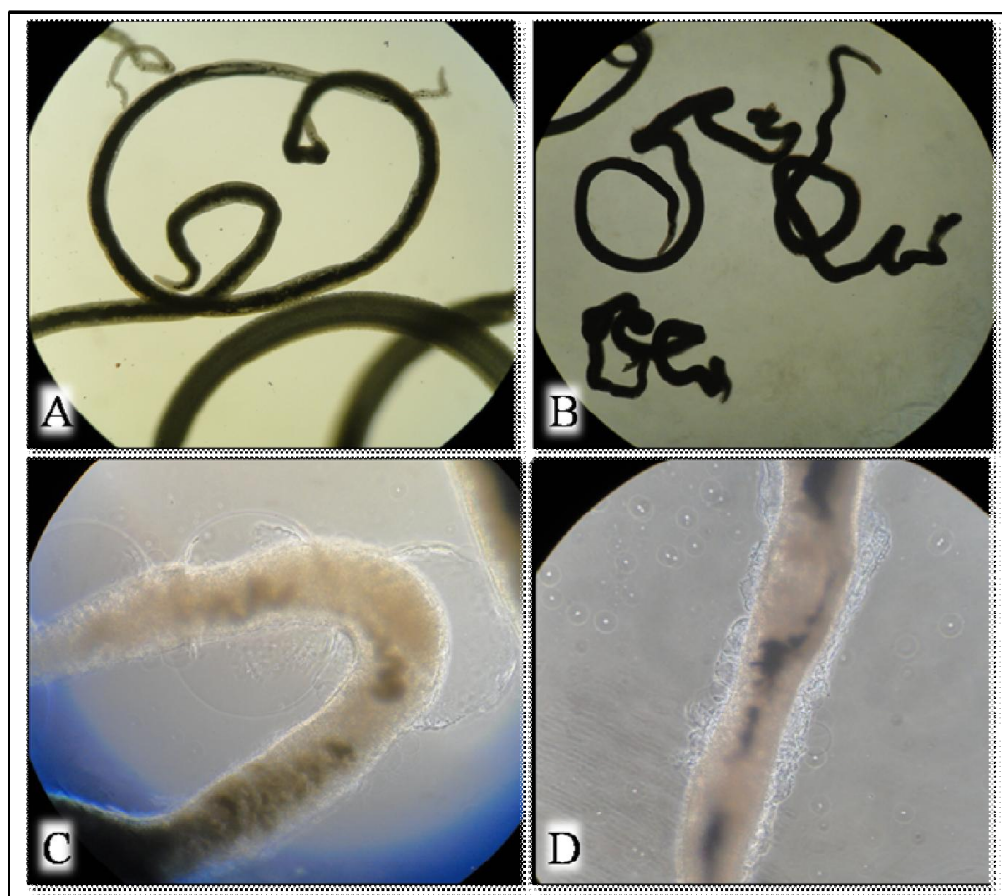


Figura 19- Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à mistura (cassina/espectralina) de *Senna spectabilis*.

Fonte: Da autora.

Nota: A e B: Vermes adultos mortos expostos a 50,0 e 150,0  $\mu\text{g/mL}$  de (cassina/espectralina) em 24 horas de incubação (aumento 4x); C: Fêmea exposta a concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  após 24 horas de incubação apresentando lesões de tegumento (bolhas) (aumento 40x); D : Fêmea exposta às concentração de 50,0  $\mu\text{g/mL}$  com desprendimento de tegumento (aumento 40x).

A partir das imagens da Figura 19, pode-se constatar o efeito lesivo da mistura de substâncias cassina/espectralina, sobre os vermes adultos, evidenciando principalmente as lesões no tegumento. Além destes danos, outro efeito expressivo dessas substâncias é o alongamento dos parasitos, o qual está mostrado na figura abaixo (FIGURA 20), em comparação aos controles de meio RPMI, em que os parasitos encontram-se em condições normais de musculatura, e PZQ indicando a contração muscular.

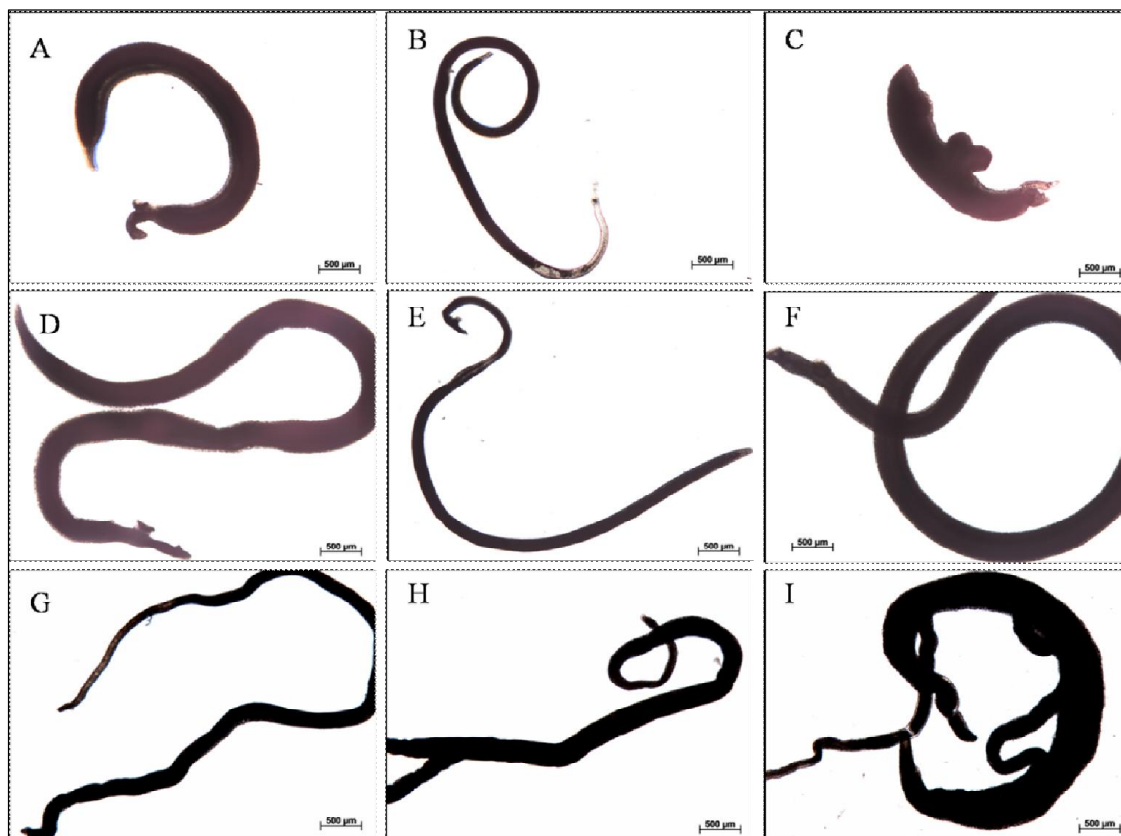


Figura 20- Vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à mistura (cassina/espectralina) com paralisia flácida.

Fonte: Da autora.

Nota: A e B: Vermes adultos, macho e fêmea, respectivamente do controle de meio RPMI; C: Vermes adultos acasalados expostos ao PZQ (2 µg/mL); D: Macho exposto a concentração de 40 µg/mL de cassina/espectralina; E: Fêmea exposta a concentração de 40 µg/mL de cassina/espectralina; F: Macho exposto à 50 µg/mL de cassina/espectralina; G: Fêmea exposta a 75 µg/mL de cassina/espectralina; H: Fêmea exposta a 100 µg/mL de cassina/espectralina; I: Vermes acasalados expostos à 150 µg/mL de cassina/espectralina. (Barra de escala = 500 µm)

Na Tabela 5, a seguir, está representado detalhadamente o efeito da mistura pura de substâncias cassina/espectralina, sobre os vermes adultos, em função das concentrações, analisando os parâmetros durante o contato com as substâncias, e após a lavagem dos poços, ao retirar do contato com as amostras.

