



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



Giulliano Vilela Barros

**Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos da semente de
Garcinia brasiliensis e do isolado Guttiferona-A sobre
vermes adultos do *Schistosoma mansoni***

ALFENAS MG

2013

GIULLIANO VILELA BARROS

**Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos da semente de
Garcinia brasiliensis e do isolado Guttiferona-A sobre
vermes adultos do *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde do PPG da Universidade Federal de Alfenas – MG.

Linha de pesquisa: Doenças infecciosas e parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Co-orientador: Prof^a. Dra. Raquel Lopes M. Souza

ALFENAS MG

2013

GIULLIANO VILELA BARROS

**Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos da semente de
Garcinia brasiliensis e do isolado Guttiferona-A sobre
vermes adultos do *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–MG. Área de concentração: Doenças
infecciosas e parasitárias

Aprovada em 07 de outubro de 2013.


Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Instituição Universidade Federal de Lavras

Assinatura: 

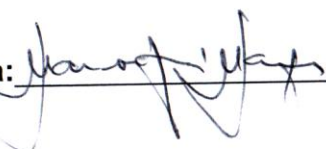
Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Instituição Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, familiares e amigos e à minha querida esposa Gésika, grande incentivadora e companheira em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, orientador desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, exigência e, acima de tudo, compreensão. Exemplo de ética e cidadania, um profissional dedicado que sempre acreditou e confiou na minha capacidade. Obrigado pela amizade, cuidado e, sobretudo, pela sua paciência em todos os momentos.

À Profa. Dra. Raquel Lopes Martins Souza, minha estimada co-orientadora, pessoa que sempre esteve do meu lado ajudando e incentivando. Grande colaboradora, que contribuiu muito para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), representada pelo Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, pela oportunidade oferecida.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, em especial à Dra. Ana Carolina Alves de Mattos, uma profissional muito dedicada a ajudar. Sua colaboração foi de extrema importância para o êxito deste trabalho. Muito obrigado.

À minha amiga Aline Pereira pelo apoio oferecido e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessitei. Sua participação foi de grande importância para a conclusão deste estudo. Obrigado mais uma vez.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), que compartilharam não apenas nos momentos felizes, mas especialmente contribuíram nos momentos difíceis para que atingisse meus objetivos.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Básica, especialmente ao Professor Adir Araújo, pela amizade e pelo suporte técnico e científico que proporcionaram para realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Juliana, Anelique, Ursuléia, Diego, Naira, Matheus, e ao técnico de laboratório Marcus, pelo apoio oferecido durante os experimentos. Sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível ser concluído, muito obrigado pela colaboração.

Aos amigos Dener e Rubens, pela companhia nas viagens a congressos e treinamentos.

À querida esposa Gérsika, por ser tão importante na minha vida. Sempre do meu lado, pondo-me pra cima e me fazendo acreditar que posso mais do que eu imagino. Com o seu incentivo, apoio, companheirismo, dedicação e amizade, você contribui muito para que o meu sonho se tornasse realidade. Meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais José Maria e Berenice, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam o melhor de todos, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser o melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigado pelo amor incondicional.

À minha irmã, Christiane, ao meu cunhado Marcus e ao meu sobrinho Marquinho Tevez meu agradecimento especial, pois, aos seus modos sempre confiaram em meu trabalho. Obrigado pela confiança!

A meus tios, tias, primos e primas, especialmente a Tia Fátima, que vibrou comigo, desde a aprovação na prova, e sempre fez “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigado pela força!

Agradeço também aos meus sogros, Gérson e Lena e aos meus cunhados Léo e Juninho, pelo incentivo e apoio. Obrigado pelo carinho!

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes aconselhando-me e incentivando-me com carinho e dedicação.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para esta formação que se torna mais uma vitória em minha vida, os meus sinceros agradecimentos. Ninguém vence sozinho... Obrigado a todos!

“Toda pesquisa é um permanente início-reinício em ciclos convergentes que representam a expressão pessoal cada vez mais livre, produtiva e construtiva em prol do benefício de todos.”

Cerato SMM

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária grave e de larga distribuição geográfica, que acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo e ao menos 700 milhões vivem em área de risco. No Brasil a doença é conhecida por xistose ou barriga d'água e é causada pelo *Schistosoma mansoni*, parasito pertencente ao filo Platyhelminthes, cujo verme adulto tem como hábitat o sistema porta do hospedeiro. O agente etiológico em questão apresenta um ciclo do tipo heteroxênico, sendo o caramujo do gênero *Biomphalaria* o hospedeiro intermediário e, o homem, o principal hospedeiro definitivo. Os saneamentos básicos juntamente com orientações à população constituem as principais medidas profiláticas. O tratamento também deve ser considerado no controle e na profilaxia da doença, o qual é baseado no uso de oxamniquina e praziquantel. Como somente o praziquantel tem sido usado na terapêutica de esquistossomose há a necessidade de descoberta de novos medicamentos para o tratamento dessa parasitose; além da urgente demanda relacionada ao aparecimento de linhagens do verme resistentes. A justificativa para novas alternativas terapêuticas está pautada em um tratamento com menor duração, menos efeitos adversos e que não apresente resistência do parasito. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade esquistossomicida do extrato etanólico da semente de *Garcinia brasiliensis*, bem como das frações hexânica, acetato-etílica e aquosa, obtidas por partição, a partir do extrato etanólico da semente. Também foi analisada a atividade de um constituinte puro, isolado dessa espécie, uma benzofenona denominada Guttiferona-A. A avaliação do efeito do extrato da semente da planta, das frações e do composto purificado sobre o *S. mansoni* foi realizada em vermes adultos em testes *in vitro*, na qual se quantificou a taxa de mortalidade e monitoraram-se os danos na superfície da membrana e atividade do sistema excretor. Essas observações também foram realizadas com o uso dos marcadores fluorescentes Hoechst 33258 e Resorufin, respectivamente. Nos estudos realizados com a GUT-A, a atividade esquistossomicida significativa foi presenciada a partir da concentração de 18,0 µg/mL nos ensaios *in vitro*, onde foi capaz de matar 100,0% dos parasitos, com 24 horas de incubação, permitindo chegar ao valor de ED₅₀ em 21,8 µg/mL. Os resultados mostraram a alta capacidade esquistossomicida do extrato da semente, das frações e da GUT-A em vermes

adultos nos testes realizados *in vitro*. Os marcadores fluorescentes comprovaram a ação dos compostos testados, evidenciando os danos causados no sistema excretor dos parasitos, bem como lesões no tegumento, frente à exposição a várias concentrações analisadas. Ensaio posteriores serão realizados tendo como abordagem principal o mecanismo de ação da GUT-A em vermes adultos e em outras fases do ciclo de vida do *S. mansoni*, em testes *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. *Garcinia brasiliensis*. Benzofenonas. Guttiferona-A.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a severe parasitic disease with large geographical distribution, affecting nearly 200 million people worldwide and at least 700 million live in risk areas. In Brazil the disease is known as “xistose” and “water belly” and is caused by *Schistosoma mansoni*, a parasite who belongs to the flatworm phylum, in which the adult worm lives in the portal system of the liver. The etiologic agent has a heterogenic life cycle, in which the intermediate hosts are snails of the *Biomphalaria* genus, and humans are the primary hosts. The main prophylactic measures include basic sanitation and public orientation. The treatment must also be considered in the control and prophylactics of the disease, which is based on the use of oxamniquine and praziquantel. Since only praziquantel has been used during schistosomiasis therapy there is a need for the discovery of new medications for parasite treatment; along with the urgent demand in relationship to resistant strains of the parasite. The justification for new, alternative therapy is guided by a shorter term treatment, with fewer side effects, and one that doesn't provide resistance to the parasite. Thus, this work has as its objective to evaluate the schistosomicidal effect of the ethanolic extract of the *Garcinia brasiliensis* seed, along with the hexonic fractions, ethylic-acetate, and aquose, obtained through partition, from the ethanolic extract of the seed. The activity of a pure constituent which was isolated from this species, a benzophenone named Guttiferona-A. The evaluation of the seed extract, fraction, and pure compound effects on *S. mansoni* were done on adult worms *in vitro*, in which the mortality rate was quantified and excretory system, surface membrane damage was monitored. These observations were also made using the fluorescent markers Hoechst 33258 e Resorufin, respectively. On studies using GUT-A, significant schistosomicidal activity was witnessed in tests *in vitro* starting with concentrations of 18.0 µg/mL, where it was able to kill 100% of parasites, after 24 hours of incubation, allowing it to reach the ED₅₀ value of 21.8 µg/mL. The results show a high schistosomicidal effect from the seed extract, from the fractions, and from GUT-A on adult worms used in tests *in vitro*. The fluorescent markets proved the effects of the compounds tested, showing the damaged caused to the excretory system, along with lesions to the integument, after exposure to various concentrations were examined. Further tests will be made having as a main

approach the effect mechanism of GUT-A on *S.mansoni* adult worms and organisms in other phases of the life cycle, in tests *in vitro* and *in vivo*.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis. *Garcinia brasiliensis*. Benzophenones. Guttiferona-A.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Ciclo de vida do <i>Schistosoma ssp</i>	24
FIGURA 2	- Estrutura química da Oxaminiquina	26
FIGURA 3	- Estrutura química do praziquantel	28
FIGURA 4	- Árvore, fruto e semente da <i>Garcinia brasiliensis</i>	37
FIGURA 5	- Anel difenilmetanona.....	38
FIGURA 6	- Anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.....	38
FIGURA 7	- Exemplos de acilfloroglucinóis proliprenilados.....	39
FIGURA 8	- Estrutura química da Resorufin.....	44
FIGURA 9	- Estrutura química da Hoechst 33258.....	45
FIGURA 10	- Esquema do ensaio biomonitorado para extração e purificação dos constituintes a partir da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i>	50
FIGURA 11	- Esquema prático para a marcação dos vermes com a sonda Resorufin.....	55
FIGURA 12	- Esquema prático para a marcação dos vermes com a sonda Hoechst 33258.....	57
FIGURA 13	- Cromatograma do extrato etanólico da semente obtido por cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
FIGURA 14	- Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	59
FIGURA 15	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	62
FIGURA 16	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da fração hexânica da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	63
FIGURA 17	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da fração acetato-etílica da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	64

FIGURA 18 - Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da fração aquosa da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	65
FIGURA 19 - Atividade <i>in vitro</i> da Guttiferona-A sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	68
FIGURA 20 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da Guttiferona-A sobre o tegumento dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	68
FIGURA 21 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da Guttiferona-A sobre o sistema excretor de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> marcados pela sonda Resorufin	70
FIGURA 22 - Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da GUT-A sobre o tegumento de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> marcados pela sonda Hoechst 3358	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Principais componentes encontrados no extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	59
TABELA 2	- Principais componentes encontrados na fração acetato etílica da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	60
TABELA 3	- Análise dos parâmetros esquistossomicidas do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> nas concentrações 50,75 e 100 µg/mL.	61
TABELA 4	- Análise dos parâmetros esquistossomicidas das frações hexânica, acetato de etila e aquosa, obtidas da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> frente ao ED ₉₀	66
TABELA 5	- Análise dos parâmetros esquistossomicidas da Guttiferona-A em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	–	Cromatografia em coluna de sílica gel
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
ED ₅₀	–	Dose efetiva para matar 50% dos vermes
ED ₉₀	–	Dose efetiva para matar 90% dos vermes
EES	–	Extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i>
FAS	–	Fração aquosa do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i>
FAES	–	Fração acetato de etila do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i>
FHS	–	Fração hexânica do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i>
FIOCRUZ	–	Fundação Oswaldo Cruz
GUT-A	–	Guttiferona-A
LE	–	Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem susceptível ao PZQ mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ
7-EPI	–	7- Epiclusianona
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
OXA	–	Oxaminiquina
PZQ	–	Praziquantel
SFB	–	Soro fetal bovino
UNIFAL -MG	–	Universidade Federal de Alfenas- Minas Gerais
WHO	–	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos:.....	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Esquistossomose	22
3.1.1	Tratamento	25
3.1.1.1	Oxaminiquina	26
3.1.1.2	Praziquantel	27
3.2	Resistência às drogas esquistossomicidas	30
3.3	Testes de novos compostos naturais com potencial esquistossomicida	33
3.3.1	Plantas medicinais.....	33
3.3.2	Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica	34
3.3.3	A espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	35
3.3.3.1	Estudos fitoquímicos	38
3.4	Plantas com atividade esquistossomicida	40
3.5	O uso da fluorescência no estudo de mecanismo de ação	43
3.5.1	Microscopia de fluorescência	43
3.5.2	O uso das sondas fluorescentes para marcações nos parasitos	44
4	JUSTIFICATIVA	46
5	METODOLOGIA	48
5.1	Coleta do material vegetal.....	48
5.2	Estudo fitoquímico	48
5.2.1	Preparo do extrato,das frações e isolamento das substâncias	48

5.2.2	Extração e purificação da GUT-A.....	49
5.2.3	Análises cromatográficas	50
5.3	Ensaio esquistossomicidas.....	51
5.3.1	Parasitas	51
5.3.1.1	Caramujos.....	51
5.3.1.2	Exame e infecção dos caramujos.....	51
5.3.2	Animais utilizados.....	52
5.3.3	Infecção dos camundongos.....	52
5.3.4	Obtenção dos parasitos.....	52
5.4	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do extrato etanólico da semente de <i>Garcinia brasiliensis</i> (EES) de suas frações: hexânica (FHS), acetato de etila (FAES) e aquosa (FAS) e da molécula isolada GUT-A sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	53
5.5	O uso de sondas fluorescentes na avaliação <i>in vitro</i> de atividade excretora e danos no tegumento causada pela GUT-A em vermes adultos do <i>Schistosoma mansoni</i>	54
5.5.1	Microscopia de fluorescência	54
5.5.2	Avaliação da atividade excretora após a exposição à GUT-A.....	54
5.5.3	Avaliação de dano no tegumento após a exposição à GUT-A.....	56
5.6	Análises estatísticas.....	57
6	RESULTADOS	58
6.1	Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação do EES de <i>G. brasiliensis</i>	58
6.2	Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação das frações FHS, FAES e FAS obtidas por partição	59
6.3	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do extrato etanólico da semente (EES) de <i>Garcinia brasiliensis</i> sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	60
6.3.1	Cálculo do ED ₅₀ do EES de <i>G. brasiliensis</i>	61

6.4	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FHS obtidas por partição do EES de <i>G. brasiliensis</i> sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	62
6.4.1	Cálculo do ED ₅₀ do FHS.....	62
6.5	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FAES obtidas por partição do EES de <i>G. brasiliensis</i> sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	63
6.5.1	Cálculo do ED ₅₀ do FAES.....	64
6.6	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FAS obtidas por partição do EES de <i>G. brasiliensis</i> sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	64
6.7	Comparação dos resultados <i>in vitro</i> do EES e das frações, FHS, FAES, FAS, em relação ao controle PZQ sobre vermes adultos <i>S. mansoni</i>	65
6.8	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do composto purificado GUT-A sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	66
6.8.1	Cálculo do ED ₅₀ da GUT-A.....	67
6.9	Marcação do sistema excretor dos vermes adultos com a sonda Resorufin após exposição à GUT-A.....	69
6.10	Avaliação dos danos tegumentares nos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após a exposição <i>in vitro</i> à GUT-A utilizando a sonda Hoescht 33258.....	69
7	DISCUSSÃO	72
8	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma infecção causada por helmintos, que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, com 779 milhões de pessoas vivendo em áreas risco de infecção (GRYSEELS et al., 2006). É uma doença de veiculação hídrica, cujos agentes etiológicos são representados por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Ocupa o segundo lugar entre as doenças tropicais, depois da malária, em importância e repercussão sócio-econômica (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO - GENEVE, 2012). Constituindo grande problema de saúde pública, essa endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer (KATZ E PEIXOTO, 2000).

As espécies de interesse médico são: *Schistosoma mansoni*, única espécie que ocorre no Brasil, causadora da esquistossomose mansônica; *Schistosoma haematobium*, causador da esquistossomose vesical e *Schistosoma japonicum*, responsável pela esquistossomose japônica (KATZ E ALMEIDA, 2003). A importância da esquistossomose mansônica, no quadro das endemias parasitárias, deve-se a sua vasta distribuição, sendo encontrada em 74 países na África, Oriente Médio, América do Sul, Caribe, Filipinas e sudeste da Ásia (WHO, 2012).

No Brasil, a esquistossomose é um grave problema de saúde pública, pois abrange 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de intensa transmissão, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média extensão e focos isolados (COURA e AMARAL, 2004). Segundo Katz e Peixoto (2000), mais de oito milhões de pessoas estão infectadas, enquanto outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção.

A doença é crônica e insidiosa, sendo pouco comum seu diagnóstico em estágios iniciais; sua evolução pode levar ao desenvolvimento de formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas, fazendo-se necessárias novas pesquisas à procura de novos tratamentos, a fim de diminuir a incidência da parasitose. A doença pode causar, quando na forma sintomática, hepato e esplenomegalia culminando em uma distensão abdominal, conhecida como barriga d'água. A infecção apresenta risco nas manifestações patológicas do sistema hepato-esplênico e do trato gastrointestinal (CHITSULO et al.,

2000 ; NEGHINA et al., 2009). Para se realizar o diagnóstico clínico, deve ser considerada a fase da doença, permitindo, assim, um tratamento específico.

O praziquantel (PZQ) é utilizado para tratar a esquistossomose humana, uma vez que pode eliminar os vermes adultos, durante a fase crônica da infecção (ARAGÃO et al., 2009; SAYED et al., 2008); a Oxaminiquina (OXA) é outro fármaco disponível, mas a sua utilização é limitada, não sendo eficaz contra todas as formas do parasito (FERRARI et al., 2003). Atualmente, o PZQ tem sido o fármaco de escolha para o tratamento quimioterápico, mas seu uso extensivo e inapropriado culminou no aparecimento de resistência (CAFFREY, 2007; DOENHOFF et al., 2008)

Portanto, a busca de novos fármacos esquistossomicidas mais eficazes se tornou necessária. Neste contexto, as plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que poderiam servir de moldes para o planejamento de novos fármacos. Apesar do aumento do número de pesquisas nessa área, dados revelam que somente cerca de 17% das plantas catalogadas no mundo foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Hoje apenas 25% dos produtos farmacêuticos prescritos são originados de substâncias encontradas em espécies naturais (VARANDA, 2006; REIS et al., 2007).

Das cerca de 100 mil espécies de plantas catalogadas no Brasil, apenas 8% tiveram seus compostos químicos estudados e estima-se que somente 1100 espécies foram avaliadas quanto ao uso terapêutico (VARANDA, 2006; REIS et al., 2007). Essa grande diversidade ainda desconhecida constitui importante fonte para descoberta de novos fármacos (ANTHONY et al., 2005).

Tendo em vista a necessidade de buscar novos medicamentos para o tratamento da esquistossomose mansônica e os resultados promissores de extratos de plantas sobre o *S. mansoni*, este presente estudo se propõe a avaliar a atividade esquistossomicida de extratos da semente de *Garcinia brasiliensis*, buscando o isolamento de moléculas como um grande potencial terapêutico para uso no tratamento da esquistossomose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

✓ Avaliar a atividade *in vitro* dos extratos da semente de *Garcinia brasiliensis* e do isolado Guttiferona-A sobre vermes adultos do *Schistosoma mansoni*

2.2 Objetivos específicos:

✓ Verificar a atividade esquistossomicida do extrato etanólico e das frações hexânica, acetato de etila e aquosa, obtidas por partição da semente de *Garcinia brasiliensis* sobre os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em testes *in vitro*;

✓ Analisar a atividade esquistossomicida da Guttiferona-A (GUT-A) sobre os vermes adultos de *S. mansoni* em testes *in vitro*;

✓ Avaliar os danos causados sobre o sistema excretor do verme adulto de *Schistosoma mansoni* após a exposição à GUT-A;

✓ Avaliar os danos provocados pela GUT-A sobre o tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Esquistossomose

A esquistossomose continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo (ENGELS et al., 2002). É uma doença parasitária que infecta mais de 207 milhões de pessoas em 76 países, com mais de 779 milhões de pessoas sob o risco de infecção ao redor do mundo (STEINMAN et al., 2006). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (VAN DER WER et al., 2003). A doença é crônica e insidiosa, sendo pouco comum seu diagnóstico em estágios iniciais; sua evolução pode levar ao desenvolvimento de formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (ENGELS et al., 2002).