**Tabela 5:** Análise da atividade esquistossomicida da mistura de alcaloides cassina/espectralina de *S. spectabilis*

Substância	Concentração(µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	8° dia
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
Metanol	30 µL	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
C/E	30	+	+	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
C/E	40	-	+	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
C/E	50	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
C/E	75	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
C/E	100	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
C/E	150	-	-	-/-/-	-/-/-	-/-	-/+
PZQ	2	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+

Fonte: Da autora.

Nota: Mistura de substâncias cassina/espectralina. +++ movimento normal, + pouco movimento, - sem movimento, +/- acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ ausência de ovos, +/+/+ acasalados/sem alterações morfológicas aparentes/ presença de ovos, -/-/- vermes desacasalados/sistema digestivo parado/ausência de ovos, +/-/- acasalados/sistema digestivo parado/ ausência de ovos, +/-/+ acasalados/ morfologia alterada/ presença de ovos -/- Ausência de contração e encurtamento/ausência de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/- presença de contração e encurtamento/ ausência de desprendimento e/ ou bolha no tegumento, -/+ ausência de contração e encurtamento/ presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento, +/+ presença de contração e encurtamento/presença de desprendimento e/ou bolha no tegumento.

Controle: Controle RPMI; Metanol: Controle metanol; C/E: mistura de alcaloides cassina/espectralina; PZQ.

A mistura de substâncias isoladas apresentou DL<sub>50</sub>, 90 e 100 de 34,7µg/mL, 82,8 µg/mL e 94,8 µg/mL, respectivamente. Em todas as concentrações houve diferença estatística significativa comparado aos controles de meio RPMI e metanol, como pode ser observado no gráfico abaixo (FIGURA 21).

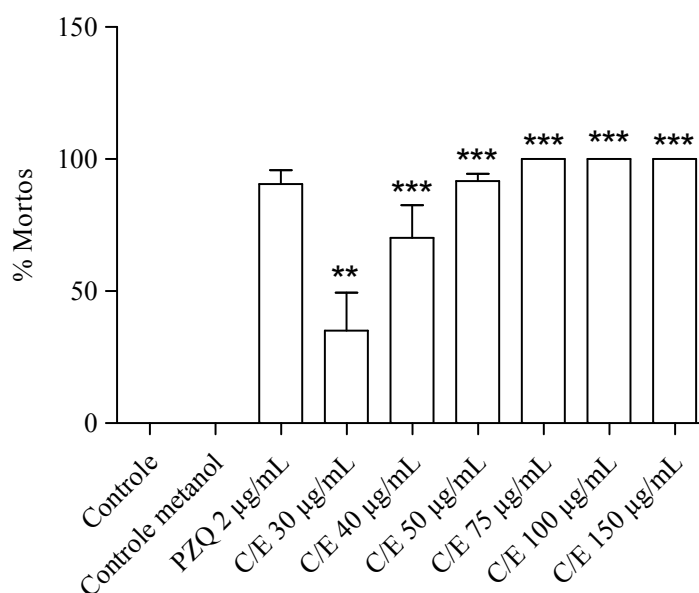


Figura 21- Gráfico da atividade *in vitro* da mistura de alcaloides (cassina/espectralina) de *Senna spectabilis* sobre a viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos. \*\*\* P < 0,0001.

### 5.2.5 Efeito *in vitro* da mistura de alcaloides cassina/espectralina em associação com PZQ sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

A mistura de alcaloides em associação com o PZQ exibiu boa atividade nas seguintes proporções PZQ/cassina e espectralina: (0,5/23,8 µg/mL) e (0,5/11,9 µg/mL) paralisando 83% e 50% dos vermes, respectivamente. Enquanto na monoterapia de PZQ a 0,5 µg/mL a porcentagem de mortos foi de 33% e na exposição à mistura cassina/espectralina à 23,8 µg/mL foi de 16%. Já na concentração de 11,9 µg/mL não houve parasitos mortos (FIGURA 22).

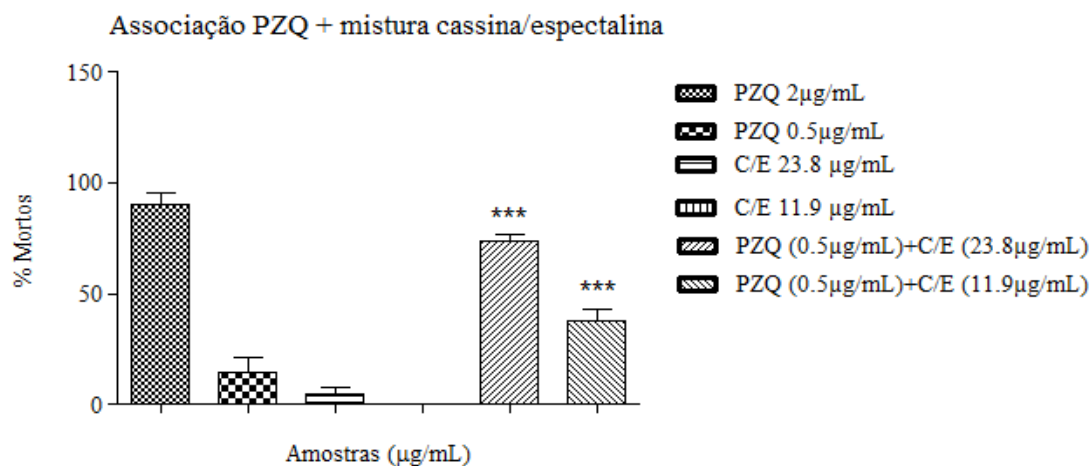


Figura 22- Efeito da associação de Praziquantel (0,5 µg/mL) com cassina/espectralina sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos. \*\*\* P < 0,0001.

Na associação com a concentração mais baixa de PZQ (0,25 µg/mL), a proporção de PZQ/cassina e espectralina em que se obteve um efeito relevante estatisticamente foi a de (0,25 /23,8 µg/mL) com 83% de parasitos mortos; enquanto na monoterapia de PZQ a 0,25 µg/mL não foram encontrados vermes com ausência total de movimentação. E na exposição somente à cassina/espectralina 23,8 µg/mL, a porcentagem de mortos foi de 16% (FIGURA 23).