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Das espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, as de maior relevância são: *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907), *S. haematobium* (BILHARZ, 1852) e *S. japonicum* (KATSURADA, 1904) (PARAENSE, 1975), causadores, respectivamente, da esquistossomose mansônica, hematóbica e japônica.

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de intensa transmissão, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média extensão e focos isolados (COURA E AMARAL, 2004; TELES, 2005). Segundo Katz e Peixoto (2000), mais de oito milhões de pessoas estão infectadas, enquanto outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção. Essa endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, o que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer.

Schistosoma mansoni possui um ciclo evolutivo complexo que envolve uma reprodução assexuada ocorrida no molusco (hospedeiro intermediário) e uma reprodução sexuada ocorrida no hospedeiro vertebrado (FIGURA 1). Os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado (geralmente o homem) no meio aquático. Por eclosão, os ovos eliminados liberam os miracídios, que penetram no

hospedeiro intermediário específico, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, por movimentos rotatórios e ação lítica.

Após a penetração, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas e de penetração). Após uma série de transformações morfológicas, a larva passa a ser chamada esporocisto primário e, na 2ª semana após a penetração, esporocisto secundário. Ocorre, então, uma migração entre os tecidos dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início a proliferação das células germinativas e origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 30 dias. Milhares de cercárias são produzidas por cada esporocisto que as liberam de forma intermitente nas horas mais claras do dia, já que a liberação das cercárias pelos caramujos é induzida pela luz e temperaturas mais altas.

As cercárias eliminadas pelo molusco nadam ativamente e, ao encontrar o hospedeiro definitivo, penetram na pele ou mucosas e perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos. Estes migram para os vasos sanguíneos, dirigindo-se aos pulmões e destes, para o fígado (onde ocorre a maturação dos vermes). Após o acasalamento, os vermes adultos alcançam as veias mesentéricas inferiores e realizam a postura dos ovos. Parte desses ovos ganha à circulação e depositam-se no fígado, gerando os granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais, e parte destes alcançar a luz intestinal, sendo eliminados pelas fezes.

Os hospedeiros invertebrados do *S. mansoni* são moluscos do gênero *Biomphalaria*, pertencentes à subclasse *Pulmonata*, ordem *Basommatophora*, família *Planorbidae*. No Brasil, existem dez espécies e uma subespécie pertencentes a esse gênero, mas somente três já foram encontradas eliminando cercárias em condições naturais. São elas: *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818), *B. tenagophila* (ORBIGNY, 1835), *B. straminea* (DUNKER, 1848) (PARAENSE, 1975).

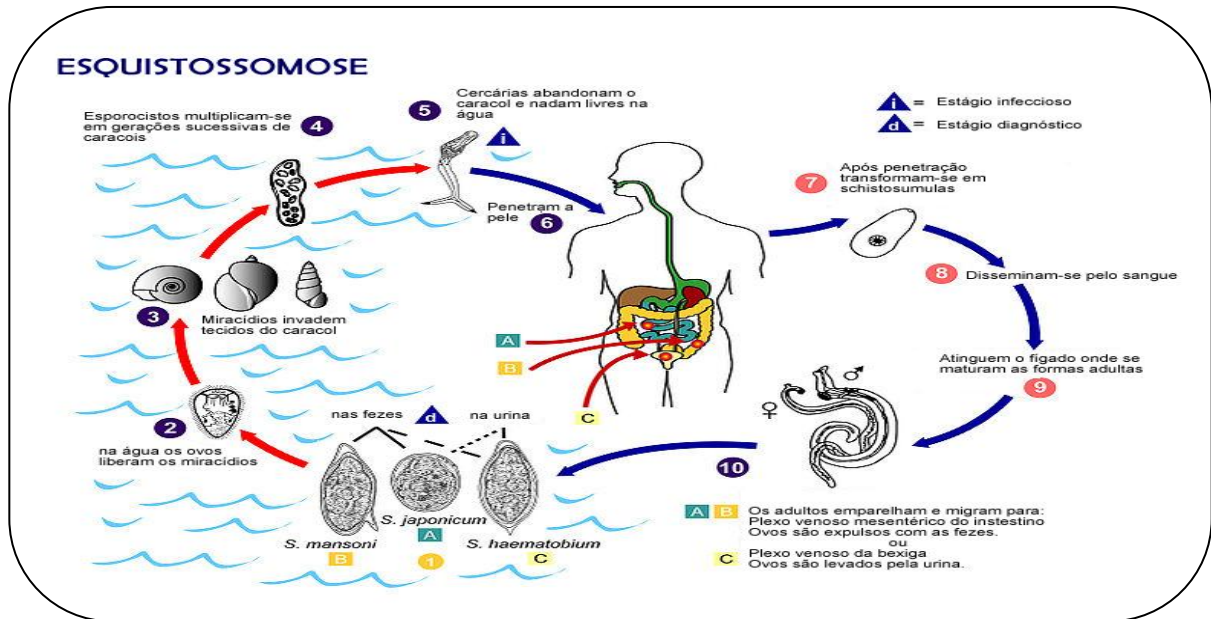


FIGURA 1: Ciclo de vida do *Schistosoma* spp

Fonte: <http://www.leomarbiologo.blogspot.com.br/2012/07/esquistossomose.html>

Caramujos da espécie *B. glabrata* possuem uma ampla distribuição geográfica e quase sempre está associada à transmissão da esquistossomose. De fato, *B. glabrata* já foi notificada em 16 estados brasileiros, além de no Distrito Federal. Caramujos da espécie *B. straminea* apresentam maior importância epidemiológica na Região Nordeste. A espécie *B. tenagophila* é encontrada numa faixa litorânea, de forma quase contínua, a partir do sul do Estado da Bahia até o Estado do Rio Grande do Sul (Brasil, 2008).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, hospedeiros intermediários. De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2008), a partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o principal objetivo passou a ser o controle da morbidade, com ênfase no tratamento quimioterápico.

Segundo a WHO (1993), a quimioterapia é a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença. Contudo, a estratégia atual é conjugar o controle quimioterápico com medidas preventivas, como a educação em saúde e o saneamento, além do controle dos hospedeiros intermediários, por meio do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático (Brasil, 2008). Conforme Coura e Amaral (2004), o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões, a saber:

disseminação dos hospedeiros intermediários; altos custos para a implementação de condições sanitárias ideais e de suprimento de água tratada; dificuldades para proteção individual.

Assim, verifica-se a continuidade de um intenso contato com águas naturais, propiciando reinfecção. O longo tempo necessário para a educação sanitária funcionar adequadamente e para atingir a adesão das comunidades de maneira efetiva aos programas de controle é outro problema complexo.

A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo e do tratamento instituído. Desse modo, a esquistossomose pode se apresentar sob duas formas: aguda ou crônica. Na fase aguda, com início no momento da infecção (dermatite) e considerada como tal até os 120 dias após a infecção, o paciente pode apresentar febre, dor de cabeça, calafrios, suores, fraqueza, falta de apetite, dor muscular, tosse, diarreia e uma imunopatologia mais exacerbada (granulomas maiores do tipo necrótico exudativo).

A fase crônica, com início a partir de 120 dias após a infecção, com a reação imunoinflamatória imunomoduladora, pode se apresentar de três formas: a digestiva intestinal, a hepatointestinal, ambas mais brandas, e a hepatoesplênica, mais grave, podendo ser compensada ou descompensada. Na infecção pelo *S. mansoni*, a fase crônica da doença é o resultado da resposta do hospedeiro ao acúmulo de ovos no tecido hepático. A resposta das células induzidas por antígenos presentes nos ovos promove o desenvolvimento de lesões granulomatosas ao redor do ovo (DUNNE E PEARCE,1999).

3.1.1 Tratamento

Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose são a Oxaminiquina (Mansil[®] – Pfizer S.A) e o praziquantel (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ).

1.1.1.1 Oxaminiquina

Richards e Foster (1969) e Baxter e Richards (1971), trabalhando na Pfizer (Sandwich, Inglaterra), descreveram uma nova série de derivados 2-amino-metil-tetrahydroquinolínicos que apresentaram ação marcante esquistossomicida. Dos mais de 50 derivados ensaiados, foi escolhido como dos mais promissores o UK3883.

Esse composto além da ação curativa em dose oral única apresentou também atividade profilática e ação contra todos os estágios imaturos em camundongos (FOSTER et al.1971). Por metabolismo oxidativo, esse derivado UK 3883 gerava o produto UK 4271. Ao se reconhecer neste metabólito a atividade principal, o mesmo passou a ser produzido por síntese, o qual foi denominado Oxaminiquina (OXA) (KAYE e WOOLHOUSE 1972, FOSTER et al. 1973, FOSTER,1973).

O mecanismo de ação da Oxaminiquina parece estar relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese dos ácidos nucléicos nos vermes (CIOLI et al.1995). Em todos os testes realizados, os vermes machos mostraram-se mais susceptíveis à droga do que as fêmeas. Em doses terapêuticas mostra maior eficácia ao *S. mansoni* e não tem nenhum efeito notável sobre outros *Schistosoma* spp que parasitam seres humanos (FOSTER,1973).

No Brasil, a OXA tem mostrado ser bem tolerada. Uma dose oral única de 15 mg/kg para adultos e duas doses diárias de 10 mg/kg para crianças mostraram taxas de cura de mais de 83%, quando sua eficácia foi avaliada por meio de exames de fezes. No entanto, quando biópsia retal (oograma quantitativo) foi utilizada para avaliar a cura após tratamento com Oxaminiquina (15-18 mg/kg), a taxa de cura foi de apenas 38,3% (FERRARI, 2003).

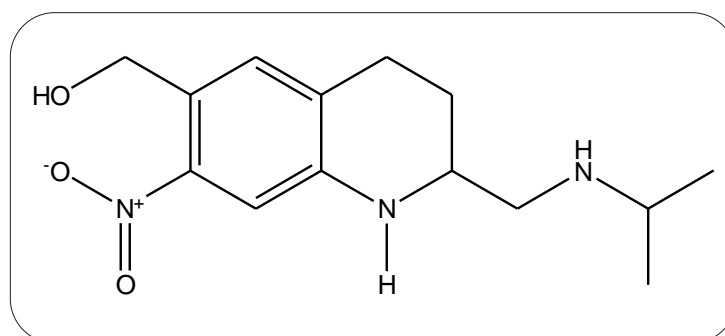


FIGURA 2 – Estrutura química do oxaminiquina

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Oxaminiquina>

A OXA reduz muito o número de ovos viáveis na mucosa retal, porém há indícios de que pacientes não-curados têm uma carga parasitária leve, com isso apresenta dificuldades na detecção da infecção por meio de exames de fezes (FERRARI, 2003). Nem todos os pacientes de áreas endêmicas de *S. mansoni* que tomaram OXA (15 mg/kg para adultos e 20 mg/kg para crianças) foram curados.

Os efeitos adversos observados nos pacientes após a administração de OXA são leves, de curta duração e, frequentemente, estão associados ao sistema nervoso central, como o aparecimento de vertigens, sonolência e dores de cabeça. Outros sintomas, como desconforto abdominal, vômito e diarreia, além de sintomas associados à destruição do parasito, como febre e eosinofilia, também são observados (CIOLI et al., 1995).

A resistência a OXA é caracterizada pela perda da enzima ativadora da sua ação a sulfotransferase. Esta enzima está presente apenas em vermes sensíveis (PICA-MATTOCCIA et al., 1993). Cioli e colaboradores (1992) sugerem que o fenótipo de resistência a hycantone (similar a OXA) está relacionado apenas a um gene autossômico recessivo.

Embora a OXA seja, em geral, bem tolerada como mostrado por Prata et al. (1975), alguns estudos demonstram que podem ocorrer sérios efeitos sobre o sistema nervoso central após sua administração (BINA et al., 1976; KRAJDEN et al., 1983; CARVALHO et al., 1985).

Atualmente, a OXA está sendo pouco indicada no Brasil e esse fármaco vem sendo substituído pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto em campanhas de saúde pública como na clínica, tendo em vista sua boa eficiência e baixo custo na produção do medicamento pela FIOCRUZ.

1.1.1.2 Praziquantel

O PZQ (FIGURA 3) é um derivado sintético pirazino-isoquinolínico e é, atualmente, o medicamento de escolha, segundo a OMS, para o tratamento em larga escala da esquistossomose, sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* (DOENHOFF et al., 2002).

Sua preparação comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de levo R (-) e dextro S (+) isômeros. Porém, apenas o enantiômero (-) possui atividade esquistossomicida (XIAO e CATTO, 1989; Wu et al., 1991).

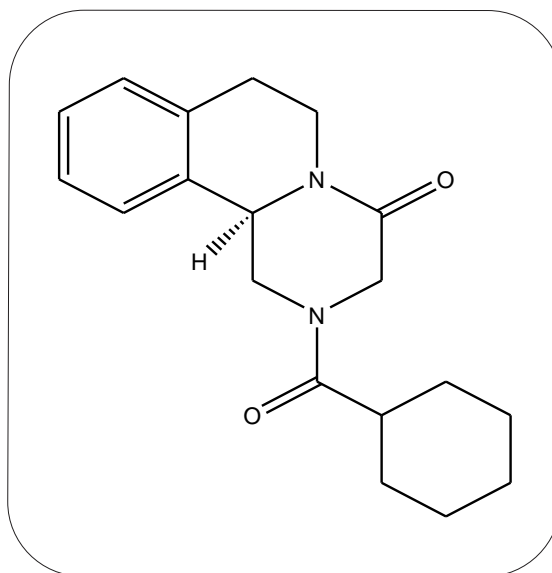


FIGURA 3 – Estrutura química do praziquantel
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Praziquantel>

O PZQ tem sido estudado experimentalmente em animais desde 1975, mostrando-se altamente eficaz contra infecções de várias espécies de trematódeos e cestódeos, principalmente: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. matheei*, *S. bovis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* além de *Diphyllobothrium latum*, *Cysticercus bovis*, *Cysticercus cellulosae*, *Echinochasmus fujianensis* e *Opisthorchis viverrini*. Este medicamento atua contra os vermes maduros, imaturos e na fase larval dos cestódeos (NOVAES et al., 1999).

A dose recomendada para o tratamento da esquistossomose mansônica e hematóbica é de 40-60mg/Kg em dose única, sendo utilizadas doses mais elevadas nos casos de esquistossomose japônica e em alguns países africanos (WHO, 2002). Em geral, o PZQ apresenta baixa toxicidade e sua eliminação ocorre através da urina e fezes após 24 horas (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003). É efetivo em pacientes de todas as idades e em diferentes formas clínicas da doença, inclusive na forma hepatoesplênica descompensada (BASSILY et al., 1985) e atua mais eficientemente contra os vermes fêmeas.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na tentativa de esclarecer o modo de ação do PZQ, existem muitas perguntas a elucidar (DAY et al., 1992; REDMAN et al., 1996; CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003). No entanto, alguns efeitos desse fármaco sobre o parasito já estão bem esclarecidos, como contração muscular, dano tegumentar e alterações metabólicas (PAX et al.,1978; BECKER et al., 1980; FETTERER et al.,1980; MEHLHORN et al., 1981; LIMA et al., 1994; RIBEIRO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006).

A contração muscular é um dos primeiros efeitos observados no verme exposto ao fármaco *in vivo* ou *in vitro* (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003). Em decorrência da contração, os vermes perdem a capacidade de fixação, devido ao relaxamento da ventosa ventral (acetábulo), e são arrastados para o fígado, onde ocorrem reações inflamatórias, e, em conjunto com outras lesões, culminará com a eliminação dos parasitos.

As alterações causadas no tegumento também são observadas logo após o contato com o fármaco e são devidas à vacuolização na base do tegumento, seguidas de bolhas na superfície (PAX et al., 1978). Além disso, o PZQ gera alteração na fluidez da membrana do verme e desestabilização do tegumento (LIMA et al., 1994). Estas alterações causam a morte direta do parasito ou ainda podem levar à exposição de antígenos, que seriam rapidamente reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro e este, em conjunto com o fármaco, eliminaria o parasito (HARNETT e KUSEL, 1986; DOENHOFF et al., 1987; MODHA et al., 1990).

Acredita-se que a maioria desses mecanismos de ação do PZQ sejam processos dependentes de Ca^{2+} (CIOLI et al., 1995), uma vez que foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, realizados em meio de cultura livre de Ca^{2+} , o bloqueio dessas respostas (PAX et al.,1978; WOLDE MUSSIE et al., 1982; XIAO et al., 1984). Sugere-se, ainda, que o PZQ atue inibindo canais de cálcio (GREENBERG, 2005), uma vez que, com a interferência na função desses canais do parasita, foi possível obter um nível significativo de inibição da atividade esquistossomicida do PZQ (PICA-MATTOCCIA et al., 2007).

Em experimentos *in vitro*, após a exposição ao PZQ, foi possível observar uma depleção do conteúdo de glutatona dos parasitos (RIBEIRO et al., 1998). A glutatona é um tripeptídeo fundamental para a sobrevivência das células, atuando

em processos como a síntese do DNA e proteínas, atividade enzimática, transporte e proteção celular (MEISTER e ANDERSON, 1983).

Oliveira et al. (2006) demonstraram que o PZQ é, também, capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos de *S. mansoni* e esta pode ser recuperada, dependendo da concentração do fármaco, após retirada do medicamento. Estudos anteriores também mostram que a ação do PZQ ocorre apenas em vermes adultos, causando sua morte por efeitos diferentes, tais como a paralisia e a danos em seus tegumentos (ARAGÃO et al., 2009; KEISER et al., 2009).

3.2 Resistência aos fármacos esquistossomicidas

Apesar da disponibilidade de fármacos de alta eficácia e baixa toxicidade, como OXA e PZQ, já foram relatados casos de resistência a esses fármacos, e a reinfeção ainda é um grande problema no controle desta doença. Os principais fatores que podem levar ao desenvolvimento de resistência a fármacos são o tratamento de apenas uma parte da população infectada, tratamentos em intervalos de tempo muito grandes, mudanças da dosagem do fármaco utilizado por um programa de controle e o tratamento com doses não curativas (SILVA et al., 1997).

Resistência a fármacos pode ser definida como a diminuição permanente ou transitória da sensibilidade dos organismos a efeitos de fármacos que interferem nas suas funções vitais. A resistência aparece nos descendentes dos parasitos que apresentaram resposta quimioterápica diminuída. A tolerância a fármacos não deve ser confundida com a resistência. Esta ocorre quando um parasito que nunca havia tido o contato com o fármaco apresenta diminuição na resposta terapêutica (COLES et al., 1986).

As primeiras observações de que certos parasitos podem ser resistentes a fármacos foram feitas estudando-se o Gênero *Trypanosoma*. Outras observações foram realizadas em diversos organismos como vírus, fungos, bactérias, protozoários, vermes e alguns artrópodes (COWMAN, 2001; CORTESE et al., 2002; WOOTTON et al., 2002). Os mecanismos de resistência a fármacos em muitos organismos são freqüentemente similares e os mais comuns são: diminuição na captação do fármaco pela célula, diminuição ou inativação do fármaco após a sua entrada, alteração da formação do complexo molecular alvo-fármaco, exclusão do fármaco da célula e maior eficiência do reparo de DNA quando esse é danificado.

Além disso, os mecanismos de ativação do fármaco podem ser suprimidos ou perdidos. A interação do fármaco com o alvo pode ser menos efetiva devido ao aumento da competição pelo substrato ou pela alteração do alvo. Os estudos dos mecanismos de resistência a fármacos podem ajudar na identificação de organismos resistentes antes do tratamento.