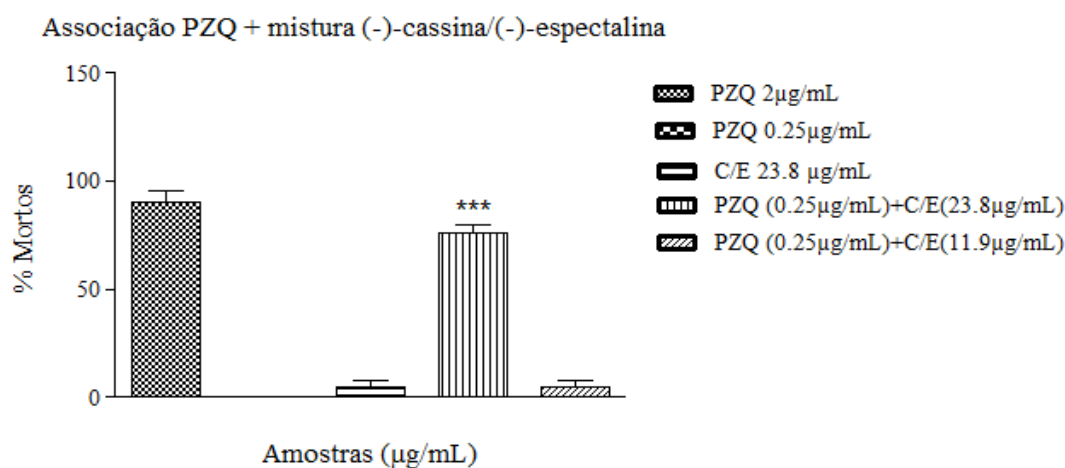


Figura 23- Efeito da associação de Praziquantel (0,25 µg/mL) com cassina/espectralina sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos. \*\*\* P < 0,0001.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA EXCRETOR DE VERMES ADULTOS POR MEIO DE RESORUFINA EM INCUBAÇÃO COM (CASSINA/ESPECTALINA) *IN VITRO*

Após a marcação com a sonda pôde-se observar que a mistura de substâncias (cassina/espectralina) inibiu a atividade do sistema excretor dos parasitos. Este resultado pode ser constatado pela difusão da sonda em toda extensão do parasito e a ausência de fluorescência ao longo do sistema excretor; sistema pelo qual normalmente estaria ativo expulsando a sonda do organismo (FIGURA 24).

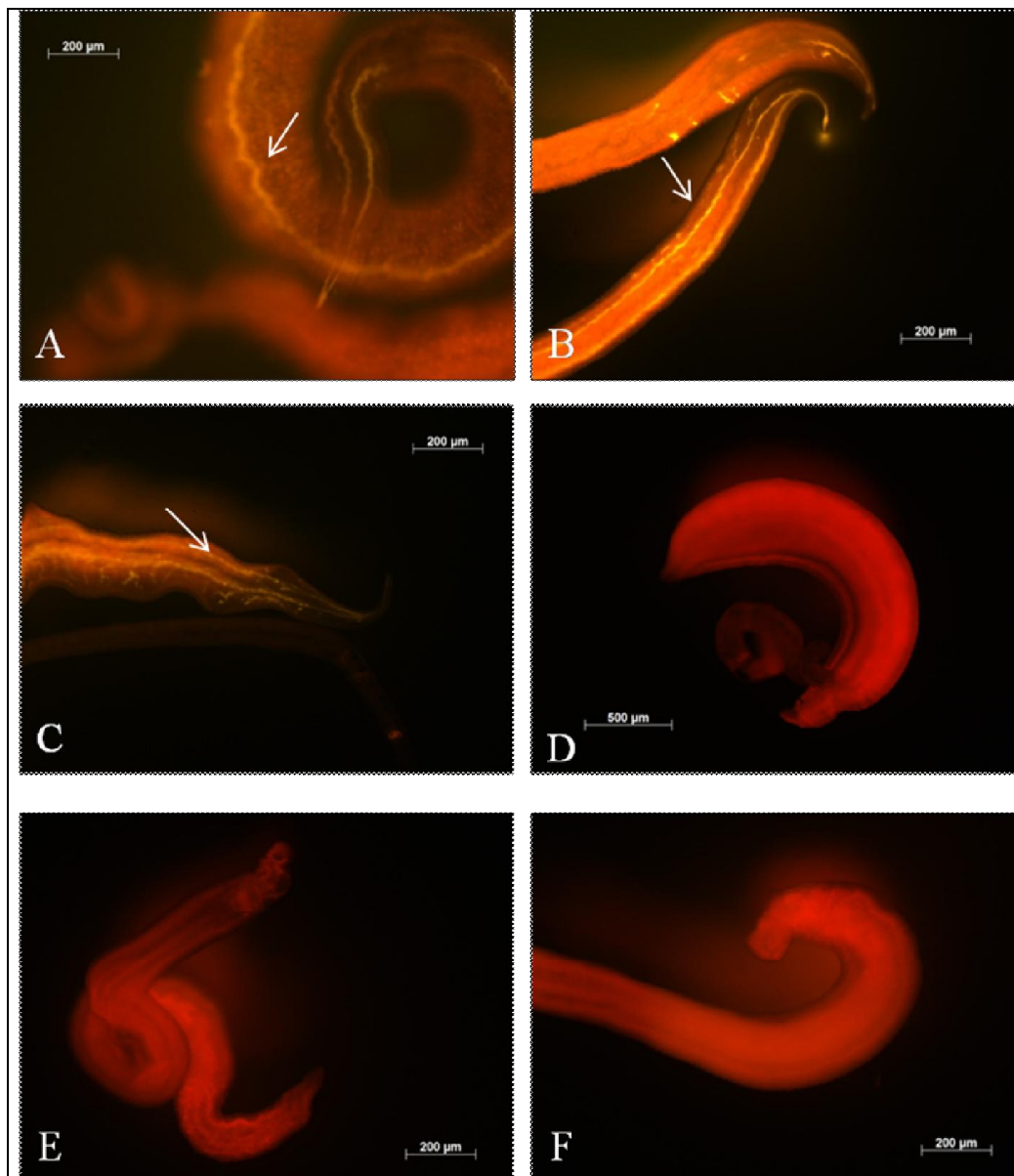


Figura 24- Marcação de danos no sistema excretor de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* pela sonda resorufina.

Fonte: Da autora.

Nota: A e B: Machos incubados somente com meio RPMI (controle negativo); marcação fluorescente na extensão do túbulo principal (TP- seta); C: Macho exposto à Metanol também com marcação fluorescente no sistema excretor; D: Casal de vermes expostos à 2,0 µg/ml de PZQ (controle positivo) com marcação fluorescente difundida por todo o parasito; E e F: machos expostos a mistura cassia/espectralina a 40,0 0 µg/mL com marcação fluorescente por todo o corpo.

Nos controles de meio RPMI e metanol, figura 24 (A, B e C), pode ser constatado o funcionamento normal do sistema excretor do parasito, por meio da marcação fluorescente ao expulsar a sonda.

O oposto foi observado para os parasitos expostos ao PZQ (2µg/mL) que apresentaram sistema excretor inativo. Na figura 24 D observa-se que existe coloração por todo o corpo do

parasito e o sistema excretor não está delimitado pela fluorescência, indicando inativação do sistema excretor.

Nas imagens 24 (E e F), dos parasitos expostos à 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cassina/espectralina, o resultado é semelhante ao dos vermes expostos ao PZQ. Tal fato indica que a mistura de alcaloides também foi capaz de interferir na atividade do sistema excretor inativando-o.

### 5.3.1 Avaliação de danos no tegumento de vermes adultos expostos a (cassina/ espectralina) *in vitro* usando a sonda Hoechst 33258

Observou-se que a mistura de substâncias isoladas (cassina/espectralina), teve ação no tegumento dos vermes adultos provocando lesões. Tal resultado pode ser comprovado pela fluorescência exibida nas regiões danificadas (FIGURA 25).

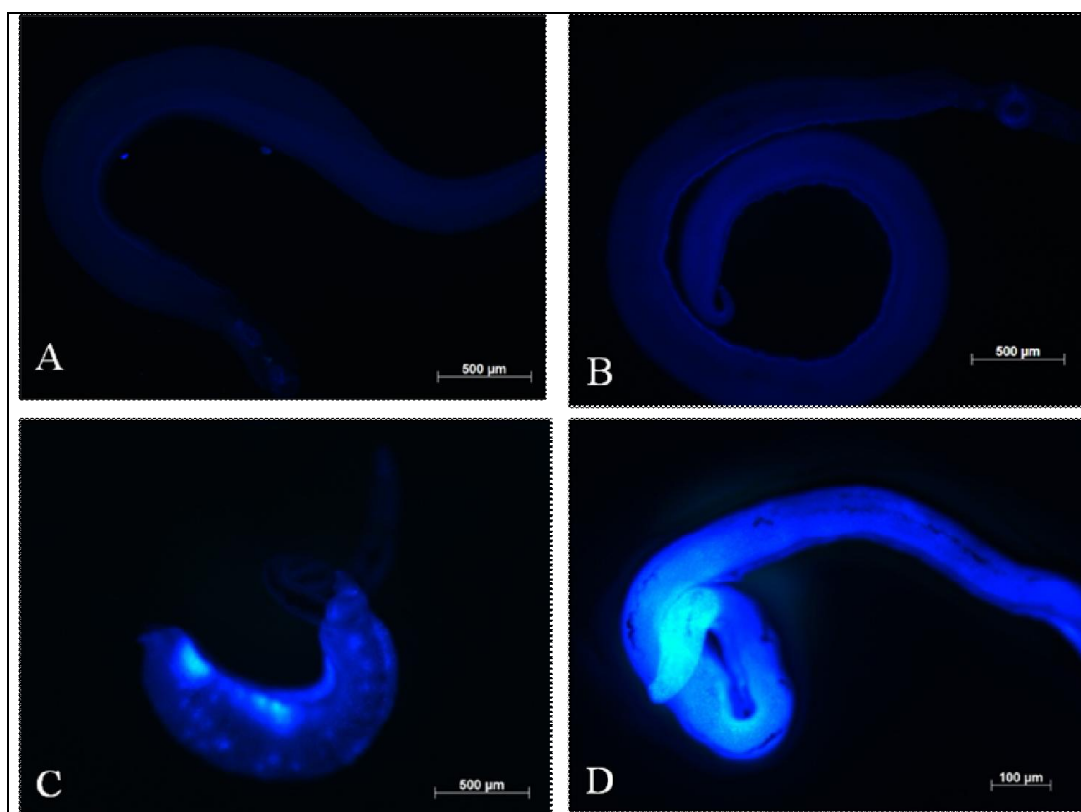


Figura 25- Marcação de lesões no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* pela sonda Hoechst 33258.

Fonte: Da autora.

Nota: A e B: Machos incubados com meio RPMI 1640 (controle negativo) e Metanol, respectivamente; C: Casal de vermes expostos a 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PZQ (controle positivo); D: Macho exposto a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cassina/espectralina.

A integridade da membrana dos parasitos incubados com meio RPMI 1640 e metanol (FIGURA 25 A e B) foi preservada, visto que não há marcação fluorescente nestes dois tratamentos. Já nas imagens 25 C e D que ilustram os parasitos expostos ao PZQ (2 $\mu$ g/mL) e à cassina/espectralina (40  $\mu$ g/mL) respectivamente; pode ser constatada marcação fluorescente intensa comprovando que tais substâncias causam lesões no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*.

#### 5.4 EFEITO *IN VITRO* DA MISTURA CASSINA/ESPECTALINA SOBRE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni*

As cercárias foram expostas a 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 150,0  $\mu$ g/mL de cassina/espectralina, seguindo de análise em cinco momentos diferentes (1, 2, 4, 6 e 8 horas) após o contato com o composto.

Na figura 26 (A e B) pode ser observado as cercárias do controle de meio RPMI e metanol respectivamente, sem alterações na morfologia e tegumento, permanecendo viáveis após as 8 horas de observação. As cercárias expostas à 12,5 e 25,0  $\mu$ g/mL da mistura cassina/espectralina sofreram perda de cauda e alteração na morfologia, porém em pequena proporção (3%) quando comparado aos controles. Nestas mesmas concentrações 97% das cercárias movimentavam normalmente até o fim do experimento.

A figura 26 (C e D) refere-se às cercárias sob efeito do PZQ, em que foi observado perda de cauda e alterações de morfologia, assim como as cercárias expostas à 50,0  $\mu$ g/mL da mistura de alcalóides (FIGURA 26 E e F). Nesta última, foi observado também vacuolização e formação de bolhas no corpo e cauda das cercárias, que já estavam paralisadas e inviáveis.

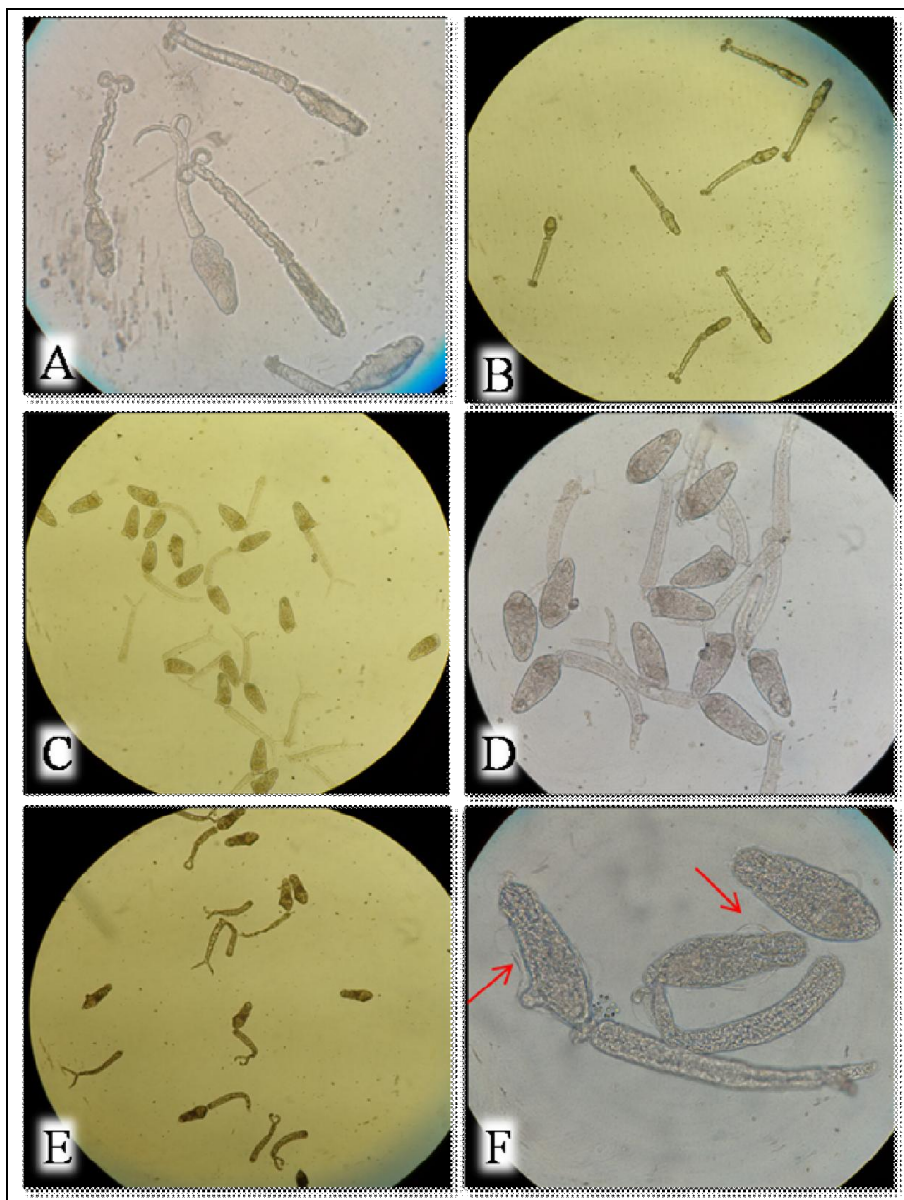


Figura 26- Cultura *in vitro* de cercárias de *Schistosoma mansoni*

A e B: Cercárias do controle de meio RPMI e metanol, respectivamente; C e D: Cercárias expostas à 2 µg/mL de PZQ e E e F: Cercárias expostas à 50 µg/mL de mistura cassina/espectralina.