Em relação à esquistossomose, desde a década de 1970 foi relatada resistência a Oxaminiquina de cepas de campo e de laboratório. Em 1971, Rogers e Bueding demonstraram, pela primeira vez, a existência de uma cepa de *S. mansoni* resistente a uma droga esquistossomicida. (ARAÚJO et al., 1980; SILVA et al., 1997; BONESSO-SABADINI e SOUZA DIAS, 2002).

Alguns trabalhos registraram a ocorrência de resistência ao PZQ em algumas cepas de *S. mansoni* isolados da África e do Brasil. No entanto, estes resultados são controversos (FALLON et al., 1995; TSAI MH et al., 2000, LIANG, Y.S et al., 2001; WILLIAM et al., 2001; BONESSO-SABADINI et al., 2002). Alguns autores consideram que a diminuição da eficiência deste fármaco seja devido à alta intensidade de infecção ou a diferentes condições imunológicas do hospedeiro, e não ao aparecimento de vermes resistentes (GRYSEELS et al., 2001, ANTHONY e SAKE, 2002).

Protocolos para medir a dose de PZQ necessária para matar 50% de parasitos (ED_{50}) têm sido usados para monitorar a resistência ao fármaco em cepas de campo. A susceptibilidade de cepas de campo brasileiras aos fármacos OXA e PZQ têm mudado. Quando os resultados de ED_{50} de cepa brasileira de *S. mansoni* são comparados a outros resultados de ED_{50} em cepas de campo, é possível observar que a susceptibilidade a fármacos de cepas de *S. mansoni* tem diminuído (BONESSO-SABADINI e SOUZA DIAS, 2002).

A ED_{50} foi também avaliada em nove isolados de *S. mansoni*. Desses isolados, quatro foram selecionados porque nunca haviam tido contato com PZQ. Cinco outros isolados foram selecionados porque já haviam apresentado resistência induzida a PZQ ou apresentaram resistência a esta PZQ no campo. Os resultados destas análises indicam que isolados deste helminto diferem quanto à susceptibilidade a PZQ e que a diminuição da susceptibilidade à droga pode estar relacionada ao contato prévio do parasito com PZQ (CIOLI et al., 2004).

Fallon et al. (1994) utilizando isolados de um pool de cercárias de regiões geográficas diferentes demonstraram experimentalmente que a resistência aos fármacos pelo *S. mansoni* pode ser induzida com doses sub-curativas de OXA ou PZQ. Após várias passagens do parasito pelos camundongos, em testes laboratoriais, foi possível observar resistência a PZQ em 93% dos vermes. Não houve resistência cruzada ao PZQ com OXA. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar que a resistência a PZQ pode ser induzida experimentalmente e pode ter implicações se observadas no campo.

Alguns autores demonstraram a importância de fatores genéticos do parasito na determinação da resistência ou susceptibilidade a fármacos. Os RFLPs (polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA) com uma sonda de gene ribossomal, foram correlacionados com o aparecimento de resistência ao hycantone em *S. mansoni* (BRINDLEY et al., 1991). Vieira e colaboradores (1991) utilizando a mesma técnica, não encontraram correlação de polimorfismos com a resistência a OXA.

Entretanto, estudos de modelos de seleção de resistência a anti-helmínticos têm mostrado que a resistência em helmintos é geralmente determinada por mais de um gene dominante (BENNETT et al. 1997). Estudos de modelos de seleção com fármacos onde o tratamento da população é feito normalmente com pequena persistência e baixa eficácia sugerem que ocorre a seleção de genes de resistência em uma população de indivíduos susceptíveis. O processo de seleção ocorre em 3 fases: na fase inicial do processo de seleção é comum encontrar dentro da população, indivíduos susceptíveis ao fármaco. Em seguida, indivíduos heterozigotos para fenótipo de resistência são comuns. No final da seleção predomina na população, indivíduos homozigotos para o fenótipo de resistência (BENNETT et al., 1997).

Em uma cepa de *S. mansoni* com resistência a hycantone induzida, foi observado que a seleção levou a diminuição dos alelos que determinam a susceptibilidade à droga (GRAY, 1992). A população selecionada era geneticamente heterogênea e sugere que não existe a necessidade de que alelos de resistência sejam incluídos por um evento mutacional.

A dominância dos genes de resistência a droga em *S. mansoni* foi relatada posteriormente, por Liang et al. (2003). Até o momento não foram identificados

marcadores genéticos de resistência de *S. mansoni* ao PZQ. Devido a diferenças na suscetibilidade ao PZQ entre as espécies e linhagens de *Schistosoma*, esses ensaios devem ser melhores avaliados, comparando-se as respostas das várias espécies e cepas (LIANG et al., 2001).

3.3 Testes de novos compostos naturais com potencial esquistossomicida

Na tentativa de se descobrir novos fármacos, devem-se levar em consideração as etapas a serem percorridas para o desenvolvimento de fármacos com diferentes funções, como exemplo os fármacos profiláticos, que agem nas formas jovens do *S. mansoni*, prevenindo a infecção; os fármacos supressores, que inibem a postura de ovos pelas fêmeas, culminando na eliminação do principal agente patogênico, o ovo, interrompendo também a transmissão da doença; e os fármacos curativos, que matam praticamente todos os vermes adultos bloqueando a infecção (KATZ, 2007).

3.3.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais é uma prática comum na medicina popular, resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre o efeito dos vegetais, por diversos grupos étnicos (CELEGHINI, 1997).

Segundo Ferreira (1998), plantas medicinais são aquelas que possuem uma determinada atividade biológica, contendo um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana.

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. E, ainda nos dias de hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

Existem relatos do uso de plantas medicinais, inclusive nas mais antigas fontes escritas, como as provenientes da Mesopotâmia e Egito, ou mesmo da medicina tradicional chinesa. Como exemplo, pode-se citar o Papiro de Ebers,

datado de 1550 a.C., com mais de 20 metros de comprimento, que relaciona mais de 7000 substâncias medicinais presentes em mais de 800 fórmulas (DIAS, 2005).

Os manipulados vegetais consistem no ponto forte da farmácia chinesa, principalmente em razão da diversidade dos climas na China que proporciona uma flora diversificada. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se, ao longo dos tempos, com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

Na Tailândia, Sri Lanka, Malásia, Filipinas e Índia, os frutos maduros de várias espécies são usados na medicina tradicional para o tratamento de dor abdominal, diarreia, disenteria, infecções de feridas, supuração e úlcera crônica (CUI et al., 2010).

O uso popular de plantas medicinais contribui de forma relevante para a obtenção de informações terapêuticas importantes, que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal despertou, e ainda desperta, o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002), em especial a flora brasileira (PINTO et al., 2002).

Alguns estudos demonstram a existência de aproximadamente 250 mil espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial farmacológico (LEWIS e HANSON, 1991; CRAGG *et al.*, 1999).

3.3.2 Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica

A partir da publicação, em 1673, da “Histoire Général des Drogues” pelo farmacêutico Pierre Pomet, o estudo das plantas entrou no período científico, ao adotar a classificação e a descrição taxonômica, o que se traduziu numa identificação mais precisa das plantas utilizadas na medicina. No final do século XVIII começou, então, o isolamento e a determinação da estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais (DA CUNHA, 2008).

Até então a pesquisa de novos medicamentos era realizada através do *screening* de extratos e plantas. Este consistia no rastreamento de compostos ou extratos frente a diferentes atividades. Além da herança cultural e da riqueza molecular, outros fatores foram e são responsáveis pelo incremento na pesquisa sobre plantas medicinais, tais como: insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis de muitos dos medicamentos alopáticos (CZEPULA, 2006).

Apesar do grande interesse nos produtos naturais, as indústrias farmacêuticas brasileiras ainda enfrentam alguns problemas em tal área, tais como: a necessidade de grandes esforços da indústria nacional para atender às diretrizes impostas pela política nacional de plantas medicinais e fitoterápicas; os diminutos investimentos em pesquisa e desenvolvimento; a baixa qualificação de recursos humanos; e, a dificuldade no suprimento, armazenamento e padronização de matérias-primas. Como resultado a Universidade Brasileira é o centro de pesquisas e eventualmente do desenvolvimento de medicamentos de plantas medicinais (FERREIRA, 1998).

3.3.3 A espécie *Garcinia brasiliensis*

A família *Guttiferae*, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. A família *Guttiferae* possui 49 gêneros (por exemplo: *Vismia* (NGUEMEVINGA et al., 2006), *Garcinia* (DEACHATHAI et al., 2006), *Clusia* (DIASA et al., 2006), *Cratoxylum* (BOONSRIA et al., 2006) *Harungana* (TIH et al., 2006), *Mesua* (UAWONGGUL et al., 2006), *Hypericum* (MÁRTONFI et al., 2006), *Kielmeyera* (ZAGOTOA et al., 2006) e mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil (JOLY, 1993).

As plantas desta família são lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas, isoladas ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

A família *Guttiferae* é dotada de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos como: antraquinonas, flavonóides, xantonas, floroglucinóis (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001) e benzofenonas (OLIVEIRA et al.,

1999). Graças a essa gama de constituintes, às espécies desta família têm sido atribuídas atividades como antidepressiva (ZAGOTOA et al., 2006; MEDINA et al., 2006), antibacteriana (ALMEIDA et al., 2008), citotóxica (BOONSRIA et al., 2006), antimalárica (LEE et al., 2003), antioxidante (RAO et al., 2004), antiaflatoxinogênica (JOSEPH et al., 2005) e tripanocida (ABE et al., 2004; LENTA et al., 2007a; LENTA et al., 2007b).

O gênero *Garcinia*, também denominado como *Rheedia*, é constituído por diversas espécies, podendo-se citar: *Garcinia cowa*, *G. gardneriana*, *G. mangostana* e *G. brasiliensis*. Estudos de tais espécies têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e constituintes químicos (BRAZ-FILHO et al., 1970; DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1988). Uma grande quantidade de substâncias com potencial antiparasitário vem sendo isoladas de plantas desta família nos últimos anos (MBWAMBO et al., 2006; FOTIE et al., 2007; HAY et al., 2008).

Extratos de *G. pedunculata* demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica (JAYAPRAKASHA; NEGI; JENA, 2006); a *G. cambogia* vem sendo utilizada no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003); o extrato aquoso de *G. mangostana* demonstrou *in vitro* atividade antileucêmica (CHIANG et al., 2004) e o extrato de *G. pedicillata* apresentou atividade contra a forma amastigota de *L. amazonensis* (BILLO et al., 2005), assim como o extrato bruto de *G. lucida*, que apresentou atividade sobre formas promastigotas de *L. donovani* (FOTIE et al., 2007) e compostos isolados de *G. livingstonei*, que apresentaram atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. infantum* (MBWANBO et al., 2006).

Dos frutos de *G. cowa*, Panthong e colaboradores (2006), isolaram as cowaxantonas A-E, e a elas foi atribuída a atividade antibacteriana. Guttiferonas isoladas de diferentes gêneros e espécies da família *Guttiferae* demonstraram, *in vitro*, efeitos citopáticos contra o HIV (GUSTAFSON et al., 1992).

O ácido gambógico, isolado da resina extraída da árvore de *Garcinia hanburyi*, apresentou, segundo Guo et al. (2006), atividade anticâncer; sementes de *Garcinia kola* contêm uma complexa mistura de biflavonóides, benzofenonas preniladas e xantonas (IWU et al., 2002). Estudos químicos de frutos de *Rheedia gardneriana* demonstraram a presença de alguns constituintes com considerável

poder antioxidante, como os biflavonóides (fukugetina), xantonas, benzofenonas poliisopreniladas, triterpenos e cumarinas (SANTOS et al., 1996).

A espécie *Garcinia brasiliensis* Mart., ou *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, é cultivada em todo o território brasileiro, sendo conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari no Brasil, e como guapomo na Bolívia. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (MORTON, 1987).

O bacuparizeiro é uma árvore em forma de pirâmide rica em um látex amarelo. As folhas são em formato de lança. As flores são abundantes e polígamas. Os frutos são comestíveis (POTT; POTT; SOBRINHO, 2004), ovais com a casca (pericarpo) elástica e amarela que pode ser facilmente removida, a polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (MORTON, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, longitudinalmente, bem visíveis, semelhantes a nervuras. Internamente, são de coloração branco-amarelada e exsudam látex amarelo (NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2002). Cerca de 8 a 9% do peso das sementes é referente ao óleo que é utilizado em cataplasmas para o tratamento de feridas e panarício (espécie de furúnculo). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante a da nicotina (MORTON, 1987).

Os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926; CORRÊA; PENNA, 1984). Compostos isolados do pericarpo desta planta já apresentaram atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 1999), entretanto, não existe relato na literatura de avaliações dos extratos da semente desta planta, ou de compostos isolados deste sobre esquistossomose.



FIGURA 4: A: Árvore; B: Fruto; C: Semente de Bacupari.
Fonte: Lab. de Fitoquímica – UNIFAL MG

A espécie *G. brasiliensis* é usada pela população como antiinflamatório (CASTARDO et al., 2008 e SANTA-CECÍLIA et al., 2011), antinociceptiva (SANTA-CECÍLIA et al., 2011), antioxidante e antitumoral (COELHO et al., 2008).

3.3.3.1 Estudos fitoquímicos

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Rheedia* ou *Garcinia*, é rico em compostos fenólicos, nomeadamente as benzofenonas, xantonas e flavonóides (DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1984). As benzofenonas poliisopreniladas caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona (FIGURA 5) substituído por grupo(s) isoprenila(s) (3-metil-2-butenila). Muitos dos representantes desta classe apresentam um padrão de oxigenação tríplice em um dos anéis aromáticos do cerne difenilmetanona e uma ciclização intramolecular, que juntos são responsáveis pela formação do anel biciclo [3.3.1] noneno (FIGURA 6) (MARTINS, 2008).

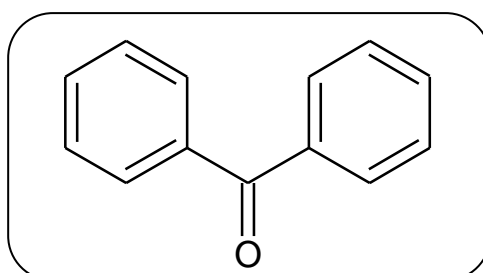


FIGURA 5 - Anel difenilmetanona
Fonte: Ciochina; Grossman

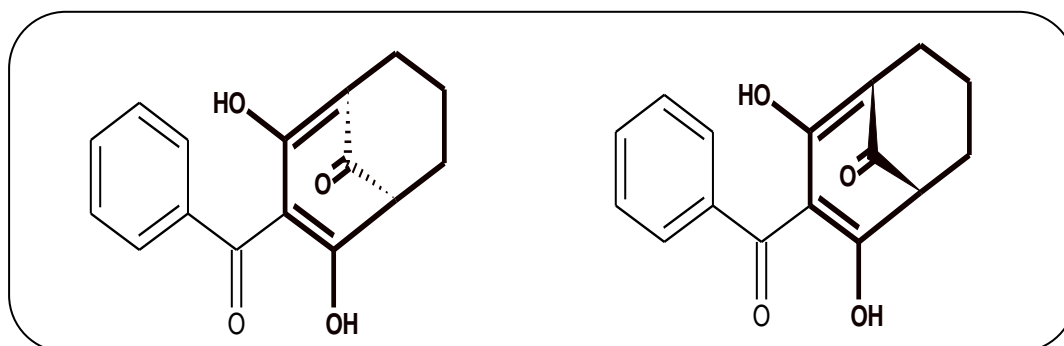


FIGURA 6 – Em negrito, o anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona

Fonte: Ciochina; Grossman

Pela presença desse anel biciclo [3.3.1] noneno, as benzofenonas poliisopreniladas são também classificadas como acilfloroglucinois poliprenilados

policíclicos do tipo B. Como exemplos, podem-se citar o garcinol, as guttiferonas A, C, D, E, F, e I, a 7-*epi*-clusianona, e as hiperibonas H, I e L (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006).

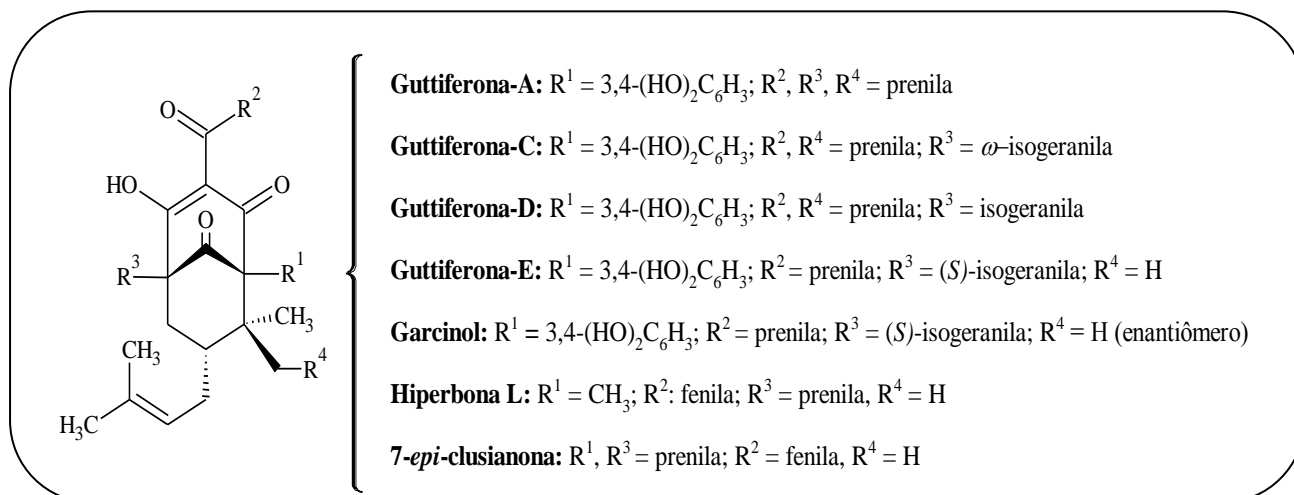


FIGURA 7 – Exemplos de acilfloroglucinóis proliprenilados.
Fonte: Ciochina; Grossman

A Guttiferona-A (FIGURA 7) foi primeiramente isolada de *Symphonia globulifera* e descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992). Trabalhos posteriores demonstraram as atividades tripanocida (Abe, et al., 2004), sequestrante de radicais (NGOUELA et al., 2006), leishmanicida *in vitro* e anticolinesterásica (LENTA et al., 2007a); e antiproteolítica (MARTINS et al., 2008b). A estrutura de raios-X foi elucidada por Martins et al., 2007.

Estudo feitos por Pereira et al. (2010) sugere que o extrato hexânico, acetato etílico e etanólico, e das benzofenonas preniladas isoladas de *G. brasiliensis* possuem atividade leishmanicida, mostrando assim uma forte atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e pouca citotoxicidade sobre células de mamíferos.

A 7-*epi*-clusianona (FIGURA 7), primeiramente isolada dos frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999), apresenta atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi in vitro*. Os resultados obtidos indicaram redução em 92% de seu número em amostra de sangue contaminado na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, foi inativo quando no teste *in vivo* (camundongos infectados). A substância foi inativa, também, contra *B. glabrata*, em testes *in vitro*.

A atividade antimicrobiana das benzofenonas prenilados 7-*epi*-clusianona e fukugentina foram avaliadas em relação a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, e as culturas de *Bacillus cereus* (NALDONI F.J. et al. 2009). A relação direta entre o caráter lipofílico da estrutura e da atividade em bactérias gram-positivas foi observada. Portanto, esses extratos de benzofenonas preniladas, representam um tema interessante para estudos posteriores e abre possibilidades para o controle alternativo de doenças associadas com as bactérias Gram-positivas (NALDONI F.J. et al. 2009)

Estudos feitos por Martins et al. (2009) confirmaram as relações estrutura-atividade, igualmente, a utilidade potencial das três benzofenonas pentapreniladas, a 7-Epiclusianona, a Guttiferona-A e a Garcinofenona como fármacos com atividades antitumoral.