Fonte: Da autora.

A figura 27 representa a análise de motilidade das cercárias no decorrer das 8 horas de duração do teste. Na concentração de 50,0 µg/mL de cassina/espectralina, após 4 horas as cercárias já estavam imóveis, e nas concentrações de 100,0 e 150,0 µg/mL a perda de motilidade foi constatada após 2 horas, exibindo, portanto, um efeito melhor que o PZQ.

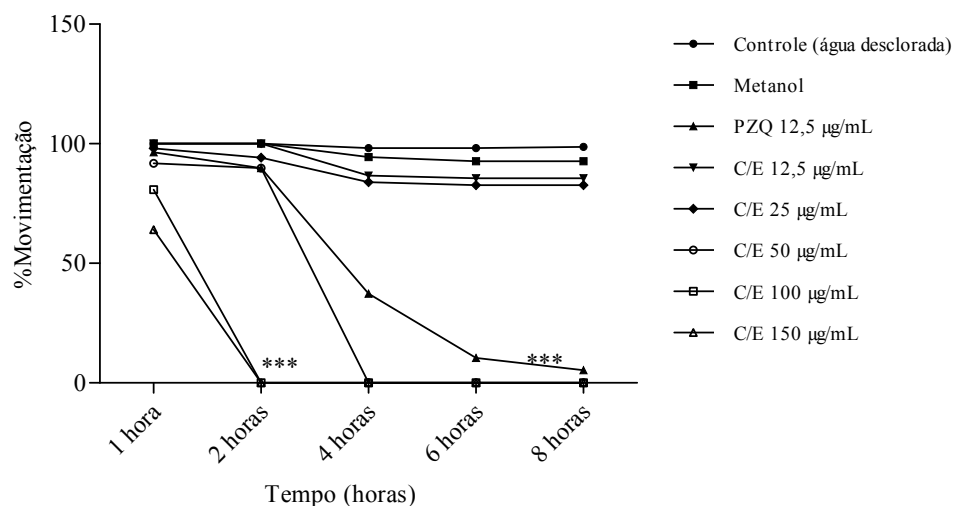


Figura 27- Efeito *in vitro* da mistura de alcaloides cassina/espectralina sobre a motilidade das cercárias.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos. \*\*\* P < 0,0001.

Nas concentrações de 12,5 e 25,0 µg/mL a mistura cassina/espectralina apresentou baixo efeito, com média de 20,0% de perda de movimentação e 8,0% de perda de cauda (FIGURA 28). No entanto, a partir da concentração de 50,0 µg/mL os efeitos foram satisfatórios apresentando 100% de perda de motilidade após 4 horas e 75,0%, 86,0% e 90,0% de perda de cauda para 50,0, 100,0 e 150,0 µg/mL, respectivamente. Pôde ser observada também formação de bolhas e vacuolização em todas as concentrações. O efeito da mistura cassina/ espectralina nas três concentrações maiores foi compatível ou mais satisfatório que o efeito do PZQ. Nos controles negativos, água desclorada e metanol, as cercárias continuaram viáveis até o fim do experimento, sem qualquer dano.

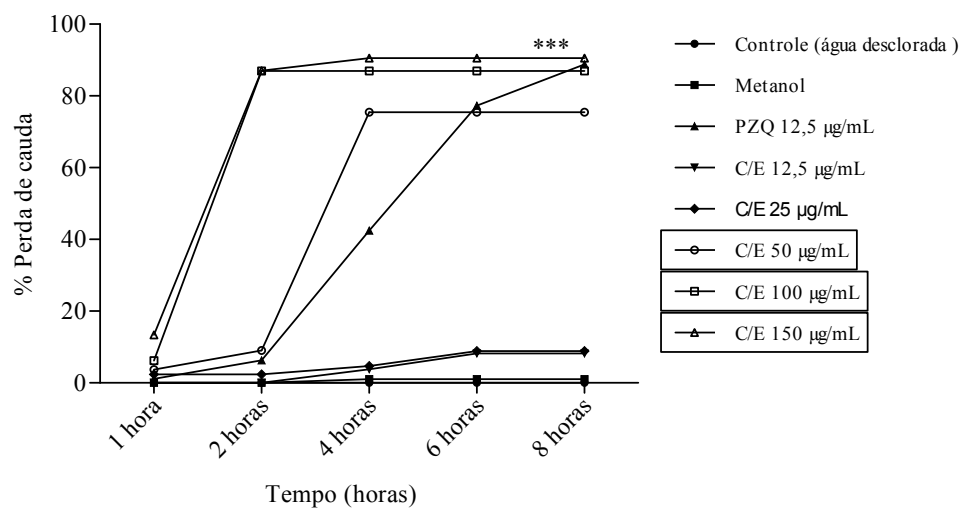


Figura 28- Efeito *in vitro* da mistura de alcaloides cassina/espectralina sobre a perda de cauda das cercárias.

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados são apresentados com a média de três experimentos. \*\*\* P < 0,0001.

## 5.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O valor da concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) para PBMC's foi de 132,1 µg/mL, com índice de segurança em torno de 3,8 visto que o valor de  $IC_{50}$  para (cassina/espectralina) foi de 34,7 µg/mL.

## 6 DISCUSSÃO

A esquistossomose é alvo de grandes preocupações atualmente, pois devido a falta de vacina, a terapia do paciente é fortemente dependente da quimioterapia com PZQ, como a OMS recomenda (WHO, 2014). Alertas sobre a resistência ao fármaco e possível recorrência da infecção incentivou a busca por novos compostos com potencial esquistossomicida.

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários com atividades biológicas como propriedades citotóxicas, anti-parasitárias e anti-microbianas. Estes compostos interferem frequentemente em alvos centrais nos parasitos, tais como DNA (intercalação, alquilação), integridade da membrana, microtúbulos e sinal de transdução neuronal (WINK, 2012).

A espécie *Senna spectabilis* tem despertado interesse em vários grupos de pesquisa devido à abundância de alcaloides piperidínicos do tipo 2,6-dialquil-3-O-substituídos presentes em suas folhas, flores e frutos. Estudos das propriedades biológicas de seus extratos e metabólitos alcaloídicos têm revelado várias atividades relevantes, tais como antimicrobiana, sedativa, anticonvulsivante, antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e leishmanicida (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003; DE ALBUQUERQUE MELO et al., 2014; KRISHNAN et al., 2010; SILVA et al., 2011a, SILVA et al. 2011b; VIEGAS et al., 2007).

A ocorrência de mistura de vários alcaloides homólogos, a exemplo de cassina/espectralina, em *S. Spectabilis*, já havia sido relatada Pivatto et al., (2005), que identificou e caracterizou vários destes metabólitos, inclusive com dados de fragmentação por Espectrometria de Massas (EM) (PIVATTO et al., 2005; SILVA et al., 2010a). Portanto, neste trabalho nos limitamos a comparar os dados cromatográficos durante a etapa de isolamento e purificação, utilizando a EM somente para quantificação relativa entre os alcaloides mais abundantes, cassina e espectralina, de nosso interesse.