3.4 Plantas com atividade esquistossomicida

A quimioterapia repetida da esquistossomose resultou no surgimento de cepas resistentes de *Schistosoma*. O desenvolvimento dessa resistência tem chamado a atenção de muitos autores quanto à necessidade de fármacos alternativos. Muitas plantas medicinais têm sido estudadas para investigar seu potencial esquistossomicida (MOSTAFA et al., 2011)

Das cerca de 100 mil espécies de plantas catalogadas no Brasil, apenas 8% tiveram seus compostos químicos estudados e estima-se somente 1100 espécies foram estudadas quanto ao uso terapêutico (VARANDA, 2006; REIS et al., 2007). Essa grande diversidade ainda desconhecida constitui importante fonte para descoberta de novos fármacos (ANTHONY et al., 2005).

Testes com extratos vegetais estão sendo bem sucedidos na China, com plantas da milenar medicina chinesa (XIAO et al., 2000), como a artemisinina, utilizada no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum*, extraída das folhas de *Artemisia annua*. Testes com artemisinina já se mostraram eficazes contra o *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni* (XIAO et al., 2000; UTZINGER et al., 2001; YUANQING et al., 2001; LESCANO et al., 2004).

Araújo et al. (1991) verificaram redução moderada dos vermes em hamsters infectados com *S. mansoni*, após o tratamento com artemether, um derivado da artemisinina. Barth et al. (1997) verificaram em testes *in vitro* em *S. mansoni* redução da motilidade dos vermes, inibição da postura de ovos e alta mortalidade

dos parasitos quando utilizaram o goyazensólídeo, um componente extraído de *Eremanthus goyazensis*, uma planta da família *Asteraceae*.

Compostos biologicamente ativos de *Millettia thonningii*, uma leguminosa encontrada na África, mostraram ação cercaricida e esquistossomicida e ainda foi observada a diminuição da motilidade dos miracídios de *S. mansoni* (PERRETT et al., 1994; LYDDIARD et al., 2002).

A atividade esquistossomicida do extrato aquoso bruto de gengibre contra *S. mansoni* foi investigada por Mostafa et. al. (2011) os quais observaram que a carga parasitária e a densidade de ovos no fígado e nas fezes de camundongos tratados com gengibre foram menores do que os não-tratados. Os machos recuperados de camundongos tratados com gengibre perderam sua arquitetura normal de superfície, erosões extensas no tegumento e numerosas bolhas em torno de tubérculos também foram observadas. Os dados histopatológicos indicaram uma redução no número e tamanho de infiltração inflamatória granulomatosa no fígado e intestino de ratos tratados em comparação com ratos não tratados. Os resultados sugerem que o gengibre tem atividades esquistossomicidas.

Levantamento realizado na África do Sul mostrou que pelo menos três das cerca de quarenta plantas testadas se mostraram como potenciais agentes esquistossomicidas para o *S. haematobium*. São elas: *Berhaya speciosa* (*Asteraceae*), *Euclea natalensis* (*Ebenaceae*) e *Trichilia ematica* (*Meliciae*) (SPARG et al., 2000). Extratos de *Phyllanthus amarus*, uma Euforbiácea, conhecida popularmente como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva pombinha foi utilizada em testes *in vivo* contra o *S. mansoni* da linhagem BH em camundongos *Mus musculus* infectados (OLIVEIRA, 2008). Comumente utilizada no tratamento de doenças hepáticas e urogenitais (KHATOON et al., 2006) quando empregada sobre o *S. mansoni*, *P. amarus* ocasionou redução de até 63% no número de vermes e cessou a postura de ovos evidenciando a potencial atividade esquistossomicida da planta (OLIVEIRA, 2008).

A eficácia do mesocarpo dos frutos *Balanites aegyptiaca* foi comparado com praziquantel em camundongos infectados com a cepa do Sudão de *S. mansoni*. Uma redução significativa foi observada na OPG (contagem de ovos por grama de fezes), na carga de ovos em tecidos e na recuperação de vermes adultos, tanto nos

animais tratados com a planta quanto nos tratados com o fármaco (KOKO et al., 2005).

As propriedades esquistossomicidas de sementes de *Nigella sativa* foram testadas *in vitro* contra miracídios, cercárias e vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados indicam seu forte efeito biocida contra todas as fases do parasita e também mostrou um efeito inibitório sobre a postura de ovos de vermes adultos do sexo feminino. Dados revelaram que a *Nigella sativa* induziu o estresse oxidativo contra vermes adultos, indicado por uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase e enzimas do metabolismo da glicose, hexoquinase e glicose-6-fosfato (MOHAMED et.al., 2005).

Muitos caramujos aquáticos funcionam como hospedeiros intermediários para as larvas de trematódeos. A OMS testou vários milhares de compostos sintéticos para o controle do caramujo hospedeiro. Embora eficazes esses moluscidas até agora não foram inteiramente satisfatórios. Com a crescente conscientização da poluição ambiental, os esforços estão sendo feitos para descobrir produtos moluscidas de origem vegetal. Plantas medicinais comuns, *Thevetia peruviana* (Família *Apocynaceae*), *Euphorbia pulcherima* e *Euphorbia hirta* (Família *Euphorbiaceae*) têm potente atividade moluscida contra caramujos de água doce. As ações toxicológicas de *Thevetia peruviana* pode ser devido à presença de apigenina-5-metil éter (flavonóides) e glicosídeos triterpenóides, enquanto uma série de alcalóides (pseudo-akuammigine além da betulina, ácido ursólico e beta-sitosterol), esteróides e triterpenóides presentes e o diterpenóides, pulcherrol, beta-sitosterol, ácido elágico hentriacontano e beta-amirina estão presentes em *Euphorbia hirta* e *Euphorbia pulcherima* (SINGH, 2010).

No Mali (Niger), o uso da medicina tradicional é um fenômeno generalizado, não só devido à sua importância cultural, mas também porque a maioria das pessoas não pode pagar pelos medicamentos ocidentais. Mali é considerada a principal zona de transmissão do *S. mansoni* e *S. haematobium*. Uma pesquisa etnofarmacológica, utilizando questionário, foi realizado nessa área, para determinar as plantas usadas contra a esquistossomose entre os curandeiros tradicionais. Cinquenta e cinco plantas pertencentes a 30 famílias foram relatadas quanto a uso isolado para tratar a esquistossomose urinária e intestinal, enquanto nove

combinações de plantas eram usadas contra a forma urinária da doença. *Cissus quadrangularis* and *Stylosanthes erecta* foram às plantas mais utilizadas e pioneiras contra a esquistossomose no Mali (BAH S, *et.al.*, 2006).

A busca por novos compostos ativos que podem modular o sistema imune tem solicitado investigação de plantas medicinais como a *Solanum lycocarpum*, que exibe atividade contra *S. mansoni in vitro* (MIRANDA et al., 2012).

Clerodendrum umbellatum (*Verbenaceae*) é tradicionalmente usado na República de Camarões para o tratamento de muitas doenças, incluindo helmintíases intestinais. Jatsa et.al. (2009) avaliaram a atividade esquistossomicida *in vivo* do extrato aquoso de suas folhas em um modelo de *S. mansoni* em ratos. Eles concluíram que o extrato aquoso das folhas de *Clerodendrum umbellatum* demonstrou propriedades esquistossomicidas em doses de pelo menos 80 mg/kg de peso corporal.

3.5 O uso da fluorescência no estudo de mecanismo de ação

3.5.1 Microscopia de Fluorescência

Fluorescência é a capacidade de uma substância emitir luz quando exposta a radiações do tipo ultravioleta (UV), raios catódicos e raios X. As radiações absorvidas (invisíveis ao olho humano) transformam-se em luz visível, ou seja, com um comprimento de onda maior que o da radiação incidente.

A absorção de luz ocorre de uma fonte de energia que, no caso da microscopia de fluorescência, provém de fótons emitidos de uma radiação luminosa (lâmpada incandescente de mercúrio, UV). Os fluoróforos são projetados para localizar uma área específica da amostra a ser observada ou para responder a um estímulo específico. Assim, esses fluoróforos permitem detectar componentes particulares de um complexo biomolecular, inclusive de células vivas, ajudando na visualização de estruturas, compostos ou processos em curso em um determinado material em estudo.

3.5.2 Uso das sondas fluorescentes para marcações nos parasitos

Uma ferramenta sensível para a identificação de lesões tegumentares em *S. mansoni* é a marcação por sonda fluorescente, que pode ser usada como parâmetro para avaliar compostos quanto a prováveis atividades esquistossomicida.

A sonda Hoechst 33258, que se liga no DNA das células, é um indicador muito sensível da integridade da membrana. As regiões fluorescentes indicam danos tegumentares (COUTO et al., 2010). Esta sonda já tem sido usada em vários estudos, não só em vermes adultos, mas também em esquistossômulos, esporocisto e cercária.

Sato et al. (2002; 2004) utilizaram a sonda fluorescente Resorufin para avaliar a atividade excretora do *S. mansoni*. A Resorufin é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina) de natureza fluorescente e é um substrato para a P-glicoproteína (PGP). Esta sonda difunde-se passivamente através do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e é excretada por meio de uma suposta PGP expressa no epitélio excretor. A PGP é uma proteína que possui um importante papel na absorção, eliminação e distribuição de muitos xenobióticos, incluindo uma variedade de fármacos (SCHINKEL e JONKER, 2003). Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2006), utilizando a Resorufin, demonstrou-se que o PZQ é capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos da cepa LE de *S. mansoni* e que esta atividade pode ser recuperada quando o verme é retirado do contato com o fármaco.

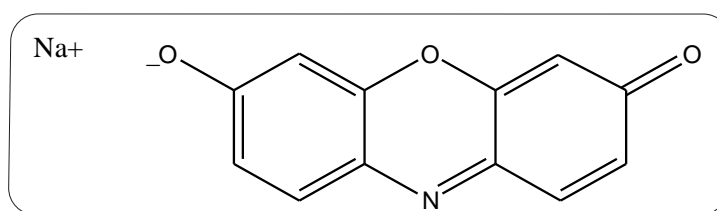


FIGURA 8 : Estrutura química da Resorufin.
Fonte: Sato et al. 2002.

A sonda Hoechst 33258, uma bis-benzamida chamada 2,4 hidroxifenil 5, 4 metil,1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol (FIGURA 9) é uma sonda hidrofílica e fluoresce somente quando se liga ao DNA das células. Por ser de característica hidrofílica, ela só consegue se difundir para o interior das células quando há presença de lesões, atuando como um indicador de integridade de membrana. A

observação do dano causado pela ação dos fármacos sobre a membrana tegumentar foi determinada pela fluorescência emitida pela sonda Hoechst 33258, quando esta se ligou ao DNA. As áreas com fluorescência (azul) corresponderam a regiões lesadas (LIMA et al. 1994a).

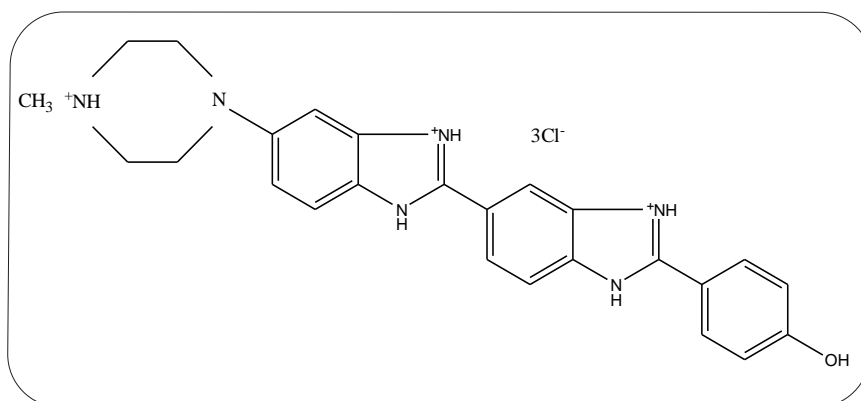


FIGURA 9 - Estrutura química da Hoechst 33258.

Fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes.

4 JUSTIFICATIVA

Na busca de novos fármacos para a terapêutica experimental devem-se considerar os objetivos a se alcançar e, assim, obter fármacos com atividades diferentes, com abordagens diversas como: fármacos profiláticos para prevenir a infecção, pois agiriam nas formas jovens do parasito; fármacos supressores, para impedir a postura das fêmeas e, portanto, eliminar o principal agente patogênico que é o ovo, além de interromper a transmissão da parasitose; e fármacos curativos, que matam todos (ou quase) os parasitos maduros, interrompendo a infecção.

Apesar da disponibilidade de fármacos de alta eficácia e baixa toxicidade, como OXA e PZQ, já foram relatados casos de resistência a fármacos, e a reinfeção ainda é um grande problema no controle desta doença. Os principais fatores que podem levar ao desenvolvimento de resistência a fármacos são o tratamento de apenas uma parte da população infectada, tratamentos em intervalos de tempo muito grandes, mudanças da dosagem do fármaco utilizada por um programa de controle e o tratamento com doses não curativas (SILVA et. al., 1997).

Resistência a fármacos pode ser definida como a diminuição permanente ou transitória da sensibilidade dos organismos a efeitos de fármacos que interferem nas suas funções vitais. A resistência aparece nos descendentes dos parasitos que apresentaram resposta quimioterápica diminuída. A tolerância a fármacos não deve ser confundida com a resistência, pois esta ocorre quando um parasito que nunca havia tido o contato com o fármaco apresenta diminuição na resposta terapêutica (COLES et. al., 1986). Pesquisar fármacos originários de plantas medicinais tem sido uma tarefa multidisciplinar que envolve pesquisadores e estudantes nas áreas de botânica, fitoquímica, parasitologia, farmacologia e medicina (BILLO et. al., 2005).

Considerando os pontos descritos, bem como o complexo ciclo biológico do parasito e a existência de cepas de *S. mansoni* resistentes ao PZQ, que é o medicamento de escolha no tratamento da esquistossomose; e o fato de que a doença tem recebido pouco investimento em pesquisas sobre novos fármacos; faz-se necessário a descoberta de agentes mais eficazes, com o objetivo de aperfeiçoar o tratamento.

O gênero *Garcinia* é constituído por diversas espécies. Estudos de tais espécies têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e constituintes químicos. As espécies do gênero *Garcinia* são fonte rica e valiosa de

compostos bioativos (MONACHE et. al., 1984). A fim de encontrar novos fármacos contra a esquistossomose, foram estudados extratos e moléculas naturais de plantas brasileiras, como *G. brasiliensis* (Clusiaceae), vulgarmente conhecido como “bacupari”, uma árvore nativa das florestas brasileiras (MORTON, 1987).

Sendo assim, o trabalho avaliou o potencial do extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis*, e suas frações, obtidas por partição, bem como a molécula Guttiferona-A, isolada da fração acetato-etílica da semente de *G. brasiliensis*, quanto aos seus potenciais esquistossomicidas em vermes adultos tratados *in vitro*.

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta do material vegetal

Os frutos de *Garcinia brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'5" oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa.

5.2 Estudo fitoquímico

5.2.1 Preparo do extrato, das frações e isolamento das substâncias

As sementes retiradas do fruto de *G. brasiliensis* foram trituradas e submetidas à extração por maceração exaustiva em etanol puro no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG (CALIXTO E YUNES, 2001, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Os componentes extraídos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador-rotatório, obtendo-se assim, extrato etanólico da semente (EES). Após, uma porção do EES (1,0 g) foi submetido à partição líquido/líquido do seguinte modo: a amostra foi dissolvida em etanol: água (1:4) (60,0 mL) e após adição do hexano (50,0 mL) a mistura foi vigorosamente agitada. A camada orgânica foi removida para dar a fração hexânica (este procedimento foi realizado cinco vezes). Algumas matérias insolúveis ficaram retidas na fase aquosa, a qual foi adicionada acetato de etila (50,0 mL) e vigorosamente agitada.

Do mesmo modo, a camada orgânica foi removida para produzir a fração acetato-etílica (este procedimento foi realizado cinco vezes). As frações hexânica (FHS), acetato de etila (FAES) e aquosa (FAS) do extrato da semente, foram concentradas à pressão reduzida utilizando evaporador rotativo e, em seguida secou as mesmas sob liofilizador e foram armazenadas no congelador.

Para isolar os compostos bioativos, as frações FHS e FAES obtidas da partição do extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis* foram submetidas a

cromatografia em colunas de sílica gel (CC) de sílica-gel (230-400 mesh)(8 × 100cm) com eluentes de polaridade crescente(hexano/acetato de etila e acetato de etila/etanol), sendo as frações concentradas em rotavapor à pressão reduzida. Estas frações foram reunidas em grupos de acordo com suas semelhanças após a análise por cromatografia em camada fina (CCD). Quando da necessidade, foram recromatografadas e, ou recristalizadas em metanol para obtenção dos compostos puros. A substância GUT-A foi isolada a partir da fração acetato etílica no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG. Paralelamente, foram usados padrões de GUT-A para efeito de comparação e identificação. Sua pureza foi avaliada pela análise cromatográfica.

5.2.2 Extração e purificação de GUT-A

As sementes de *G. brasiliensis* foram secas ao ar, trituradas e delas extraiu-se o extrato por percolação com acetato de etila à temperatura ambiente durante 24 h. O processo foi repetido até todo o material ter sido extraído e o solvente foi removido sob pressão reduzida para fornecer um extrato de acetato de etila bruto. Esse extrato foi então submetido à cromatografia em coluna sobre gel de sílica, eluída com misturas de polaridade crescente de hexano/acetato de etilo para fornecer GUT-A pura como um sólido amarelo. A sua estrutura foi confirmada por várias técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN e EM) em comparação com os dados da literatura e com padrões existentes no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG (FIGURA 10).

Todos os procedimentos relativos à obtenção dos extratos e frações, bem como a extração e purificação da GUT-A foram realizados por pesquisadores do grupo supervisionados pelo Prof. Dr. Prof. Marcelo Henrique dos Santos, no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG.

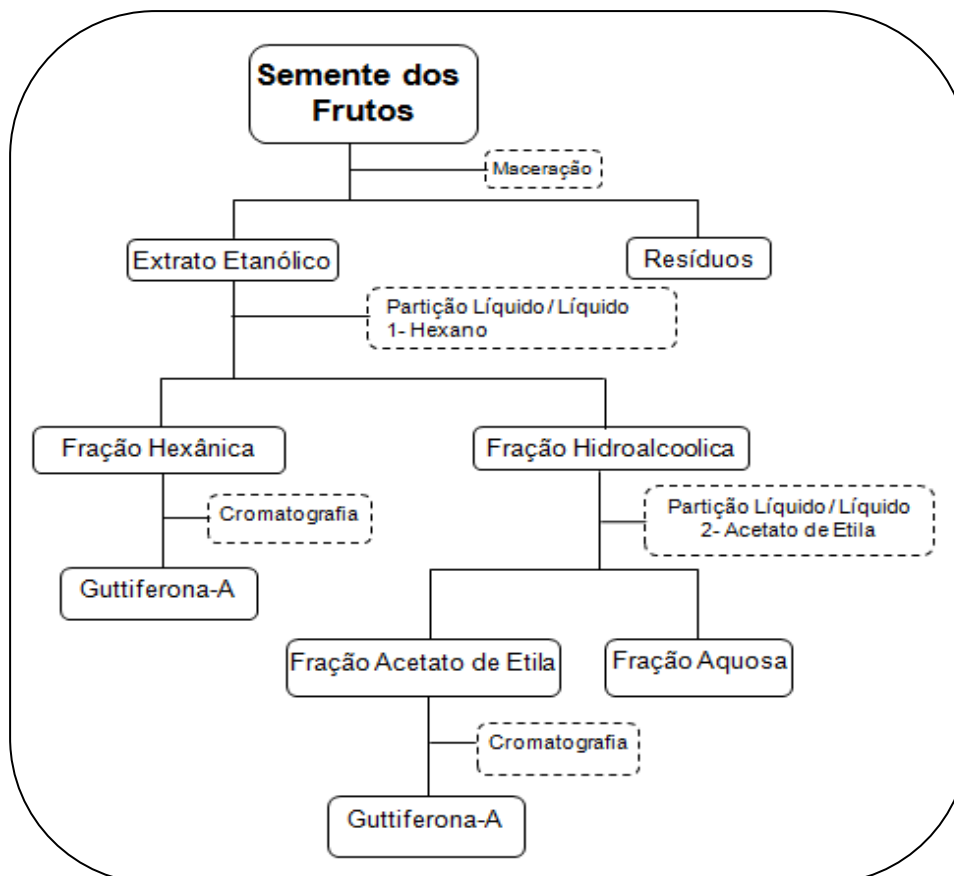


FIGURA 10: Esquema do ensaio biomonitorado para extração e purificação dos constituintes a partir da semente de *G. brasiliensis*.

Fonte: o autor

5.2.3 Análises Cromatográficas

Os cromatogramas do extrato, das frações e da substância pura foram obtidos em um aparelho de Cromatografia Líquida (Shimadzu UFLC 20), usando uma coluna NST (Nano Separation Technologies) C18–154605 (150 x 4,6mm; 5,0 µm de tamanho de partícula), em acordo com Almeida et al. (2008). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B). O volume de injeção foi de 20,0 µL, e fluxo de 1,0 mL/min. Durante os 10 minutos iniciais a análise foi realizada com 50,0% de B, em seguida a concentração de B aumentou linearmente até 100,0 % em 20 min e seguiu 100,0 % de B até 30 min. Depois a concentração de B foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise. Os cromatogramas foram obtidos em 254 nm e seus picos foram comparados com padrões previamente isolados no laboratório.

5.3 Ensaios esquistossomicidas

5.3.1 Parasitos

A cepa LE (Luiz Evangelista) de *Schistosoma mansoni* é rotineiramente mantida por passagens em série em caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss. A cepa LE 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).

5.3.1.1 Caramujos

Os caramujos foram mantidos em laboratório dentro de um aquário com água corrente, boa oxigenação, apresentando pH entre 7,2 a 7,8 e isenta de cloro, cobre ou zinco, que dificultam a sobrevivência dos mesmos. A linhagem da espécie *Biomphalaria glabrata* era susceptível às cepas de *S. mansoni*, mantidas em laboratório. (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

5.3.1.2 Infecção e exame dos caramujos

A infecção desses moluscos, como rotina, é feita com 10 miracídios de *S. mansoni* por caramujo, deixando-os juntos por algumas horas. Os caramujos foram transferidos para uma estufa ou sala e mantidos a 28°C. Após 30 dias, examinaram-se os caramujos, colocando-os individualmente em pequenos vidros com água e expostos à luz, quando 60 a 80% dos caramujos estavam eliminando cercárias e os não infectados foram eliminados. Os caramujos infectados viveram em torno de 40 dias (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

5.3.2 Animais utilizados

Foram usados na parte experimental camundongos *Swiss*, fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade pesado em média 20g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água potável.

As cercárias de *S. mansoni*, cepa LE (Luis Evangelista), usadas para infecção, foram fornecidas pelo Moluscário do CPqRR, onde o ciclo do parasito é mantido rotineiramente, por mais de 30 anos, utilizando-se o modelo *Biomphalaria glabrata* – camundongo - *Biomphalaria glabrata*.

5.3.3 Infecção dos camundongos

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único béquer, originando um pool de cercárias provenientes de caramujos. De cada béquer, foi retirada uma alíquota de, aproximadamente, 0,3mL que foram contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas eram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a mais ou menos 20 ± 5 cercárias, para cada volume de 0,1mL.

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável.

Praticamente todos os animais infectaram-se, e a taxa de recuperação girou em torno de 20-30 vermes adultos, 45 dias após a infecção. Para que não houvesse desproporção entre os esquistossomos machos e fêmeas recuperados, foram utilizadas cercárias provenientes de 30 ou mais caramujos infectados (KATZ, 2007).

5.3.4 Obtenção dos parasitos

Os vermes adultos do parasito foram obtidos por perfusão murina manual do sistema porta-hepático de camundongos albino *Swiss*, os quais eram infectados e permaneciam por sete semanas. A técnica de perfusão murina manual descrita por Smithers e Terry (1965) é utilizada principalmente para recuperação de vermes para

cultivo ou para quando é necessário obter vermes com menos lesões, uma vez que essa técnica injeta menor pressão no interior do organismo.

Camundongos com 6 a 7 semanas de infecção foram sacrificados por “overdose” de pentobarbital sódico 3,0 % (Hypnol - Fontoveter), administrado por via intraperitoneal (\pm 0,2 mL). Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos através da perfusão retrógrada do fígado, onde se fez a 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 (0,016 % = 0,83 UI/mL), obtendo-se assim, os parasitos. Estes foram lavados com meio de cultura RPMI – 1640, contendo 0,3 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Limited, Paisley, Scotland).

5.4 Avaliação da atividade *in vitro* do extrato etanólico da semente de *Garcinia brasiliensis* (EES) de suas frações: hexânica (FHS), acetato de etila (FAES) e aquosa (FAS) e da molécula isolada GUT-A sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Foi feita, inicialmente, uma triagem com os extratos etanólicos da semente de *Garcinia brasiliensis* na concentração de 2,0mg/mL, utilizando três grupos controle: o Praziquantel - PZQ (fármaco referência), o RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e o Metanol.

Na realização do experimento, o fármaco testado foi adicionado na concentração desejada aos poços da placa de cultura contendo quatro casais de vermes recuperados pela perfusão murina manual e 4 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) acrescido de 5% de SFB (Gibco Limited, Paisley, Scotland) e 100 μ L/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A placa foi levada à estufa 37°C e 5% de CO₂ por aproximadamente 30 minutos (OLIVEIRA et al., 2006).

Em testes realizados com o PZQ, utilizou-se concentrações de 2 μ g/mL, que foram adicionadas em placas de Petri contendo quatro pares de vermes adultos, ficando estes expostos por 12 horas. No dia seguinte, os vermes foram lavados três vezes e transferidos para frascos contendo o mesmo meio de cultura sem fármaco.

A droga foi dissolvida em metanol e nos poços controle foi adicionado metanol na mesma concentração (KUSEL et al., 2006).

A microscopia foi realizada nos períodos de 2h, 24h e 48h, sendo que após o período de 24h os poços eram novamente lavados para que a droga fosse retirada do contato com os vermes, com a remoção de meio de cultura dos poços e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por várias vezes até perceber que a droga foi retirada.

Durante as leituras, cada poço foi observado, onde se verificou a viabilidade dos vermes, o grau de mobilidade, acasalamentos entre os vermes, contrações e encurtamentos, morfologia, desprendimento de tegumento e presença de ovos nas placas. Ao término do período de observação, os parasitos que permaneciam imóveis por algumas horas ou se apresentam opacos, foram considerados mortos (KATZ, 2007).

5.5 O uso de sondas fluorescentes na avaliação *in vitro* de atividade excretora e danos no tegumento causada pela GUT-A em vermes adultos do *Schistosoma mansoni*

5.5.1 Microscopia de Fluorescência

Para avaliar o efeito da GUT-A sobre o funcionamento do sistema excretor e sobre a camada superficial do tegumento do verme adulto de *S. mansoni* foram utilizados dois marcadores fluorescentes (sondas): a sonda Resorufin e a sonda Hoechst 33258.

5.5.2 Avaliação da atividade excretora após exposição à GUT-A

Camundongos infectados com cercárias, após 45 dias da infecção, foram perfundidos, seguindo a técnica de perfusão manual, descrita anteriormente. Quatro pares de vermes foram colocados em placas de cultura, mantidos em 4mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), acrescido de 5% de SFB (Gibco Limited, Paisley, Scotland) inativado pelo calor e 100µL/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Em

seguida, foi adicionado a cada poço 10 μ L de sonda Resorufin (Sigma – solução estoque 10mg/mL) e colocados em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos.

Após serem lavados por cinco vezes para retirada do excesso de sonda, foram adicionados nos poços 40,0 μ L de metanol (controle), 2,5 μ L (2,0 μ g/mL) de uma solução estoque de PZQ a 0,8 mg/mL (controle) , e GUT-A nas concentrações 16 μ g/mL, 18 μ g/mL e 20 μ g/mL a partir de uma solução estoque 2,0 mg/mL. Um dos poços foi usado como controle, permanecendo somente com meio RPMI-1640 suplementado. Posteriormente, foram colocados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 15 minutos. Os poços foram novamente lavados por cinco vezes com meio de cultura, transferidos para lâminas de vidro delimitadas com vaselina, para evitar o extravasamento, com pequena quantidade de meio de cultura suplementado com 1,0% de pentobarbital sódico a 3,0 % (Hypnol – Fontoveter), para inibir a movimentação dos parasitos.

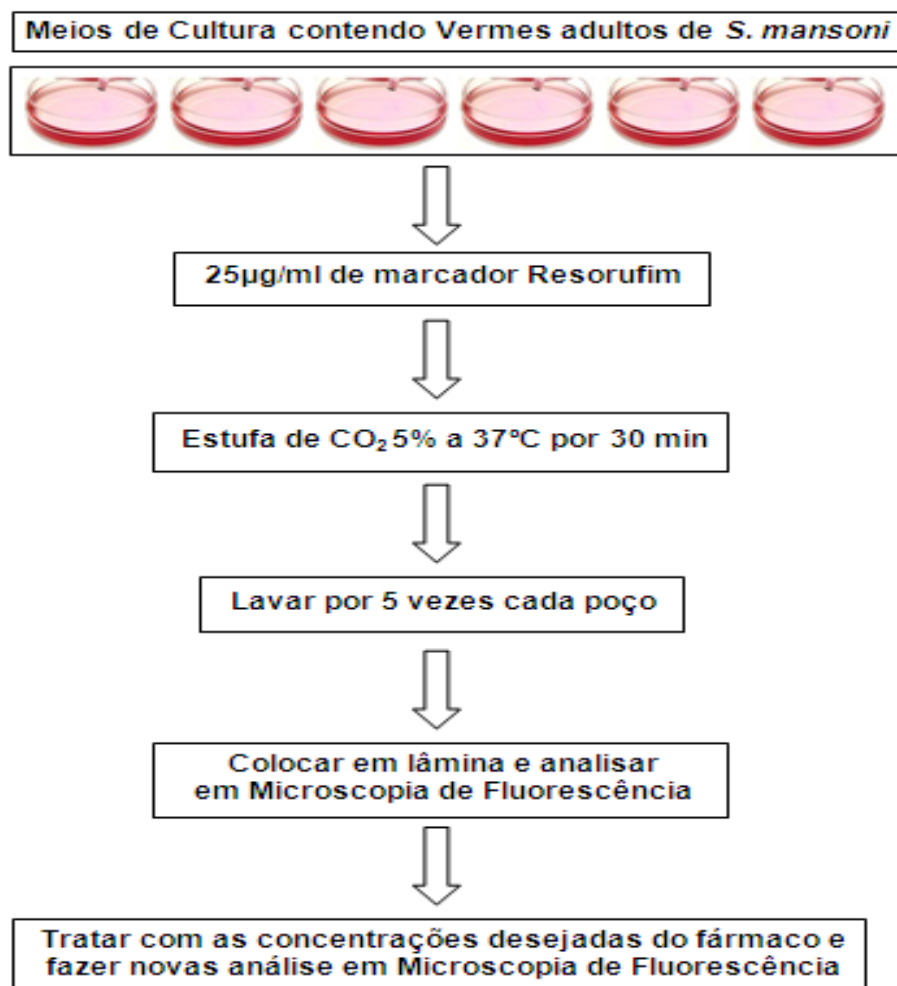


FIGURA 11: Esquema prático para marcação com a sonda Resorufin.

Foram, então, levados para observação em microscópio de fluorescência (Nikon – Eclipse 80i) utilizando filtro Rodamina para Resorufin (excitação/emissão máxima da Resorufin 571/585 nm)

5.5.3 Avaliação de dano no tegumento após exposição à GUT-A

Camundongos infectados com cercárias, após 45 dias da infecção, foram perfundidos, seguindo a técnica de perfusão manual, descrita anteriormente. Quatro pares de vermes foram colocados em placas de cultura contendo 4 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), acrescido de 5% de SFB (Gibco Limited, Paisley, Scotland) inativado pelo calor e 100µL/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Nos poços foram adicionados 40,0 µL de metanol usado como controle, 2,5 µL (2,0 µg/mL) de uma solução estoque de PZQ a 0,8 mg/mL (controle) e nas concentrações 16 µg/mL, 18 µg/mL e 20 µg/mL a partir de uma solução estoque 2,0 mg/mL. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com 5,0 % CO₂.

Ao final deste período, os vermes foram lavados 5 vezes com 4mL de meio de RPMI-1640 suplementado. Foram acrescentados 10µL da sonda Hoechst 33258 (Sigma; solução estoque 10mg/mL), e os vermes incubados novamente por 15 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Os vermes foram lavados por cinco vezes com meio de cultura, transferidos para lâminas delimitadas com utilizando filtro DAP para Hoechst 33258 (excitação/emissão máxima da Hoechst 352/455 nm). Os experimentos que utilizaram a marcação com sondas foram realizados em triplicatas.

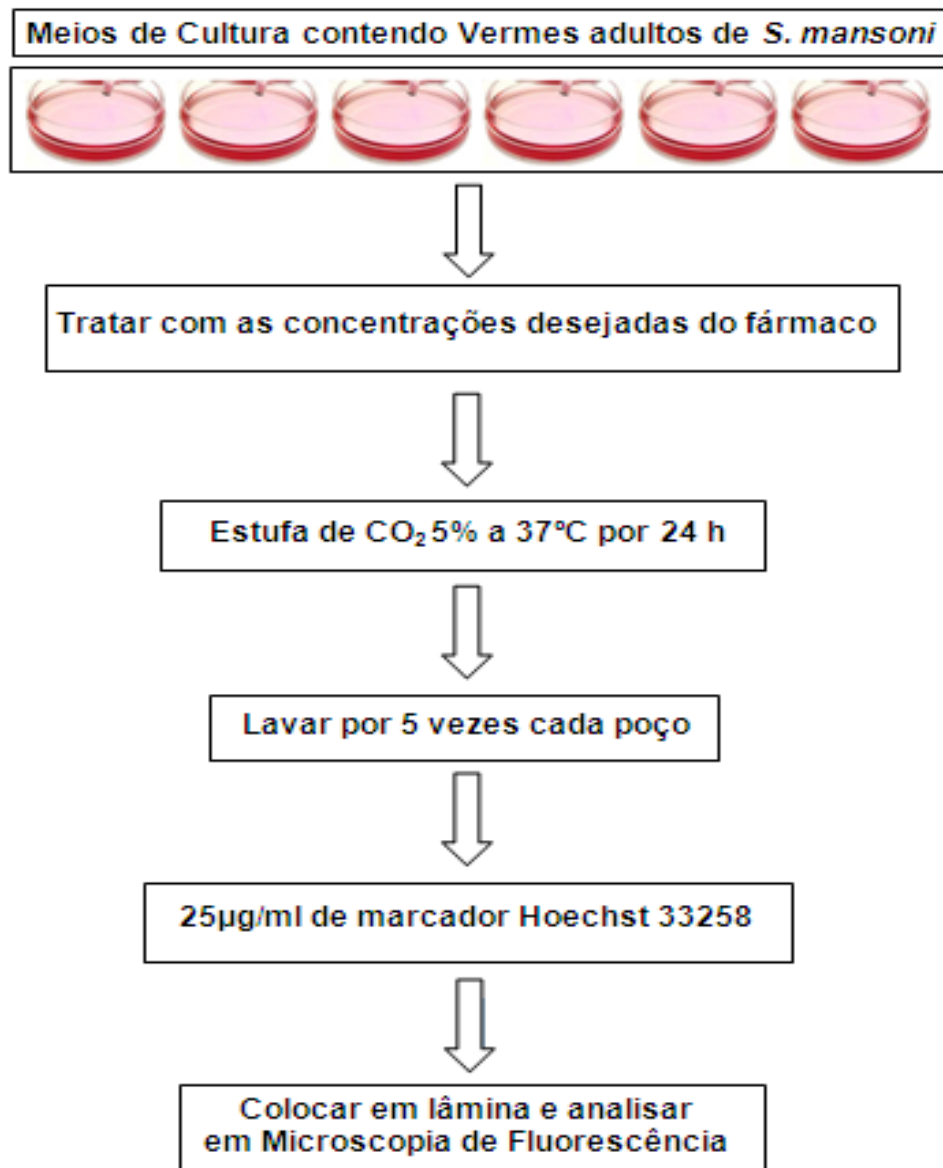


FIGURA 12: Esquema prático para marcação com a sonda Hoechst 33258.

5.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism (versão 5.0). A regressão linear foi usada para obtenção do valor de ED₅₀. 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 $P < 0,05$. Os ensaios foram realizados em triplicatas e cada ensaio foi repetido por três vezes.

6 RESULTADOS

6.1 Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação do EES de *Garcinia brasiliensis*

Para análise do extrato etanólico de *Garcinia brasiliensis* foi obtido o cromatograma conforme FIGURA 13. Os tempos de retenção, a área e a quantificação das substâncias isoladas no extrato e nas frações estão representados na TABELA 1. Alguns compostos, flavonóides e outros, que não foram identificados estão sendo investigados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG (LFQM).

Análise química do EES identificou a GUT-A com uma porcentagem em área de 58.4599, sendo assim o constituinte majoritário (FIGURA 13).

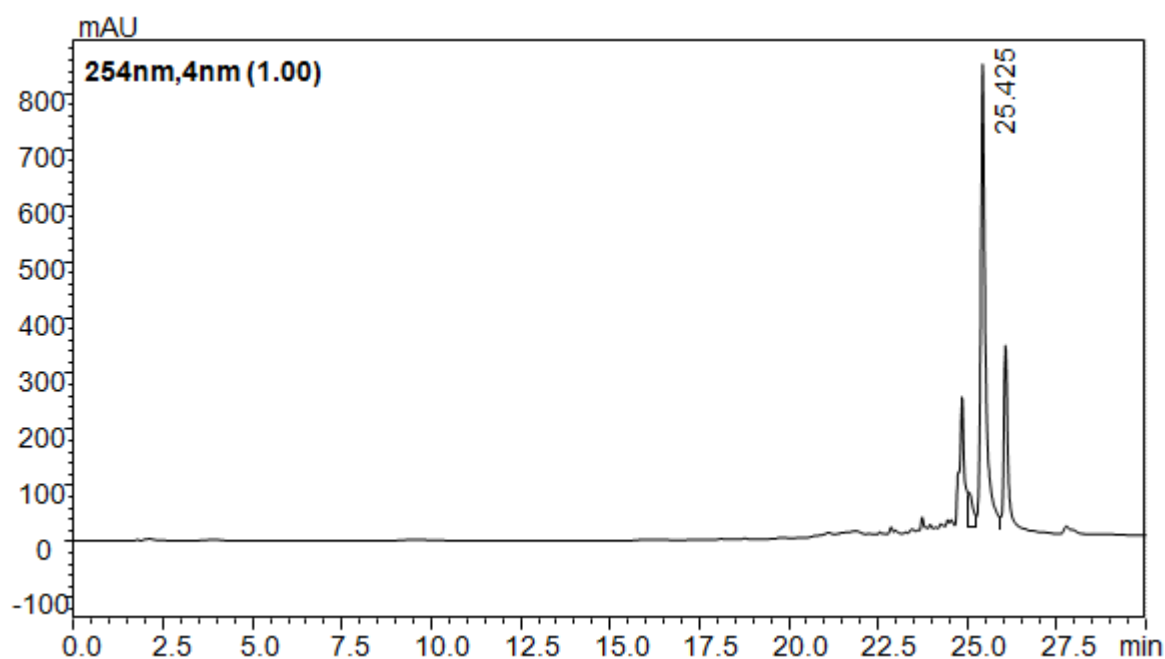


FIGURA 13: Cromatogramas obtido por cromatografia líquida alta eficiência: cromatograma do Extrato Etanólico da Semente de *Garcinia brasiliensis* mostrando a separação da GUT-A (25,425 min).