No presente trabalho, os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* foram expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico, frações deste extrato, e mistura pura (cassina/espectralina); e foram então avaliados em relação à movimentação, acasalamento, contração, alterações de tegumento e ovoposição, durante oito dias. Estes mesmos parâmetros já foram usados em trabalhos anteriores como indicadores de atividade biológica e estudos de toxicidade com espécies de *Schistosoma* (CARRARA et al., 2013; CASTRO et al., 2015; CIOLI et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2009; XIAO et al., 2007). Decorrido os oito dias, os dados coletados foram utilizados para os cálculos de dose letal (DL<sub>50, 90</sub>

e 100). O valor do  $DL_{50}$  é utilizado para avaliar a atividade dos compostos e monitorar perfis de resistência e susceptibilidade da cepa do parasito em relação à substância avaliada (CASTRO et al., 2015; EL-BESHBISHI et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2010; MORAES et al., 2011).

Comparando os efeitos causados nos parasitos expostos ao extrato etanólico, fração acetato de etila e fração diclorometano, foi constatado que nesta última houve maiores danos aos vermes. Tal fato pode ser explicado por estudo anterior em que foi comprovado por cromatografia de camada delgada que a maioria dos componentes alcaloides estão concentrados na fração diclorometano (ALBUQUERQUE MELO et al., 2014).

Em todos os testes, com o extrato etanólico e frações acetato de etila, mas principalmente com diclorometano e a mistura de substâncias cassina/espectralina, foi observado um efeito na musculatura do verme, provocando um alongamento dos mesmos, denominado paralisia flácida. Esse efeito aconteceu especialmente nas 24 horas de contato com os compostos e substâncias. É provável que os alcaloides, tenham ação muscular, atuando como relaxante; explicando o alongamento dos parasitos em todos os testes mesmo que somente em altas concentrações, como observado para o extrato etanólico e fração acetato de etila. Em estudos anteriores já foi descrito que os alcaloides possuem propriedades neurotóxicas atuando como agonistas ou antagonistas de neurorreceptores ou canais de íons (WINK, 2012).

Os parasitos multicelulares possuem o sistema nervoso constituído de neurotransmissores importantes como acetilcolina (ACh) e ACh- receptores (WINK, 2012). Esses ACh- receptores são responsáveis por controlar a atividade muscular do verme (WINK, 2012). Sendo assim, se a atividade desses neurorreceptores é inibida, pode acarretar paralisia muscular, assim como na ação do PZQ, porém por mecanismo diferente. O PZQ bloqueia os canais de sódio e potássio responsáveis pela sinalização neuronal provocando também a paralisia e morte direta dos vermes.

Foi relatado que a enzima acetilcolinesterase é encontrada em cercárias e esquistossômulos (ERCOLI, 1985), e que a mesma está presente em duas formas nos parasitos: uma é interna associada à massa muscular, e tem papel funcional na placa motora dos parasitos; outra forma é externa, associada ao tegumento, envolvida na transdução de sinais (ARNON; SILMAN; TARRAB-HAZDAI, 1999). Portanto, a função da acetilcolina como neurotransmissor é reforçada pelo fato do verme possuir enzima para sua síntese e degradação. Outra evidência do papel fisiológico da acetilcolina no *S. mansoni* é que a atividade muscular desse verme é reduzida por agentes colinomiméticos como carbacol e nicotina e inibidores de acetilcolinesterase produzindo paralisia flácida, que pode ser definida como perda de motilidade acompanhada por alongamento do verme em decorrência do relaxamento de sua musculatura longitudinal (MELLIN et al., 1983; PESSÔA; CASTRO; NOËL, 2005).

Em estudo *in vivo* com alcaloides piperidínicos, foi constatado que estes atuam como inibidores de acetilcolina com seletividade para acetilcolina cerebral, propondo sua utilização para o tratamento da doença de Alzheimer (VIEGAS et al., 2005). A partir desses trabalhos que reforçam o potencial dos alcaloides na ação inibidora da acetilcolinesterase, acreditamos que este possa ser também o mecanismo de ação da mistura de alcaloides majoritários cassina/espectralina sobre os vermes adultos de *S. mansoni*. Dados da literatura revelam que estes alcaloides tem ação central, mais especificamente sobre a enzima acetilcolinesterase, podendo ainda agir sobre receptores de ACh (dados não publicados), o que pode ser uma explicação plausível para o efeito observado de paralisia muscular e morte direta dos parasitos. Entretanto, o mecanismo de ação destes alcaloides sobre tais parasitos ainda deve ser estudado.

De maneira complementar, foi avaliada a atividade de associação do PZQ com a mistura cassina/espectralina sobre os vermes adultos, visto que a quimioterapia de combinação de fármacos diferentes, já foi usada para o tratamento de doenças infecciosas com o intuito de atrasar ou evitar o aumento de resistência aos medicamentos (ARAUJO et al., 2008). Resultados relevantes foram obtidos nas concentrações intermediárias de PZQ e cassina/espectralina (0,5/23,8 µg/mL, 0,5/11,9 µg/mL e 0,25/23,8 µg/mL). Cabe destacar que, na menor concentração avaliada, não houve paralisia total dos vermes frente ao PZQ (0,25 µg/mL), enquanto que mistura cassina/espectralina causou a morte de 16% dos parasitos na concentração de 23,8 µg/mL. Assim como o PZQ, a mistura de alcaloides provocou paralisação do sistema excretor e danos no tegumento do parasito; o que pôde ser observado de diferente na ação dos dois é que enquanto o PZQ causou contração muscular, a mistura de alcaloides provocou um relaxamento nos vermes. Deste modo, pode-se inferir que o sinergismo ocorreu potencializando o efeito nesses alvos ou agindo em alvos diferentes potencializando a ação. Já que foi observado que a ação das substâncias associadas é maior que o efeito isolado de cada uma.

A avaliação do efeito de associação de fármacos é de grande importância também para minimizar efeitos tóxicos das substâncias, tendo em vista que será utilizada uma menor quantidade de cada substância. Sendo assim, a associação de fármacos com efeito sinérgico pode ser uma forma valiosa para melhorar o tratamento de várias doenças, e vem sendo estudada em diversos trabalhos e para diferentes doenças parasitárias como malária, Doença de Chagas, giardíase e esquistossomose (ARAÚJO; MATTOS, 2007; ARAUJO et al., 2008b; HAUSEN et al., 2011; KUEHN et al., 2009; MATTOS et al., 2007).

Para avaliar os possíveis danos no sistema excretor e no tegumento dos parasitos expostos frente à mistura cassina/espectralina foram usados os marcadores moleculares resorufina e Hoechst, respectivamente. Segundo Sato et al., (2002) a sonda resorufina é um sal de natureza

fluorescente e um modulador do substrato P-glicoproteína (Pgp), que é uma proteína expressa no epitélio excretor dos vermes adultos de *S. mansoni* e está associada às funções de absorção, eliminação e distribuição de muitas drogas (SCHINKEL; JONKER, 2003). Analisando a Figura 24 (E e F), fica claro que a mistura de substâncias cassina/espectralina provocou paralisação do sistema excretor dos vermes, provavelmente por inibição da Pgp. O resultado desta sonda corrobora resultados dos trabalhos de Couto et al., (2010) de avaliação da atividade do PZQ em cepas susceptíveis e resistentes e de Castro et al., (2015) de avaliação de potentes constituintes esquistossomicidas de *Garcinia brasiliensis*.

O tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* tem sido alvo para agentes esquistossomicidas, já que este é responsável por um dos mecanismos de escape do sistema imune do parasito no organismo humano (PEARCE; MACDONALD, 2002; SOTILLO et al., 2015). As lesões de tegumento foram avaliadas por meio da sonda Hoechst 33258 que é uma sonda hidrofílica e emite fluorescência quando se liga ao DNA das células. Para que isto aconteça é necessário que haja lesões para a sonda se difundir atuando assim como indicador de integridade da membrana (COUTO et al., 2010). Na figura 25 D, evidencia-se fluorescência emitida do parasito compatível com a do verme sob ação do PZQ, efeito que não é observado nas imagens 25 A e B dos controles de meio RPMI e metanol. Portanto, comprova-se também que além de provocar danos no sistema excretor, a mistura de alcaloides danifica o tegumento do verme adulto.