TABELA 1: Principais componentes encontrados no extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis* identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Tempo de Retenção	Conc.	Área	Área%	Altura	Uv max
23,735	0,74902	97611	0,7490	21404	302,000
24,850	17,24757	2247669	17,2476	230963	262,329
25,077	3,89726	507883	3,8973	58937	264,325
GUT-A → 25,425	58,45990	7618377	58,4599	828001	249,361
26,065	19,44956	2534628	19,4496	326256	298,000

6.2 Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação das frações FHS, FAES e FAS obtidas por partição

Na análise da FAES identificou-se a GUT-A como constituinte majoritário, como mostrado na FIGURA 14 e TABELA 2. Os demais picos são de outros flavonóides identificados pelo Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG (LFQM), porém sem interesse para o presente estudo.

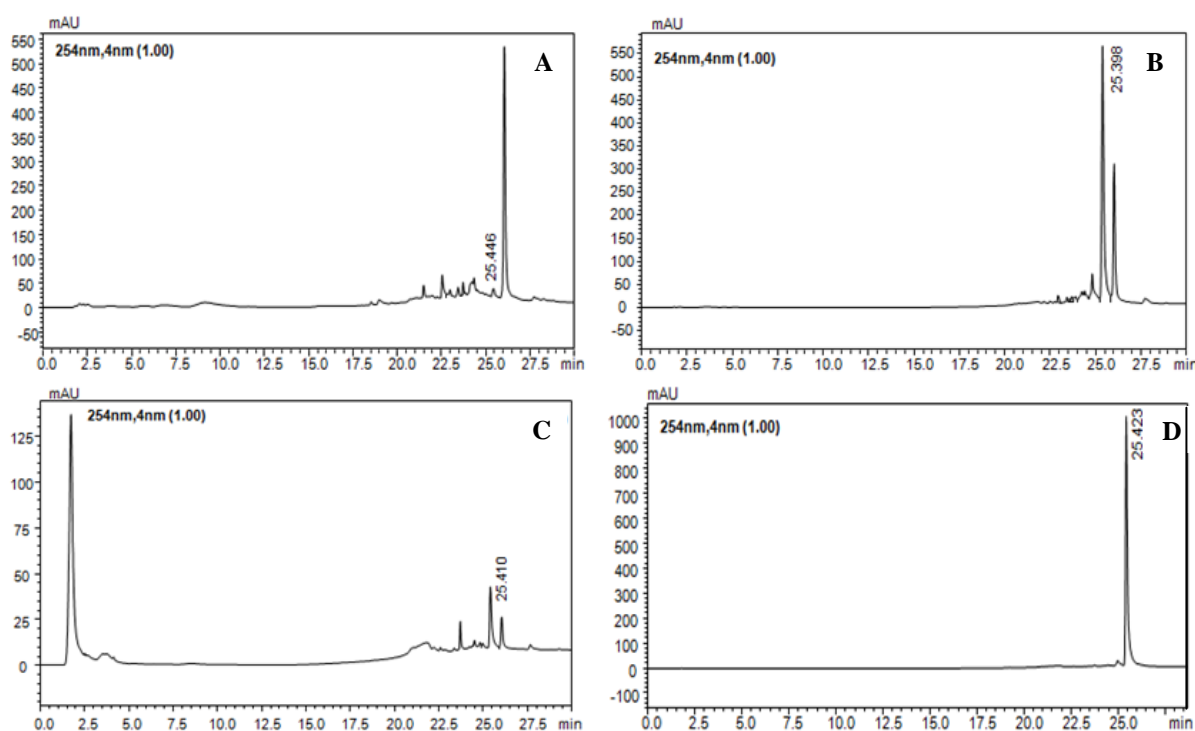


FIGURA 14: Cromatogramas obtido por cromatografia líquida alta eficiência:

(A) Cromatograma da FHS do EES de *G. brasiliensis*, mostrando a separação da GUT-A (25,446 min). (B) Cromatograma da FAES do EES de *G. brasiliensis* mostrando a separação da GUT-A (25,398 min). (C) Cromatograma da FAS do EES de *G. brasiliensis* mostrando a separação da GUT-A (25,410 min). (D) Cromatograma do padrão da GUT-A mostrando o tempo de retenção (25,423 min).

TABELA 2: Principais componentes encontrados na fração acetato etílica da semente de *G. brasiliensis* identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Tempo de Retenção	Conc.	Area	Area%	Altura	Uv max	Substância
22,949	1,11394	98394	1,1139	15139		
23,435	0,61148	54011	0,6115	10251		
23,573	0,44005	38869	0,4400	5908		
23,699	0,68769	60743	0,6877	11444	265	
23,908	1,35667	119834	1,3567	11555	272,301	
24,260	3,02375	267087	3,0237	21998	266	
24,413	2,76871	244560	2,7687	23328		
24,829	8,11336	716651	8,1134	59985	300	
25,398	54,02635	4772135	54,0264	553170	247,361	GUT-A
26,033	25,87967	2285945	25,8797	297035	298	
27,748	1,82298	161023	1,8230	9934	291	

Na FAES foi encontrada uma maior concentração de GUT-A devido a essa molécula ser mais apolar. Nas frações hexânica e aquosa, as concentrações de GUT-A encontradas não apresentaram valores significativos. As demais substâncias não foram objetos de estudo nesse presente trabalho.

6.3 Avaliação da atividade *in vitro* do extrato etanólico da semente (EES) de *Garcinia brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes expostos às concentrações de 50,0 , 75,0 e 100,0 µg/mL do extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis* após 2 horas em contato com o extrato apresentavam significativo movimento, porém, após 24 horas em contato com o extrato eles não se movimentavam mais. Os vermes machos apresentavam-se enrolados; as fêmeas alongadas e com as extremidades enroladas, com presença de bolhas no tegumento e assim permaneceram ao longo de todo o experimento (TABELA 3). Os vermes do grupo controle apresentavam movimentos e morfologia normais e além de terem iniciado a postura de ovos durante as primeiras 24 horas.

TABELA 3: Análise dos parâmetros esquistossomicidas do extrato etanólico da semente de *Garcinia brasiliensis* nas concentrações 50,75; 100 µg/mL.

Substância	Concentração (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e Encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	≥ 24h
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EES	50,0	++	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+
	75,0	++	-	+/-/-	+/-/-	+/+	+/+
	100,0	+	-	+/-/-	+/-/-	+/+	+/+
PZQ	2,0	+	-	+/-/-	+/-/-	+/-	+/+

+++ 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/presença 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.

EES: Extrato etanólico da semente; PZQ: Praziquantel.

6.3.1 Cálculo do ED₅₀ do EES de *G. brasiliensis*

O EES apresentou ED₉₀ em torno de 98,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 64,0 µg/mL, como representado na figura abaixo (FIGURA 15).

Como foi observada atividade no EES de *G. brasiliensis*, fez-se necessário testar as frações obtidas por partição: hexânica (FHS), acetato de etila (FAES) e aquosa (FAS).

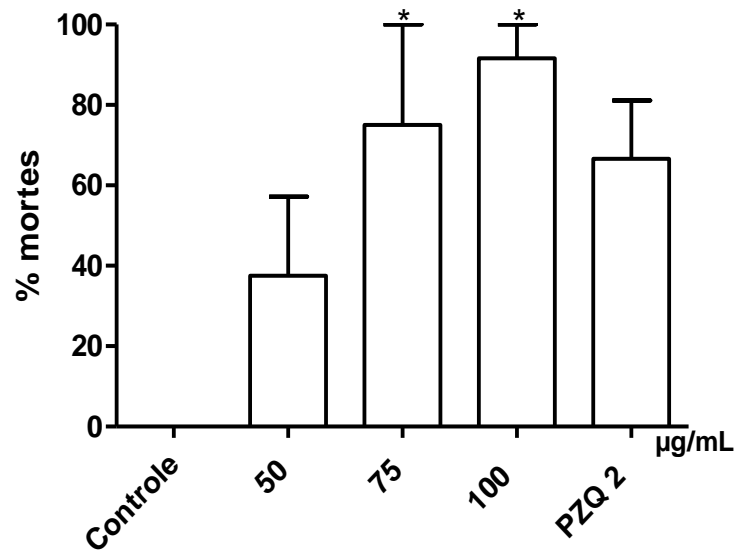


FIGURA 15: Atividade *in vitro* do EES sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do EES. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. * P <0,0001.

6.4 Avaliação da atividade *in vitro* da FHS obtidas por partição do EES de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

A concentração mínima analisada da fração hexânica que apresentou atividade esquistossomicida foi de 50,0 µg/mL. Após 2 horas em contato com o extrato, os machos apresentavam enrolados, com pouco movimento; as fêmeas apresentavam-se paradas. Na análise realizada após 24 horas do tratamento, os machos apresentavam-se imóveis. Verificou-se que, tanto os machos quanto as fêmeas, estavam enrolados e bolhas no tegumento foram observadas, permanecendo assim ao longo de todo o experimento (TABELA 4).

6.4.1 Cálculo do ED₅₀ da FHS

A FHS apresentou ED₉₀ em torno de 97,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 64,0 µg/mL, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 16).

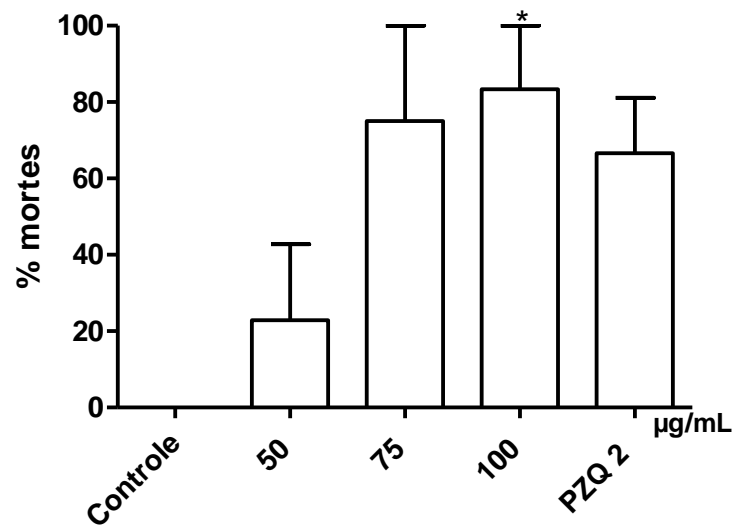


FIGURA 16: Atividade *in vitro* do FHS sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do FHS. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. * P <0,05.

6.5 Avaliação da atividade *in vitro* da FAES obtidas por partição do EES de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Para a FAES, a concentração mínima que apresentou atividade esquistosomicida foi de 75,0 µg/mL. Nas análises feitas após 2 horas em contato com o extrato, machos e fêmeas apresentavam movimentação moderada. Após 24 horas do tratamento com o extrato, os vermes estavam todos imóveis. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentavam-se enrolados, com fêmeas apresentando bolhas no tegumento. Em análises ocorridas após 48 horas, não houve mudanças significativas (TABELA 4). Os vermes no grupo controle apresentavam movimentos e morfologia normais, com postura de ovos durante as primeiras 24 horas.

6.5.1 Cálculo do ED₅₀ da FAES

A FAES apresentou ED₉₀ em torno de 90,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 71,0 µg/mL, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 17).

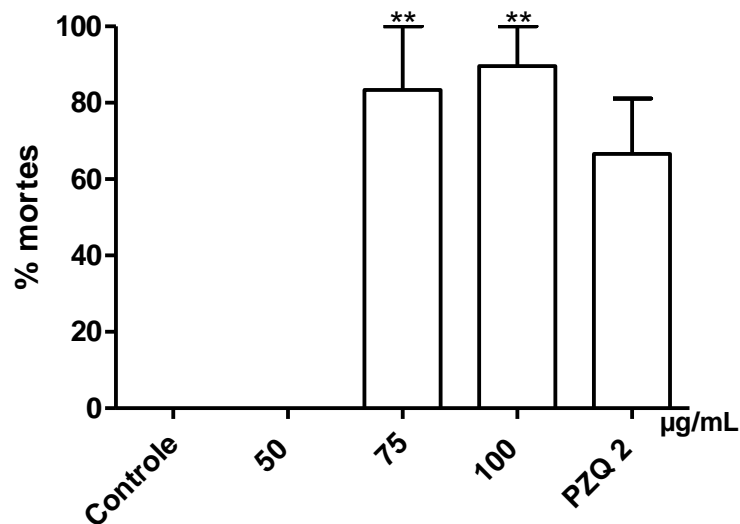


FIGURA 17: Atividade *in vitro* do FAES sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do FAES. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. ** P < 0,001.

6.6 Avaliação da atividade *in vitro* da FAS obtidas por partição do EES de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes foram expostos às concentrações de 100,0 µg/mL e 200,0 µg/mL da fração aquosa da partição do extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis*. Nas análises microscópicas realizadas após 2 horas e 24 horas da exposição ao extrato aquoso não se verificou alterações significativas em comparação com o grupo controle (FIGURA 18). O tegumento estava aparentemente sem modificações, os vermes apresentavam similaridade com os do grupo controle (TABELA 4).

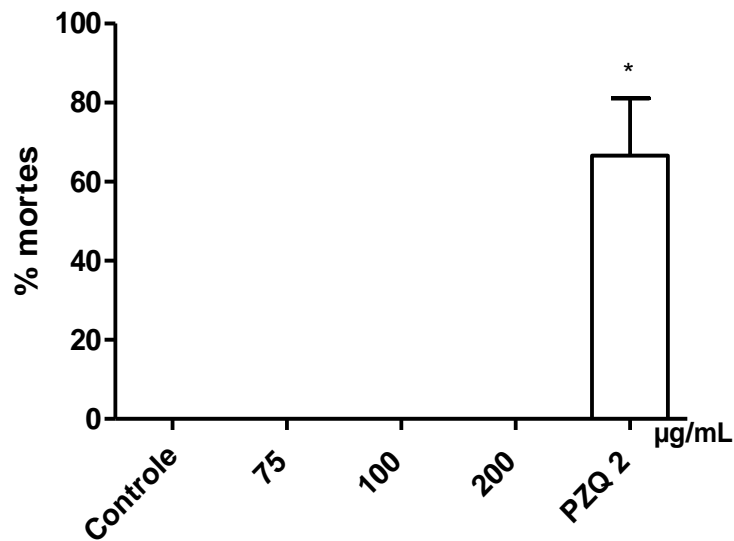


FIGURA 18: Atividade *in vitro* do FAS sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações da FAS. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos.
* P <0,0001.

6.7 Comparação dos resultados *in vitro* do EES e das frações, FHS, FAES, FAS, em relação ao controle PZQ sobre vermes adultos *S. mansoni*

A TABELA 4 compara os resultados obtidos em relação à atividade esquistosomicida (ED_{90}) frente exposição ao EES, e as suas frações FHS, FAES e FAS.

TABELA 4: Análise dos parâmetros esquistossomicidas das frações hexânica, acetato de etila e aquosa, obtidas da semente de *Garcinia brasiliensis* frente ao ED₉₀.

Substância	ED ₉₀ (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	≥ 24h
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EES	94,0	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+
FHS	97,0	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+
FAES	89,0	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/-
FAS	200,0	+++	+++	+/+/-	+/+/-	-/-	-/-
PZQ	2,0	+	-	+/-/-	+/-/-	+/-	+/+

+++ 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/presença 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.

EES: Extrato etanólico da semente; FHS: Fração hexânica; FAES: Fração acetato de etila; FAS: Fração aquosa; PZQ: Praziquantel.

6.8 Avaliação da atividade *in vitro* do composto purificado GUT-A sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Como foi observada atividade no EES de *G. brasiliensis*, assim como em suas frações (FHS e FAES) obtidas por partição, foi feito a opção por analisar a atividade esquistossomicida da fração purificada GUT-A (TABELA 5).

Os vermes foram expostos a diferentes concentrações de GUT-A, com ampla variação nessas concentrações, que variaram de 5 µg/mL até 100,0µg/mL. Nas análises realizadas por microscopia, após 24 horas em contato com a fração purificada, os vermes se apresentaram imóveis a partir da concentração de 18,0 µg/mL da substância, e assim eles permaneceram ao longo do experimento (TABELA 5). Em análise realizada após 2 horas, não se verificou contração nos vermes, permanecendo assim nas análises posteriores. Bolhas e desprendimento no tegumento foram observados na concentração de 18 µg/mL nas leituras realizadas

após as 24 horas de exposição com a GUT-A (FIGURA 20). Não houve ovoposição por parte das fêmeas, mesmo em concentrações menores analisadas. Os vermes nos grupos de controle apareceram com movimentos e morfologia normais, apresentando ovos durante as primeiras 24 horas (TABELA 5).

TABELA 5: Análise dos parâmetros esquistossomicidas da GUT-A em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Substância	Concentração (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração e encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	≥ 24h
Controle	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
PZQ	2,0	+	-	+/-/-	+/-/-	+/-	+/+
GUT-A	20,0	-	-	-/-/-	-/-/-	+/+	+/+
	18,0	-	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+
	16,0	+	+	-/+/-	-/-/-	+/-	+/-

+++ 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/presença 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.

GUT-A: Guttiferona-A; PZQ: Praziquantel.

6.8.1 Cálculo do ED₅₀ da GUT-A

A molécula bioativa GUT-A apresentou ED₉₀ em torno de 35,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 21,8 µg/mL, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 19).

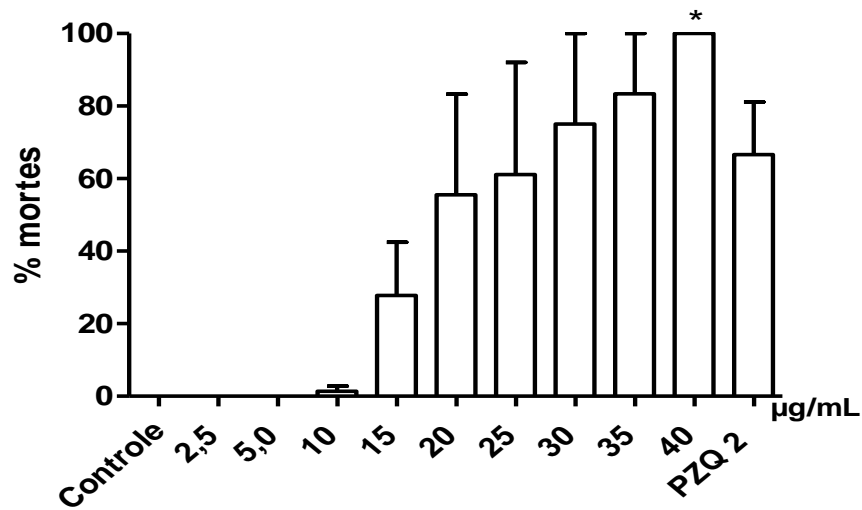


FIGURA 19: Atividade *in vitro* da GUT-A sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações de GUT-A. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. * P <0,05.

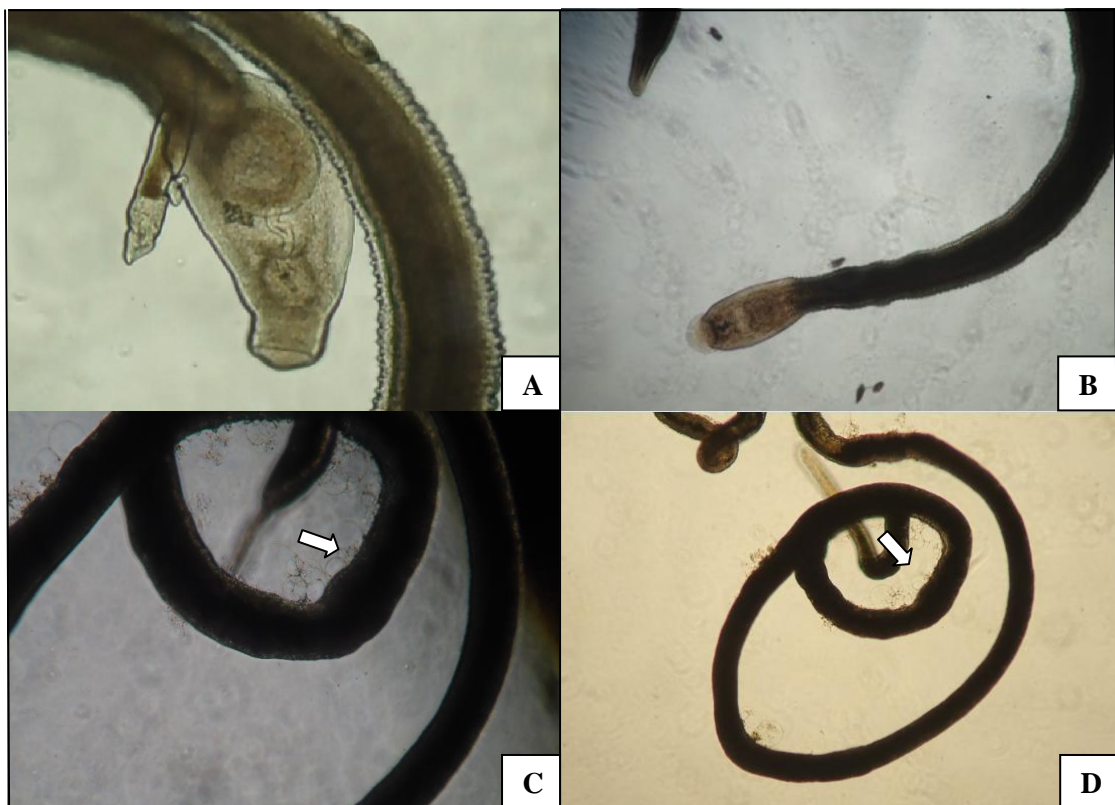


FIGURA 20: Avaliação *in vitro* do efeito da Guttiferona A sobre o tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*. A: *S. mansoni* acasalados não expostos à droga (Grupo Controle). B: *S. mansoni* macho não exposto à droga (Grupo Controle). C e D: *S. mansoni* acasalados expostos à GUT-A 18 µg/mL: As setas mostram presença de bolhas no tegumento. Aumento 40x.

Para avaliar a atividade excretora e o dano causado no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* pela GUT-A, os vermes adultos foram expostos às sondas fluorescentes, Resorufin e Hoechst 33258.

6.9 Marcação do sistema excretor dos vermes adultos com a sonda Resorufin após exposição à GUT-A

Avaliou-se a atividade da molécula GUT-A sobre o sistema excretor de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*. No sistema excretor dos vermes, na região dos principais túbulos e ramificações, quando marcados com a sonda Resorufin, *in vitro*, sem o tratamento com a GUT-A apresentou-se fluorescente, assim como no controle. Após a exposição à GUT-A, o sistema excretor apresentou uma difusão da sonda Resorufin; não sendo possível a visualização dos microtúbulos e ramificações periféricas, o mesmo visto no tratamento com o PZQ (FIGURA 21).

6.10 Avaliação dos danos tegumentares nos vermes adultos de *S. mansoni* após a exposição *in vitro* à GUT-A utilizando a sonda Hoescht 33258

Em testes realizados com a sonda Hoescht 33258, as regiões fluorescentes são indicativas de lesões no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* (FIGURA 22). Os parasitos representados nas figuras A e B não foram expostos a GUT-A *in vitro* e, portanto, não apresentaram danos no tegumento. Nas figuras C e D, os parasitos acasalados foram marcados com a sonda Hoescht 33258 e expostos a 2 µg/mL de PZQ, sendo visíveis os danos causados devido à exposição ao fármaco.

As figuras E e F apresentam vermes adultos macho e fêmea de *S. mansoni* marcados com a sonda Hoescht 33258 e expostos à 16 µg/mL de GUT-A. A seta mostra pontos de fluorescência no tegumento da fêmea, sendo indicativo de lesão no tegumento devido à exposição a 16 µg/mL.

Na figura G e H, vermes adultos de *S. mansoni* foram marcados com a sonda Hoescht 33258 e expostos a 20 µg/mL de GUT-A. Os pontos de fluorescência ficaram bastante visíveis, o que demonstra uma eficácia na produção de danos tegumentares na concentração de exposição.

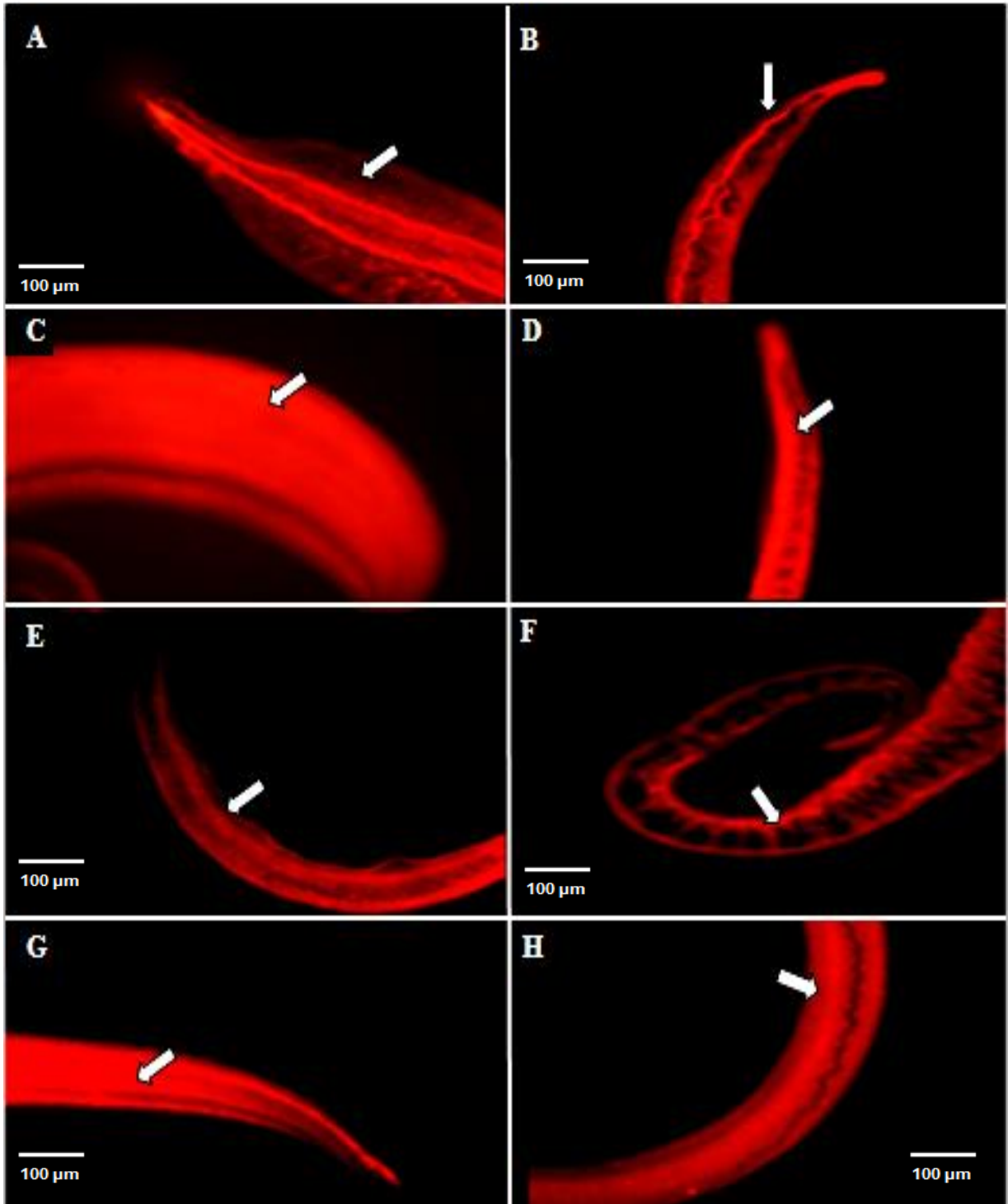


FIGURA 21: Avaliação *in vitro* do efeito da Guttiferona-A sobre o sistema excretor de vermes adultos de *S. mansoni*. (A e B) *S. mansoni* M e F marcados com a sonda Resorufin e não expostos ao PZQ. (C e D) *S. mansoni* M e F marcados com a sonda Resorufin e expostos a 2 µg/mL PZQ. (E e F) *S. mansoni* M e F marcado com a sonda Resorufin e expostos à 16 µg/mL de GUT-A. (G e H) *S. mansoni* M e F marcado com a sonda Resorufin e expostos à 20 µg/mL de GUT-A.

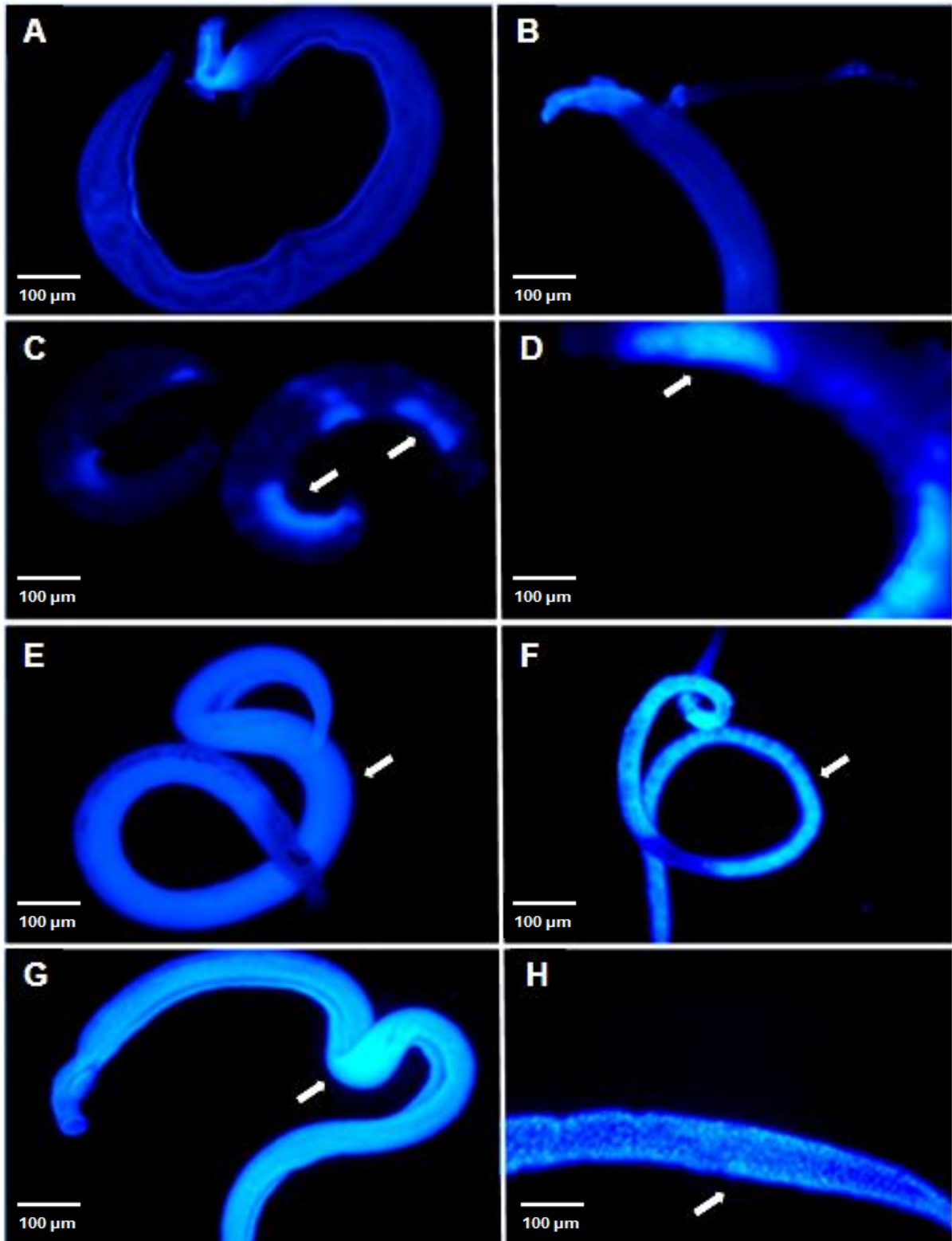


FIGURA 22: Avaliação *in vitro* do efeito da Guttiferona A no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*. (A e B) *S. mansoni* acasalados marcados com a sonda Hoescht 33258 e não expostos ao PZQ. (C e D) *S. mansoni* acasalados marcados com a sonda Hoescht 33258 e expostos a 2 µg/mL PZQ. (E e F) *S. mansoni* M e F marcado com a sonda Hoescht 33258 e expostos à 16 µg/mL de GUT-A. (G e H) *S. mansoni* M e F marcado com a sonda Hoescht 33258 e expostos à 20 µg/mL de GUT-A.

7 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença crônica causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, que representa um grande problema de saúde negligenciado relacionado com a pobreza em muitas áreas tropicais (STEINMANN et al., 2006). A morbidade causada pela esquistossomose parece ser influenciada pela natureza da resposta imune induzida associada com o parasito; os efeitos da doença sobre a formação de granuloma; e as patologias eliciadas por esquistossomose em órgãos-alvo (CHEEVER et al., 2000).

A OMS incluiu a esquistossomose na sua lista de doenças negligenciadas e esta verminose continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. A esquistossomose incapacita ou mata milhares de pessoas e representa uma necessidade médica importante que permanece não atendida (CHIRAC E TORRELE, 2006)

Na falta de uma vacina eficaz contra a esquistossomose, o tratamento quimioterápico ainda é o mais indicado. O fármaco de escolha utilizado contra a esquistossomose é o Praziquantel (PZQ), porém o seu uso em larga escala no controle da esquistossomose tem acelerado a seleção de cepas de parasitos resistentes (KATZ et al., 1973; FALLON; DOENHOFF 1994; ARAÚJO et al., 1996; ISMAIL et al., 1996; BONESSO-SABADINI et al., 2002). Fallon e Doenhoff (1994) identificaram isolados de *Schistosoma mansoni* resistentes ao PZQ e mantiveram cepas de parasitos resistentes no laboratório em passagens por camundongos.

No Quênia, pacientes tratados repetidamente com PZQ apresentaram resultados menos eficazes no combate à esquistossomose. Embora este fenômeno não seja significativo o suficiente para representar um problema clínico no curto prazo, deve-se levar em conta a resistência a fármacos (MELMAN et al., 2009). Em países como o Egito, um número crescente de pacientes demonstrou resistência ao tratamento com PZQ, o que ocorreu não somente à resistência do *S. mansoni*, mas também devido a outros fatores, tais como a resposta do sistema imunológico à infecção (ISMAIL et al., 1999). Sendo assim, um esforço conjunto para a descoberta de novos agentes antiparasitários para tratar a esquistossomose se tornou muito importante.

A busca de compostos antiparasitários de fontes naturais tem aumentado ao longo da última década (DE ARAÚJO et al., 2007; MAHRAN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; BROISSIER et al., 2009; BOTROS et al. 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010). As plantas continuam sendo uma importante fonte de compostos biologicamente ativos que podem fornecer estruturas para o desenvolvimento de novos fármacos (TONUCI et al. 2011) e têm sido utilizadas em todas as culturas como fonte de medicamento, como base natural para a manutenção de uma boa saúde. Exemplos como o *Zingiber officinale*, *Nigella sativa* e *Asparagus officinalis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza dioscorides* e *Sesbania sesban*, *Allium cepa*, tem sido estudados como produtos naturais com atividade esquistossomicida (KAMEL et al., 2011; MONA et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho avaliou o potencial esquistossomicida do extrato etanólico da semente de *Garcinia brasiliensis*, e suas frações hexânica, acetato etílico e aquosa, obtidas por partição e da molécula isolada Guttiferona-A (GUT-A).

Os testes experimentais desse estudo foram realizados *in vitro* em vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*, obtidos por perfusão (OLIVEIRA et al.; 2006). As análises realizadas foram em relação à atividade motora dos parasitos, aos aspectos morfológicos dos mesmos e as alterações ocorridas no tegumento de *S. mansoni*. Todos estes efeitos ocorreram de uma forma dose-dependente. As análises revelaram alterações morfológicas tegumentares que ocorreram após a incubação de vermes adultos de *S. mansoni* em concentrações superiores a 50,0 µg/mL para os extratos e frações e a superior a 18,0 µg/mL para GUT-A. Vários parâmetros, tais como alterações sobre a integridade do tegumento, motilidade, assim como a interrupção da ovoposição e ausência de acasalamentos, muitas vezes são avaliados como indicadores de atividade biológica e toxicidade em estudos com espécies de *Schistosoma* (BOISSIER et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010).

Os resultados mostram que o extrato etanólico da semente (EES) da *G. brasiliensis* apresentou atividade ED₉₀ em torno de 100 µg/mL. Para as frações hexânica (FHS) e acetato de etila (FAES) obtidas por partição, à atividade ED₉₀ apresentou-se em torno de 97,0 e 90,0 µg/mL, respectivamente. O ED₅₀ para o EES foi de 64,0 µg/mL, enquanto que nas frações FHS e FAES, o ED₅₀ foi de 64,0 e

71,0 µg/mL, respectivamente. A fração aquosa não apresentou atividade em 200,0 µg/mL, que foi a maior dose testada. Extratos de *Phyllanthus amarus*, conhecida popularmente como quebra-pedra, foram utilizados em testes contra o *S. mansoni* da linhagem BH em *Mus musculus* infectados (OLIVEIRA, 2008). Comumente utilizada no tratamento de doenças hepáticas e urogenitais, quando empregada sobre o *S. mansoni*, *P. amarus* ocasionou redução de até 63,0 % no número de vermes e cessou a postura de ovos evidenciando uma potencial atividade esquistossomicida da planta (OLIVEIRA, 2008). A maioria das atividades biológicas de produtos naturais em extratos de própolis, como antimicrobiano, tripanocida e antitumoral são associadas principalmente aos seus compostos prenilados, sendo isso verdadeiro talvez para benzofenonas (SASAKI et al., 2012).

Nos estudos realizados com a molécula isolada GUT-A, a atividade esquistossomicida significativa foi presenciada a partir da concentração de 18,0 µg/mL nos ensaios *in vitro*. A partir dessa concentração foi capaz de matar 100,0 % dos parasitos, com 24 horas de incubação, permitindo chegar ao valor do ED₅₀ em 21,8 µg/mL (FIGURA 19). O valor de ED₅₀ é útil para estabelecer e monitorar a susceptibilidade de fármacos e perfis de resistência da cepa do parasita (CIOLI ; 2004). Segundo Pereira (2008), em ensaios realizados com a GUT-A em *Leishmania (L.) amazonensis*, o valor de ED₅₀ para as formas promastigotas foi de 18.12 µg/mL, enquanto que para as formas amastigotas o ED₅₀ foi de 2,93 µg/mL.

A análise por microscopia revelou danos progressivos sobre a superfície, provocando bolhas e despreendimento no tegumento. O tegumento é extremamente importante para o sucesso da infecção e sobrevivência no hospedeiro. Essa estrutura desempenha um papel fundamental na proteção contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro, além da capacidade de absorver nutrientes, moléculas e sintetizar algumas proteínas (LIMA et. al. 1994). Com isso, tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos esquistossomicidas. As alterações na superfície do tegumento têm um efeito dependente da dose. Esses danos tegumentares foram semelhantes aos relatados em estudos com PZQ (WILLIAM et al., 2001). O dano tegumentar ocorre após incubações com doses menos elevadas do que as concentrações letais, sugerindo que a morte do verme é causada por mecanismos diferentes. Contudo, o dano tegumentar pode não resultar sempre em morte (SHUHUA et al., 2000). Lesões graves no tegumento foram

relatadas em vermes adultos fêmeas de *S. mansoni*, quando tratados com artemether (XIAO et al., 1985, 2000). Os medicamentos usados atualmente contra a esquistossomose, como PZQ (SHUHUA et al., 2000, WILLIAM et al., 2001), e os fármacos experimentais, como a Mefloquina (MANNECK et al., 2010) e Artemeter (XIAO et al., 2000) agem através do dano no tegumento do verme. No presente trabalho, os vermes machos tratados com PZQ foram mais suscetíveis à ação tegumentar do que fêmeas.

Para verificar os danos causados no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* foi usado a sonda Hoechst 33258, que é um marcador específico para o DNA das células. A sonda Hoechst 33258, que se liga ao DNA das células, é muito sensível na marcação das regiões onde há presença de dano, sendo que qualquer estrago ou lesão no tegumento do verme, por menor que seja, é marcado precisamente por esta sonda (OLIVEIRA et al., 2006). A utilização desse marcador fluorescente nos experimentos realizados demonstrou que em concentrações a partir de 16,0 µg/mL de GUT-A *in vitro* foi capaz de lesionar o tegumento dos parasitos, sendo que nos machos esses danos foram mais evidenciados que nas fêmeas de *S. mansoni*.

Ainda assim, os mecanismos pelo quais o extrato etanólico da semente, as frações testadas e a GUT-A exercem seus efeitos sobre o tegumento ainda não foram elucidados. Sato et al. (2002) observaram o efeito modulador de alguns fármacos, previamente conhecidos por interagirem com proteínas transportadoras de células animais, sobre o sistema excretor do verme adulto macho de *S. mansoni*. Para tanto, fizeram uso de uma sonda fluorescente denominada Resorufin, que difunde-se e é excretada passivamente através do tegumento integro do parasito, a qual por sua vez é um substrato da P-glicoproteína. A marcação dos parasitos com a sonda Resorufin mostrou que 18,0 µg/mL de GUT-A foram capazes de paralisar a atividade excretora dos vermes adultos de *S. mansoni*. Tal fato pôde ser observado pelo impedimento de saída da sonda (substrato da P-glicoproteína - PGP) para o meio externo, ocasionado pela presença da GUT-A. Sendo assim, suspeita-se que, de alguma forma, a GUT-A atue no sistema excretor, interferindo na atividade da PGP. Esse mecanismo também ainda não foi totalmente elucidado. O mesmo resultado foi observado por Sato et al. (2002) na presença da amilorida (inibidor da bomba de Na⁺ e da Na⁺/H⁺ ATPase).

Novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação dos extratos testados, bem como da GUT-A sobre o *S. mansoni*. Verificar a atividade esquistossomicida em testes *in vivo* pode ser útil para investigar suas ações no hospedeiro, o que deve proporcionar novas perspectivas para o controle alternativo de parasito e desenvolvimento de medicamentos eficazes contra a esquistossomose.

8 CONCLUSÕES

A partir do presente estudo concluímos que:

- a) O extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis*, das frações obtidas por partição e da molécula isolada GUT-A apresentaram uma significativa atividade esquistossomicida em tratamento *in vitro* em verme adulto de *S. mansoni*.
- b) Os compostos analisados causaram paralisia total, bem como desprendimento de tegumento nos vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*.
- c) Alterações morfológicas no tegumento e no sistema excretor dos parasitos também foram evidenciadas pelos marcadores fluorescentes.
- d) Na fração aquosa esses efeitos não foram observados.
- e) A alta taxa de mortalidade, aliadas aos danos causados no tegumento e no sistema excretor dos parasitos colocam a GUT-A como um promissor agente esquistossomicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants 3.1 leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 27, n. 1, p. 141-143, jan. 2004.
- ALMEIDA, L. S. B. et al., Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p.886–891, 2008
- ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**, Washington, v.62, n.2, p.369-371, 1999.
- ANTHONY, J. P.; FUFÉ, L.; SMITH, H. **Plant** active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitol.** V.21 (10): p. 462-468, 2005.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. Activity of the Artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p.185-188, 1991.
- ARAÚJO, N.P. et al., Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com Oxaminiquina e praziquantel e não curados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 467–476, 1996.
- BAH, S. et al., Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. **Jornal of Ethnopharmacol**, v. 105, n. 3, p. 387-399, 2006.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583-600, 2001.
- BARTH, L. R. et al. Effects of goyasensolidos during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 427-429, 1997.
- BASSILY, S. et al. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 629–634, 1985.
- BECKER, B. et al. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. **Z Parasite**, v. 63, p. 113-128, 1980.
- BINA, J. C. e SPINOLA, A. Convulsão associada ao uso de Oxaminiquina. Relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 221–223, 1976.

BILLO, M. et al. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 96, n.3, p. 569-575, jan. 2005.

BOONSRIA, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 723-727, 2006.

BONESSO-SABADINI, P.I.P.; DIAS, L.C.S. Altered response of *Schistosoma mansoni* to Oxaminiquina and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 381–385, 2002.

BOTROS, S. et al.; Effect of combined low dose praziquantel and Oxaminiquina on different stages of schistosome maturity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 86–89, 1989.

BOTROS, S., et al. Antischistosomal activity of hexadecyloxypropyl cyclic 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyladenine and other alkoxyalkyl esters of acyclic nucleoside phosphonates assessed by schistosome worm killing *in vitro* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 5284–5287, 2009.

BOISSIER, J., et al. In vitro activities of trioxaquines against schistosoma mansoni. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53(11), p. 4903-4906, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs/>> Acesso em 16 de novembro de 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 178 p. Brochura, 26 cm, il, color. (Série A: Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-52-334-1438-9.<Disponível em: http://portal.saude.gov.br /portal /arquivos /pdf / manual _controle moluscos.pdf.> Acesso em 14 jun. 2012.

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current opinion in chemical biology**, v 11, p. 433-439, 2007

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1. ed. Chapecó: Argos, 2001

CAMPOS, R. et al. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de Oxaminiquina com praziquantel. I - observações experimentais relativas à fase pré-patente. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 42, n. 5, p. 201–203, 1987

CARVALHO, S.A. et al. Neurotoxicidade do Oxaminiquina no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; v. 27: p. 132 – 142, 1985

CASTARDO JC, et al. Efeitos anti-inflamatórios do extrato e dois biflavonóides de *Garcinia gardneriana* em edema de pata de rato **Journal of Ethnopharmacology**, v.118 , p. 405-411, 2008

COURA JR, AMARAL RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 13-19, 2004.

CHIANG, L. et al. *In vitro* evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, n.5, p. 539-544, 2004

CHEEVER A.W., HOFFMANN K.F., WYNN T.A. Imunopatologia da esquistossomose mansoni em ratos e homens. **Immunol Today**, v. 21, p. 465-466, 2000

CHIRAC P.; TORRELE E. Global framework on essential health ReD. **Lancet**, v.377, p.1560-1561, 2006.

CHITSULO, L., et al. O status global da esquistossomose e seu controle **Acta Trop.**, v. 77, p. 41-51, 2000

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n. 9, p. 3963-3986, 2006.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA L.; MORONI, R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/Oxaminiquina resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Experimental Parasitology**, v. 75, p. 425–432, 1992.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drugs resistance in schistosomes. **Parasitology Today**. v. 9, n. 5, p.162-166, 1993.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 35-85, 1995.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **The Journal Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. 3-9, 2003.

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.

COELHO L.P., et al *et al.* 7-epiclusianona, uma benzofenona tetraprenilada que relaxa o músculo liso das vias aéreas através da ativação da via óxido nítrico-GMPc **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327 (1) , p. 206-214,2008

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 232-234, 1926.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 13-19, 2004

CUI J., et al. Novas propriedades medicinais de mangostins: atividade analgésica e caracterização farmacológica de ingredientes ativos a partir do casco fruto da *Garcinia mangostana* **Farmacologia, Bioquímica e Comportamento**, 95 , p. 166-172,2010.

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola drilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia padulosa*) (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica in vivo**. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006

DA CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>, Acesso em: 07 abr. 2008.

DAY, T.A.; BENNETT, J.L.; PAX, R.A. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**, v. 8, p. 342–344, 1992.

DE ARAÚJO, S. C., et al., Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.337(1-2), p. 307-315, 2007

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 655–659, 1983.

DELLE MONACHE, G. et al. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry Letters**, v. 23, n. 8, p. 1757 – 1759, 1984.

DIAS, J. P. S. **A farmácia e a história: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica**. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2005.

DOENHOFF, M.J. et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 465-469, 2002.

DOENHOFF, M. J., CIOLI, D., UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis **Infect Diseases** v.21, p. 659–667 2008

DUNNE D.W.; PEARCE E.J., "Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective", **Microbes and Infections**, v. 1(7), p. 553-560, 1999

ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop**, v. 82, p. 139-146, 2002.

FALLON, P. G. e DOENHOFF, M. J. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and Oxaminiquina induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 83 – 88, 1994.

FALLON, P.G. et al. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 1, p. 61–62, 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: **Atheneu**, 1988.

FERRARI, T. C. A.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**. v.108, p. 83-88, 2008.

FERRARI, M. L. A., et.al. Efficacy of Oxaminiquina and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull World Health Organ**; v. 81(3): p. 190–196; 2003.

FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. **Academia Brasileira de Ciências**. 1998.

FETTERER, R. H.; PAX, R.A.; BENNETT, J.L. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 31-38, 1980.

FOSTER, R. et al. The control of immature *Schistosoma mansoni* im mice by UK 3883, a novel 2- aminomethyltetrahydroquinoline derivative. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 65, p. 221–232, 1971.

FOTIE, J. D. et al. Trypanocidal and antileishmanial dihydrochelerythrine derivatives from *Garcinia lucida*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 10, p. 1650-1653, 2007.

GRYSHECK, R.C.B.; CARVALHO, S. A.; AMATO-NETO, V. Eficácia e tolerabilidade da associação Oxaminiquina com praziquantel no tratamento da infecção humana por *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 2, n. 6, p. 168 –170, 2004.

GRYSEELS B., POLMAN K., CLERINX J., KESTENS L. Esquistossomose humana **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006

GUO, Q. et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Life Sciences**, v. 78, n. 11, p. 1238-1245, 2006.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992.

HAY, A. E. et al. Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. **Fitoterapia**, v. 79, p. 42–46, 2008.

HAYAMIZU, K. et al. Effects of *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Current Therapeutic Research**. v. 64, n. 8, p. 551-567, 2003.

ISMAIL. M. et al.; Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932–935, 1999.

IWU, M. M. et al. *Garcinia Kola*: a new look at an old adaptogenic agent. **Advances in Phytomedicine**, v.1, p. 191-199, 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENA, B. S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v.7, n.3, p.246-250, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 6 ed. São Paulo: Editora Nacional, v.6, p. 332-334, 1993.

JOSEPH, G. S. et al. Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, n. 2, p. 153-160, 2005.

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, PEIXOTO S.V. 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. 303-8, 2000.

KATZ, N. et al. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, n. 6, p. 381–387, 1973

KATZ, N. et al. Efficacy of alternating therapy with Oxaminiquina and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 509-512, 1991.

KATZ, N. e ALMEIDA, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. **Ciências e Cultura**, v. 55, n.1, São Paulo Jan./Mar 2003.

KATZ, N., e COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of *Schistosomiasis mansoni*: The brazilian contribution. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 72-78, 2008.

KEISER J., et al. Mefloquine - aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice **Negl. Trop. Dis.**, v. 3 , p. 1-11, 2009.

KOKO, W.S. et al. Evaluation of oral therapy on Mansonial Schistosomiasis using single dose of *Balanites aegyptiaca* fruits and praziquantel. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 30-34, Jan. 2005.

KRAJDEN, S.; KEYSTONE, J.S.; GLENN, C. Safety and toxicity of Oxaminiquina in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 1344–1346, 1983.

LEE, K. et al. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 535-541, set. 2003.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007a.

LENTA, B. N. et al.; *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 8-12, 2007b.

LESCANO, S. Z. et al. Antischistosomal activity of artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 1, p. 71-75. 2004

LEWIS, D. A. HANSON, P. J. Anti-ulcer of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 201-231, 1991.

LIANG, Y. S. et al. *In vitro* responses of praziquantelresistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 1227-1235, 2001.

LIANG, Y. S. et al. Susceptibility to praziquantel of male and female cercarie of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, v. 84, p. 202-207, 2009.

LIMA, F. L. et al. Altered behavior of carbohydrate- bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damaged by praziquantel. **Parasitology**, v. 109, p. 469 – 477, 1994a

LIMA, S. F. et al. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 109, p. 57–64, 1994b.

LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal Bioactivity of Isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 163–170, 2002.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, L. G., et al., In vitro schistosomicidal activity of curcumin against schistosoma mansoni adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n.5, p. 1197-1201, 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 .

MAHRAN, M. A., WILLIAM, et.al. M., Synthesis and in vitro evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents. **Molecules**, v. 12 , n.3, p. 622-633, 2007.

MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 85-98, 2010.

MARTINS, F. T. **Estudo cristalográfico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rheedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutura-atividade**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008.

MARTINS F.T., et.al. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Soe v.18, p. 1515, 2007.

MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia livingstonei*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 369-372, 2006.

MEDINA, M. A. et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Science**, v. 79, n. 2, p.105-111, 2006.

MEHLHORN H, et al. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Arzneimittelforschung**, v. 31, p. 544 – 554, 1981.

MELMAN, S.D; et.al. Para a compreensão do mecanismo de ação de Praziquantel **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 164, p. 57-65; 2009

MIRANDA MA, et.al. Avaliação da atividade esquistossomicida dos alcalóides esteroidais de frutos *Solanum lycocarpum* **Parasitol. Res.**, v. 111, p. 257-262, 2012.

MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. *Sativa seeds* against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 205-211, 2005.

MONA, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. [efeitos terapêuticos do *Allium sativum* e *Allium cepa* na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*] **Revista do Instituto De Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 3, p. 155-163, 2011.

MONACHE, et al. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1757– 759, 1984.

MORTON, J. Fruits of warm climate. Miami: Julia F. Morton, v.1, p. 309-310, 1987.

MOSTAFA, O. M.; EID, R. A.; ADLY, M. A. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**, v. 109, p. 395-403, 2011.

MURATA, R.M. et al., Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluo- 466 ride. **Biofouling**, v. 26, p. 865–872, 2010.

MURATA, R.M., et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytotherapy Research**, v.. 24, n. 3, p. 379-383, 2010.

NALDONI, F.J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinl Food**, v. 12, p. 403–407, 2009.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 555-558, 2002.

NEGHINA, et.al. Esquistossomose intestinal, a importação de uma doença tropical negligenciada na Roménia: relato de caso de um viajante para regiões endêmicas **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 7, p 49-51, 2009.

NEVES, J.S., et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetrapreny- 475 lated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 73, p. 644–649. 2007

NOVAES MRCG, SOUZA JP, ARAÚJO HC. **Síntese do antihelmíntico praziquantel, a partir da glicina**. Quím Nova; v.1, p. 22(1):5-10, 2007.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Two polyisoprenilated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Estudo da atividade de *Phyllanthus amantus* L. contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH. 2008. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Belo Horizonte, 2008.

OLIVEIRA F.A, et al. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**, v. 132, p. 321-30, 2006.

OLIVEIRA, T. T. et al. Atividade antidiabética de *Bauhinia sacra*, corantes naturais, ácido cinâmico e 7-epiclusianona. **News Laboratory**, v. 72, p. 172-190, 2005.

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, 2006.

PAX, R. A.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 304, p. 309–315, 1978.

PEARCE, E. J. AND MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Rev. bras. Malar.**; v.8, p. 589-597, 1956.

PELLEGRINO, J.; et.al. New approach to screening of drugs in experimental *Schistosomiasis mansoni* in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11, p. 201-215, 1962.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental Chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 233-291, 1968.

PEREIRA, I.O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339–345, 2010.

PEREIRA, C. et al. Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 117, p. 63–73, 1988.

PICA-MATTOCCIA L.; CIOLI, D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal of Parasitology**, v. 34, p. 527-533, 2004.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. IV **Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal**, Corumbá. 2004

PRATA, A. et al. Tratamento da esquistossomose pela Oxaminiquina em dose única. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 127–136, 1975.

RAO, L. J. M. et al. Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2004.

REDMAN, C. A. et al. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitology Today**, v. 12, n. 1, p. 14-20, 1996.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e Domesticação de Plantas medicinais. In: **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. UFRGS editora, Porto Alegre, RS, v. 6, Cap. 3, p.45-74, 2007.

RIBEIRO, F. et al. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 116, p 229-236, 1998.

SANTA-CECÍLIA FV, et al. Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos da *Garcinia brasiliensis* **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p. 467-473,2011.

SANTOS, M. H. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr. e aplicações biológicas dos seus constituintes**. 1996. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.654-660, 1999.

SASAKI, H., et.al.. Prenylated flavonoids from desmodium caudatum and evaluation of their anti-MRSA activity. **Phytochemistry**, v.1 , p.51-55, 2012.

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, p. 527-535, 2002.

SAYED A.A, SIMEONOV A, THOMAS C.J, et al. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nat Med**; v.14, p. 407–412, 2008.

SHUHUA, X. et al. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with praziquantel enantiomers. **Acta Tropica**, v. 76, p. 107–117, 2000.

SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 91-95, 1989.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. **Parasitology**, v.55, p. 695–700, 1965.

SPARG, S. G.; VAN STANDEN, J.; JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against Schistosomiasis. **Journal Ethnopharmacol**, v. 73, p. 209-214, 2000.

STEINMANN P, et.al. Schistosomiasis and water resource development: systematic review, meta analysis, and estimates of people risk. **Lancet Inf Dis**; v.6 , n.7, p.411-25, 2006.

TONUCI, L. R. S., et al. In vitro schistosomicidal effects of the essential oil of tagetes erecta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2011.

UTZINGER, J. et al. The potential of artemether for the control of schistosomiasis, **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1549-1562, 2001.

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. 125-39, 2003.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Apl**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VIEGAS, Jr. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILLAGÓMEZ ROJAS, A. **Estudio preliminar de la densidad morfológica distribución, producción y comercialización del achachairu (*Rheedia spp.*) en Santa Cruz de la Sierra**. Santa Cruz de la Sierra: Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Faculdade de Ciências Agrícolas, p.32-37, 1990.

WILLIAM, S. et al., Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 63-66, 2001.

WILLIAM, S.; BOTROS, S. Validation of sensitivity to praziquantel using *Schistosoma mansoni* worm muscle tension and CA²⁺ uptake as possible *in vitro* correlates to *in vivo* ED₅₀ determination. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 971–977, 2004.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 912, p. 1-57, 2002.

WHO. Schistosomiasis. Geneva: **World Health Organization**; <http://www.who.int/schistosomiasis/en/> [acessado 11 de junho 2012].

WU, M. H. et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levopraziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of *Schistosomiasis japonica*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 345– 349, 1991.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 1130–11 37, 1985.

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, p. 1557–1562, 1989.

XIAO, S.H.; CATTO, B. A. The profilatic effects of Artemether against *Schistosoma japonicum* infections. **Parasitology Today**, v. 16, p. 122-126, 2000.

XIAO SH, et al., *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1440 – 1445, 2007.

YUANQING, Y.; et al. Histopathological changes in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters treated with artemether. **Acta Tropica**, v. 79, p. 135-141, 2001.

ZAGOTOA, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy - metabolism in the rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n.1-2, p. 47-54, 2006.