A atividade cercaricida da mistura de alcaloides cassina/espectralina foi avaliada por meio das taxas de perdas de motilidade e de cauda. A perda de cauda tem sido utilizada como medição da sensibilidade ao PZQ (LIANG et al., 2010), porém o mecanismo que provoca tal efeito ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que o corpo cercariano se afunila numa estreita ligação dobrável com a cauda, e acredita-se que esta ligação pode ser facilmente quebrada (LIANG et al., 2001). A cercária é a forma infectante do parasito para o hospedeiro definitivo, e para que ocorra a penetração pela pele elas necessitam da ação combinada de secreção de enzimas e movimentos vibratórios da cauda. Consequentemente, a perda da cauda compromete a capacidade de infectividade cercariana.

A indução de perda de cauda como consequência da ação de drogas é diferente da perda por estresse físico; pois a primeira ocorre antes que o conteúdo acetabular seja secretado, cuja ação foi confirmada após exposição ao PZQ (LIANG et al., 2010). A mistura de substâncias cassina/espectralina induziu a perda de cauda em 75% na concentração de 50 µg/mL e em 90% na concentração de 150 µg/mL, enquanto que o PZQ na concentração de 2 µg/mL provocou 88% de perda de cauda (FIGURA 28). Desta forma, é possível concluir também a ação dos alcaloides no estágio larval, tomando como base a mesma medida de sensibilidade usada para o PZQ.

Os parasitos são seres eucariontes assim como os seus hospedeiros, compartilhando, portanto da maioria das características bioquímicas e moleculares. Esse é um obstáculo para pesquisadores que atuam na área de obtenção de insumos farmacêuticos com candidatos a protótipos de novos fármacos. Ao realizar testes *in vitro* deve-se atentar à limitação de encontrar protótipos que sejam simultaneamente eficazes contra o parasito, mas não tóxicos para os seres humanos (WINK, 2012). A mistura cassina/espectralina exibiu  $CC_{50} = 132,1 \mu\text{g/mL}$ , que pode ser considerado moderado visto que seu  $DL_{100}$  para os parasitos foi de  $94,8 \mu\text{g/mL}$  e o índice de segurança de 3,8. Normalmente compostos contendo alcaloides não apresentam índices de segurança altos, como pode ser constatado no trabalho de Mengome et al., (2010) em que foram usadas células de rim de macaco para o ensaio de citotoxicidade.

Diante de todos os resultados apresentados fica claro que a mistura de alcaloides (cassina/espectralina) pode agir por mais de um mecanismo sobre os parasitos provocando a morte destes. E além de ser efetiva contra os vermes adultos de *S. mansoni*, os alcaloides majoritários também exibiram efeito letal para a forma larval, contra cercárias.

## 7 CONCLUSÕES

O extrato etanólico e a fração acetato de etila de *S. spectabilis* não exibem boa atividade esquistosomicida, exceto em concentrações elevadas. A fração diclorometano, no entanto, exerce atividade significativa quando comparada ao controle, visto que tal atividade é resultado da maior concentração de alcaloides nesta fração.

A mistura de alcaloides (cassina/espectralina) causou paralisia total dos vermes à 50 µg/mL. Além disso foi constatado inibição da atividade excretora e lesões de tegumento consideráveis.

A associação PZQ+cassina/espectralina exibiu efeito significativo em concentrações intermediárias. O sinergismo pode ocorrer por mecanismos diferentes e a associação é uma boa estratégia contra o desenvolvimento de resistência aos fármacos.

A avaliação no estágio larval revelou que estes alcaloides apresentam atividade cercaricida relevante.

A mistura cassina/espectralina parece ser uma alternativa promissora contra *S. mansoni*, revelado pelo seu  $DL_{50} = 37,4$  µg/mL, além de um potencial citotóxico moderado contra monócitos humanos, mostrando  $CC_{50} = 132,1$  µg/mL.

Especula-se que a mistura de alcaloides (cassina/espectralina) tenha ação no sistema nervoso dos vermes adultos de *S. mansoni*. Dados da literatura revelam que estes alcaloides têm ação central, podendo ainda agir sobre receptores de ACh (dados não publicados), o que pode ser uma explicação plausível para o efeito observado de paralisia muscular e morte direta dos parasitos. Entretanto, estudos aprofundados sobre o mecanismo de ação destes alcaloides sobre os vermes adultos de *S. mansoni* são necessários.

Este conjunto de dados aponta para um perfil de atividade esquistosomicida promissor especialmente em combinação com o praziquantel. Porém estudos adicionais de eficácia e oxicidade são necessários, além de uma melhor avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEEZ, E. H. et al. Therapeutic effect of alpha lipoic acid combined with praziquantel on liver fibrosis induced by *Schistosoma mansoni* challenged mice. **Parasitology Research**, v. 111, p. 577–586, 2012.

ABDUL-GHANI, R. et al. Artemether shows promising female schistosomicidal and ovicidal effects on the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* after maturity of infection. **Parasitology research**, v. 108, n. 5, p. 1199–205, May 2011.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. et al. Antinociceptive Profile of (-)-Spectraline: A Piperidine Alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795–799, 2003.

ARAÚJO, S. DE; MATTOS, A. DE. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International Journal of Pharmacology**, v. 337, n. 1-2, p. 307–15, June. 2007.

ARAÚJO, N. et al. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 781–785, Nov. 2008a.

ARAÚJO, N. et al. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. Aug, p. 781–785, 2008b.

ARNON, R.; SILMAN, I.; TARRAB-HAZDAI, R. Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*-functional correlates. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 8, p. 2553–2561, 1999.

BLANK, W. A et al. Long-term genetic stability and population dynamics of laboratory strains of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of parasitology**, v. 96, n. 5, p. 900–907, 2010.

BLANTON, R. E. et al. *Schistosoma mansoni* population structure and persistence after praziquantel treatment in two villages of Bahia, Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 10, p. 1093–1099, 2011.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 109–117, 2008.

CANTANHEDE, S. P. D.; FERREIRA, A. P.; MATTOS, I. E. Esquistossomose Mansônica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, v. 27, p. 297–316, 2005.

CARRARA, V. S. et al. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper species* and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of helminthology**, p. 1–6, 2013.

CASTRO, A. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, 2015.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta tropica**, v. 77, n. 1, p. 41–51, Oct. 2000.

CIOLI, D. et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 979–987, 2004.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014.

CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel medicine and infectious disease**, v. 9, n. 1, p. 6–24, Jan. 2011.

COUTO, F. F. B. et al. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. **Parasitology**, v. 137, n. 2006, p. 1791–1797, 2010.

COUTO, F. F. B. et al. *Schistosoma mansoni*: A method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. Mar, p. 153–157, 2011.

SILVA, G. B. et al. Schistosomiasis-associated kidney disease: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. 79–84, 2013.

SILVA, K. A B. S. et al. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 967–977, 2012.

SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. Schistosomiasis mansoni – Clinical features. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 28, n. 1, p. 30–39, 2005.

ALBUQUERQUE MELO, G. M. et al. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277–281, 2014.

OLIVEIRA, R. N. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 135–143, 2012.

OLIVEIRA SILVA, F. et al. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 255–259, 2011.

DIAS, K. S. T. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2713–2720, 2012.

DOENHOFF, M. J. et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1825–35, Nov. 2009.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, p. 659–667, 2008.

EL-BESHBISHI, S. N. et al. First insight into the effect of single oral dose therapy with artemisinin-naphthoquine phosphate combination in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 7, p. 521–530, 2013.

ERCOLI, N. *Schistosoma mansoni* : Neurotransmitters and the Mobility Cercariae and Schistosomules *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. v. 59, p. 204–216, 1985.

GRENFELL, R. F. Q. et al. Immunodiagnostic methods: what is their role in areas of low endemicity? **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 593947, 2012.

GRENFELL, R. F. Q. et al. Acute schistosomiasis diagnosis: A new tool for the diagnosis of schistosomiasis in a group of travelers recently infected in a new focus of *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, Nov. 2012, p. 208–213, 2013.

GRIMES, J. E. T. et al. The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 3296, 2014.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, Sep. 2006.

- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 383–397, 2012.
- GUIMARÃES, R. J. P. S. et al. Use of indicator kriging to investigate schistosomiasis in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- HAUSEN, M. A. et al. Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. **Parasitology International**, v. 60, n. 1, p. 54–58, 2011.
- HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–27, set. 2007.
- JOTHY, S. L. et al. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement. **Molecules**, v. 17, , p. 10292–10305, 2012.
- JUNIOR, C. V. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006.
- KAMEL, E. G. et al. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 388–392, 2011.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38–41, 2003.
- KATZ, N.; PEIXOTO, S. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000.
- KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; PEREIRA, J. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis III: laboratory and clinical trials with trichlorphone, an organophosphorus compound. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, n. 5, p. 237–245, 1968.
- KEISER, J.; VARGAS, M.; DOENHOFF, M. J. Activity of artemether and mefloquine against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in athymic and immunocompetent NMRI mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene (maiúsculos)**, v. 82, n. 1, p. 112–4, Jan. 2010.

KLOOS, H. et al. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. **Acta tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 194–201, 2008.

KRISHNAN, N. et al. Antimicrobial Activity Evaluation of Cassia spectabilis Leaf Extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 510–514, Apr. 2010.

KUEHN, C. C. et al. Melatonin and dehydroepiandrosterone combination: Does this treatment exert a synergistic effect during experimental Trypanosoma cruzi infection? **Journal of Pineal Research**, v. 47, p. 253–259, 2009.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. July, p. 422–435, 2010.

LI, H. et al. Effect of the in vivo activity of dihydroartemisinin against Schistosoma mansoni infection in mice. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1727–1732, 2012.

LIANG, Y. S. et al. Susceptibility of Schistosoma japonicum to praziquantel in China. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 9, p. 707–714, 2001.

LIANG, Y. S. et al. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of Schistosoma mansoni. **Journal of helminthology**, v. 84, p. 202–207, 2010.

MAGALHÃES, L. G. et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against Schistosoma mansoni adult worms. **Parasitology research**, v. 104, n. 5, p. 1197–201, Apr. 2009.

MAGALHÃES, L. G. et al. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from Dryopteris species against Schistosoma mansoni adult worms. **Parasitology Research**, v. 106, p. 395–401, 2010.

MANTAWY, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. Therapeutic Effects of Allium sativum and Allium cepa in Schistosoma mansoni experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 3, p. 155–163, 2011.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000–2011. **International Journal for Parasitology**, v. 44, Aug. p. 1055–1062, 2014.

MATTOS, A. C. A et al. Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 102, p. 84–91, 2007.

MELLIN, T. N. et al. Neuropharmacology of The Parasitic Trematode *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 1, p. 83–93, 1983.

MELO, C. M. L. DE et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis *mansoni*. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 152–158, 2011.

MENGOME, L. E. et al. In vitro activities of plant extracts on human *Loa loa* isolates and cytotoxicity for eukaryotic cells. **Parasitology Research**, v. 107, p. 643–650, 2010.

MORAES, J. DE et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 357–364, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, Dec. 1983.

MWANGI, I. N. et al. International Journal for Parasitology : drugs and drug resistance Praziquantel sensitivity of Kenyan *Schistosoma mansoni* isolates and the generation of a laboratory strain with reduced susceptibility to the drug. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 296–300, 2014.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis *mansoni*: Epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. Dec.2013, p. 29–36, 2014.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, July, p. 499–511, 2002.

PESSÔA, R. F.; CASTRO, N. G.; NOËL, F. Binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 in subcellular fractions of *Schistosoma mansoni*: Evidence for interaction with nicotinic receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1509–1516, 2005.

PICA-MATTOCCIA, L. et al. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. May, p. 307–312, 2006.

PICA-MATTOCCIA, L. et al. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 82–85, 2009.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 4, p. 527–533, Mar. 2004.

PIVATTO, M. et al. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: Fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1431–1438, 2005.

QI, L.; CUI, J. A. A schistosomiasis model with praziquantel resistance. **Discrete Dynamics in Nature and Society**, v. 2013, 2013.

RAPADO, L. N. et al. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of helminthology**, v. 85, p. 66–72, 2011.

RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2251, Jan. 2013.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. p. 413–25.

SANTOS, M. F. et al. Determination of the genetic diversity among accessions of *Senna spectabilis* ( *canafistula* ) by using RAPD markers. v. 12, n. 4, p. 6149–6155, 2013.

SATO, H.; KUSEL, J. R.; THORNHILL, J. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin. **Parasitology**, v. 125, n. 6, p. 527–35, dez. 2002.

SCHINKEL, A H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transported of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 3–29, 2003.

SILVA, D. H. S. et al. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38–46, 2010a.

- SILVA, F. et al. Central Nervous System Effects of Iso-6-spectraline Isolated from *Senna Spectabilis* var. *Excelsa* (Schrad) in Mice. **Journal of young pharmacists : JYP**, v. 3, n. 3, p. 232–6, jul. 2011a.
- SILVA, F. DE O. et al. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874–1876, 2010c.
- SILVA, F. O. et al. Iso-6-spectraline effects on convulsions induced in epilepsy models. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 232–236, 2011b.
- SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695–700, Nov. 1965.
- SOTILLO, J. et al. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 8, p. 505–516, 2015.
- SRIPHONG, L. et al. Cytotoxic Alkaloids from the Flowers of *Senna spectabilis*. **Planta Medica**, v. 69, p. 1054–1056, 2003.
- STEIN, A. C. et al. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 95–8, Aug. 2006.
- TAKAHATA, H. et al. Asymmetric synthesis of the four possible fagomine isomers. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 3603–3607, 2003.
- TLAMÇANI, Z.; ER-RAMI, M. Schistosomiasis control: moroccan experience compared to other endemic countries. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 4, p. 329–332, 2014.
- UTZINGER, J. et al. From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, 2011.
- VAN DER WERF, M. J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 125–139, May. 2003.
- VERDI, L. G. et al. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VIEGAS, C. et al. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 5, p. 908–10, May 2004.

VIEGAS, C. et al. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184–4190, 2005.

VIEGAS, C. et al. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. **Journal of natural products**, v. 70, n. 12, p. 2026–8, Dec. 2007.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1871–1877, 2012.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39–62, Jan. 2011.

WHITE, N. J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. **Science New York, N.Y.**, v. 320, n. 2008, p. 330–334, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. (Geneva). 2015 Disponível em: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/) Acesso em 22 Junho de 2015.

WINK, M. Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771–12791, 2012.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A. In Vitro and In Vivo Studies of the Effect of Artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1557-1562, 1989.

XIAO, S.-H. et al. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1440–5, Apr. 2007.

## ANEXO

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 20 de janeiro de 2014.

Prof. Marcos José Marques

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 544/2013, intitulado “Avaliação da atividade esquistossomícida de derivados cumarínicos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG