



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



ALINE PEREIRA

**BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS ORGÂNICOS NATURAIS COM
POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA**

ALFENAS – MG

2013

ALINE PEREIRA

**BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS ORGÂNICOS NATURAIS COM
POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA**

Dissertação, requisito parcial, para obtenção do título de mestre, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos. Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.

ALFENAS – MG

2013

Pereira, Aline.

Busca de novos compostos orgânicos naturais com potencial esquistossomicida / Aline Pereira. - 2013.

118 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Schistosoma mansoni. 2. Esquistossomose. 3. Fitoterapia -
Esquistossomose. 4. Compostos Orgânicos. 5. Benzofenonas. 6.
Biflavonóides. I. Santos, Marcelo Henrique dos. II. Título.

CDD: 615.1

ALINE PEREIRA

**BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS ORGÂNICOS NATURAIS COM
POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.

Aprovada em:

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____

Prof. Dra. Florence Mara Rosa
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: _____

Dedico a Deus, a meu esposo e filha, a meus pais e amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelas bênçãos diárias em minha vida e por toda força que tem me proporcionado para enfrentar e superar os obstáculos ao longo da minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, meu orientador, exemplo de pessoa humana e amiga, pela confiança e oportunidade, pela atenção e por estar sempre presente, participando e, incentivando o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, meu querido coorientador, pessoa iluminada que tive a honra de conhecer e a oportunidade de trabalhar. Meu muito obrigado pela amizade, pelo carinho, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelas horas agradáveis de trabalho.

À Prof. Raquel Lopes Martins Souza, pessoa essencial para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, correções, sugestões, boas conversas e, principalmente, pelo incentivo e apoio.

À Prof. Danielle Dias pela disposição e por toda ajuda durante esse período.

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, pela amizade, ajudas constantes, momentos de alegria e descontração, durante todos esses anos de permanência. Em especial ao Israel que foi um grande amigo e que me ajudou muito, a Jaqueline, Kris, Cláudia Mara, Maria Cecília, Flávia Viegas, Francieli, João, Bianca e Claudinei, muito obrigada.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo auxílio e infraestrutura disponibilizada. E pelos amigos Fábio, Leticia, Karina e Giulliano, obrigada pelas ajudas e pelos momentos de descontração.

Aos alunos de iniciação científica Matheus Siqueira e Naira Ferreira Anchieta pelo apoio oferecido durante os experimentos, sem vocês este trabalho não seria possível ser concluído,

muito obrigada pela colaboração. Sentirei muita a falta de vocês, em especial das nossas conversas e do nosso trabalho;

À Ana Carolina de Mattos, uma grande pessoa que conheci no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, muito obrigada por sua ajuda, pelo incentivo, pelas correções, pelas sugestões, pela amizade pelo carinho e pelas horas agradáveis que passamos juntas. Com certeza você tem uma participação especial neste trabalho.

À Neusa Araújo pela grande ajuda nos testes *in vivo*.

Ao meu marido Herick e minha filha Luna pela compreensão durante minhas ausências, pelo companheirismo, dedicação e apoio.

Aos meus pais José Maria e Arlette que se fizeram presentes em cada momento desta importante jornada da minha vida, merecendo assim minha eterna gratidão pelo amor e carinho;

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico e científico que proporcionou para realização deste trabalho.

A vocês que estiveram ao meu lado nas horas em que chorei e nas horas em que sorri, nas horas em que me lamentei e nas horas em que me mostrei alegre. Agradeço pelo sorriso diário, pela convivência agradável. Agradeço mais uma vez a todos que de alguma forma contribuíram para este momento de grande alegria em minha vida.

Obrigada a todos por tudo!

Tua é, SENHOR, a magnificência, e o poder, e a honra, e a vitória, e a majestade; porque teu é tudo quanto há nos céus e na terra; teu é, SENHOR, o reino, e tu te exaltaste por cabeça sobre todos.

(I Crônicas 29.11)

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, com alta morbidade e mortalidade, que afeta atualmente mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Para a Organização Mundial de Saúde o praziquantel (PZQ) é a droga de escolha para o tratamento de indivíduos parasitados, porque apresenta um amplo espectro de ação sobre *Schistosoma mansoni*. No entanto, alguns estudos descrevem várias cepas do parasito que são resistentes ao PZQ, fazendo-se necessário, estudos de novos medicamentos que possam ser utilizados no tratamento da esquistossomose. Neste sentido, as propriedades esquistossomicida do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*, bem como suas frações obtidas por partição, tais como a hexânica, a acetato de etílica, a aquosa e os compostos isolados 7-epiclusianona e fuketina foram testadas *in vitro* em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Os resultados indicam que, a fração hexânica apresentou melhor atividade *in vitro* sobre vermes adultos de *S. mansoni*, quando comparada com o extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* e com as frações aceto de etílica e aquosa. Com base nesse achado foi feito um cromatograma cujo resultado confirmou a 7-epiclusianona como componente majoritário da fração hexânica. Esta fração foi então cromatografada em coluna de sílica gel proporcionando a molécula purificada 7-epiclusianona, a qual mostrou uma atividade significativa contra esquistossômulo, cercárias e vermes adultos de *S. mansoni*. A atividade sobre os vermes adultos foi investigada pelo monitoramento da mortalidade, danos na superfície da membrana e atividade do sistema excretor. Os danos na superfície da membrana e a atividade do sistema excretor puderam ser observados pelas sondas fluorescentes Hoechst 33258 e Resorufin, respectivamente. Os resultados indicam o seu forte efeito contra esse parasita e também mostraram um efeito inibitório sobre a postura de ovos nos vermes adultos fêmeas de *S. mansoni*, quando comparada com o extrato original e suas frações. Ao avaliar a atividade sinérgica da 7-epiclusianona em associação com o Praziquantel no contexto *in vitro* foram observados efeitos sinérgicos devido a essa associação. A eficácia da 7-epiclusianona isoladamente e em associação com o PZQ também foi avaliada *in vivo* por meio da contagem e distribuição de vermes no mesentério e fígado e mudanças no oograma. No esquema quimioterápico utilizado, a 7-epiclusianona não apresentou atividade esquistossomicida e o resultado da associação com praziquantel não foi significativamente diferente da obtida quando administrada isoladamente. Os resultados *in vitro* obtidos no presente estudo confirmam que o extrato etanólico do epicarpo da *G. brasiliensis*, bem como suas frações hexânica e acetato de

etila e a molécula isolada 7-epiclusionona isoladamente e em associação com o PZQ apresenta forte atividade esquistossomicida. No entanto, nos ensaios preliminares *in vivo* não foi possível observar os efeitos encontrados nos testes *in vitro*, da 7-epiclusionona isolada e em associação com o praziquantel. Isso provavelmente está relacionado ao fato da 7-epiclusionona ser uma substância altamente lipossolúvel o que dificulta sua solubilidade nos solventes adequados para administração oral. Ensaios posteriores serão realizados tendo como abordagem a mudança da lipofilicidade da 7-epiclusionona nos ensaios esquistossomicidas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. *Garcinia brasiliensis*. Compostos orgânicos. Benzofenonas. 7-epiclusionona. Biflavonóide. Fukugetina.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease with high morbidity and mortality, which currently affects over 200 million people around the world. For the World Health Organization praziquantel (PZQ) is the drug of choice for treatment of infected individuals, because it has a broad spectrum of activity against *S. mansoni*. However, few studies describe several strains of the parasite that are resistant to PZQ, making studies of new drugs that can be used in the treatment of schistosomiasis necessary. In this sense, the properties of the schistosomicidal ethanolic extract of *Garcinia brasiliensis* epicarp and its fractions obtained by partitioning, such as hexane, the ethyl acetate, the aqueous and the compounds isolated and 7-epiclusianone and fukugetina were tested *in vitro* with adult worms of *Schistosoma mansoni*. The results indicate that the hexane fraction showed better activity *in vitro* on adult worms of *S. mansoni*, when compared with the ethanol extract of the *G. brasiliensis* epicarp and with ethyl acetate and aqueous fractions. Based on this finding a chromatogram was made and the results confirmed the 7-epiclusianone as major component of the hexane fraction. This fraction was then chromatographed on silica gel column providing the purified molecule 7-epiclusianone, which showed significant activity against schistosomula, cercariae and adult worms of *S. mansoni*. Activity on adult worms was investigated by monitoring the mortality, surface membrane damage and excretory system activity, where the damage to the surface of the membrane and on the activity of the excretory system could be observed by fluorescent probes Hoechst 33258 and Resorufin, respectively. The results indicate its strong effect against all stages of parasite and also showed an inhibitory effect on the oviposition of female adult worms of *S. mansoni* when compared with the original extract and its fractions. Synergistic activity of 7-epiclusianone was also evaluated *in vitro* in combination with Praziquantel, and synergistic effects were observed due to this association. The efficacy of 7-epiclusianone alone and in combination with PZQ *in vivo* has been evaluated through counting and distribution of worms in the liver and the mesentery and changes in oogram. In the chemotherapy regimen used, the 7-epiclusianone showed no schistosomicidal activity and the result of the combination with praziquantel was not significantly different from that obtained when these latter two drugs were administered alone. The *in vitro* results obtained in the present study confirm that the ethanol extract of the *G. brasiliensis* epicarp and its fractions hexane, ethyl acetate and the isolated substance 7-epiclusianone alone and in combination with PZQ shows strong schistosomicidal activity. However, in preliminary tests

in vivo it was not possible to observe the 7-epiclusianone alone and in combination with praziquantel effects found in *in vitro* tests. Probably this is related to the fact that 7-epiclusianone be a highly liposoluble substance which makes its solubility difficult in appropriate solvents for oral administration. Subsequent tests will be conducted in order to study the change of the 7-epiclusianone lipophilicity *in vitro* and *in vivo* schistosomicidal assays.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis, *Garcinia brasiliensis*. Organic compounds. Benzophenones. 7-epiclusianone. Bioflavonoids. Fukugetin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Mapa da distribuição da esquistossomose no mundo	23
FIGURA 2	- Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil	24
FIGURA 3	- Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	26
FIGURA 4	- Estruturas químicas: Oxamniquina.....	30
FIGURA 5	- Estruturas químicas: Prazinquantel	31
FIGURA 6	- Fruto/semente de bacupari	42
FIGURA 7	- Anel difenilmetanona.....	43
FIGURA 8	- Anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.....	43
FIGURA 9	- Exemplos de acilfloroglucínóis proliprenilados.....	44
FIGURA 10	- Estrutura química da benzofenona 7-Epiclusianona	45
FIGURA 11	- Estrutura química do biflavonóide fukugetina	46
FIGURA 12	- Esquema do ensaio biomonitorado para extração e purificação dos constituintes a partir do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i>	51
FIGURA 13	- Esquema da obtenção dos parasitas para teste <i>in vitro</i>	56
FIGURA 14	- Estrutura molecular da Resorufin	58
FIGURA 15	- Estrutura molecular da Hoechst 33258.....	58
FIGURA 16	- Esquema do experimento de marcação dos vermes com a sonda Resorufin	60
FIGURA 17	- Esquema do experimento de marcação dos vermes com a sonda Hoechst 33258.....	61
FIGURA 18	- Esquema de infecção, tratamento e perfusão	65
FIGURA 19	- Cromatogramas obtido por cromatografia líquida alta performance..	69
FIGURA 20	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> EEE de <i>G. brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>S. mansoni</i>	71
FIGURA 21	- Atividade <i>in vitro</i> do EEE sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	71
FIGURA 22	- Cálculo do ED ₅₀ do EEE na viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	72
FIGURA 23	- Efeito <i>in vitro</i> do EEE sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.....	72

FIGURA 24	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FH da partição do EEE <i>G. brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>S. mansoni</i>	73
FIGURA 25	- Atividade <i>in vitro</i> do FH sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	74
FIGURA 26	- Cálculo do ED ₅₀ da FH na viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	74
FIGURA 27	- Efeito <i>in vitro</i> da FH sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.....	75
FIGURA 28	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FAE do EEE <i>G. brasiliensis</i> em vermes adulto de <i>S. mansoni</i>	76
FIGURA 29	- Atividade <i>in vitro</i> do FAE sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	76
FIGURA 30	- Cálculo do ED ₅₀ da FAE na viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	77
FIGURA 31	- Efeito <i>in vitro</i> da FAE sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.....	77
FIGURA 32	- Atividade <i>in vitro</i> do FA sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	78
FIGURA 33	- Efeito <i>in vitro</i> da FA sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.....	78
FIGURA 34	- Atividade <i>in vitro</i> da FUK sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	80
FIGURA 35	- Efeito <i>in vitro</i> da FUK sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações.....	81
FIGURA 36	- Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da 7-epi em vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	82
FIGURA 37	- Atividade esquistossomicida do EEE de <i>G. brasiliensis</i> e suas frações, FH, FAE, FA e molécula isolada, 7-epi e Fuk.....	84
FIGURA 38	- Atividade <i>in vitro</i> da 7-epi sobre a viabilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	84
FIGURA 39	- Cálculo do ED ₅₀ da 7-epi na viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	85

FIGURA 40 - Efeito <i>in vitro</i> da 7-epi sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i>	85
FIGURA 41 - Marcação dos danos no sistema excretor, pela sonda Resorufim.....	86
FIGURA 42 - Marcação dos danos no tegumento pela sonda Hoechst 33258	87
FIGURA 43 - Alteração morfológicas das cercárias de <i>S. mansoni</i>	87
FIGURA 44 - Efeito de diferentes concentrações de 7-epi sobre a viabilidade de Cercarias.....	88
FIGURA 45 - Alterações morfológicas dos esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>	89
FIGURA 46 - Efeito de diferentes concentrações de 7-epi sobre a viabilidade de esquistossômulos.....	90
FIGURA 47 - Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da associação de PZQ 0,5 µg/mL com 7-epi 8 µg/mL, 7-epi 4 µg/mL, 7-epi 2 µg/mL.....	91
FIGURA 48 - Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da associação de PZQ 0,25 µg/mL com 7-epi 8 µg/mL, 7-epi 4 µg/mL, 7-epi 2 µg/mL.....	91
FIGURA 49 - Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da associação de PZQ 0,1250 µg/mL com 7-epi 8 µg/mL, 7-epi 4 µg/mL, 7-epi 2 µg/mL	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Cálculo do limite de detecção e quantificação	52
TABELA 2	- Grupos experimentais e tratamentos.....	64
TABELA 3	- Principais componentes encontrados no EEE e nas frações identificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance	70
TABELA 4	- Análise da atividade esquistossomicida do EEE e de suas frações: hexânica, acetato de etila e aquosa obtidos do epicarpo de <i>G.brasiliensis</i> frente ao ED90	79
TABELA 5	- Análise da atividade esquistomicida (ED ₉₀) da 7-Epi e da Fuk em diferentes concentrações	83
TABELA 6	- Comparação da atividade esquistossomicida (dose letal em µg/mL) do extrato e das frações e suas quantidades (mg/g) de 7-epi	83
TABELA 7	- Comparação da taxa de perda da calda (%) quando exposto a diferentes concentrações de 7-epiclusianona por até 8 horas de incubação.....	88
TABELA 8	- Comparação da taxa de mortalidade (%) quando exposto a diferentes concentrações de 7-epi por até 48 horas de incubação	89
TABELA 9	- Resultado obtidos da infecção de camundongos infectados experimentalmente com 100 +/- 10 cercárias de <i>S. mansoni</i> (cepa LE), tratados oralmente.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	–	Coluna de Sílica gel
ED ₅₀	–	Dose efetiva para matar 50% dos vermes
ED ₉₀	–	Dose efetiva para matar 90% dos vermes
EEE	–	Extrato etanólico do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i>
FA	–	Fração aquosa do extrato etanólico do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i>
FAE	–	Fração acetato-etílico do extrato etanólico do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i>
FH	–	Fração hexânica do extrato etanólico do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i>
FIOCRUZ	–	Fundação Oswaldo Cruz
FUK	–	Fukugetina
LE	–	Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem susceptível ao PZQ mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
OPG	–	Contagem de ovos por grama de fezes
OXA	–	Oxaminiquina
PZQ	–	Praziquantel
SFB	–	Soro fetal bovino
TLC	–	Cromatografia em camada delgada
WHO	–	<i>World Health Organization</i>
7-EPI	–	7- Epiclusianona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	A Esquistossomose	23
2.1.1	Ciclo de vida do parasito.....	25
2.1.2	Patogenia e Diagnóstico.....	27
2.1.3	Controle.....	29
2.1.4	Tratamento	29
2.1.4.1	Oxamniquina	30
2.1.4.2	Praziquantel.....	31
2.1.5	Resistência a drogas esquistossomicidas	32
2.1.6	Associação de diferentes compostos com PZQ	34
2.2	Plantas medicinais	35
2.2.1	Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica	36
2.2.2	Plantas com atividade esquistossomicida	37
2.2.3	Família Guttiferae	40
2.2.4	Gênero <i>Garcinia</i>	41
2.2.5	A espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	42
2.2.6	Estudos fitoquímicos	43
2.2.7	A 7-epiclusianona	44
2.2.8	A fukugetina	46
3	JUSTIFICATIVA	47
4	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivos gerais	49
4.2	Objetivos específicos	49
5	PARTE EXPERIMENTAL	50
5.1	Coleta do material vegetal.....	50
5.2	Estudo fitoquímico	50
5.2.1	Preparo do extrato, das frações e isolamento das substâncias	50
5.2.2	Análises Cromatográficas	52
5.2.3	Limite de detecção e quantificação	52
5.2.4	Determinação do conteúdo de flavonóides totais	53
5.3	Ensaio esquistossomicida	53

5.3.1	Ciclo de vida.....	53
5.3.2	Caramujos e Parasitos.....	53
5.3.3	Infecção e exame dos caramujos.....	54
5.3.4	Infecção dos camundongos.....	54
5.3.5	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito do EEE de <i>G. brasiliensis</i> e de suas frações obtidas por partição, F H, FAE e FA e das moléculas isoladas 7-epi) e Fuk sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	55
5.3.6	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade excretora e do dano causado no tegumento dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> pela 7-epi através de sondas fluorescentes.....	57
5.3.6.1	Fluorescência (Microscopia de Fluorescência).....	57
5.3.6.2	Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes.....	57
5.3.6.3	Perfusão – Obtenção dos parasitos para uso nas técnicas de fluorescência.....	59
5.3.6.4	Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>S.mansoni</i> exposto a 7-epi após marcação com a Resorufin.....	59
5.3.6.5	Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> exposto a 7-epi após marcação com a sonda Hoechst 33258.....	60
5.3.6.6	Microscopia de Fluorescência (preparo das lâminas para leitura).....	61
5.3.7	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da 7-epi sobre cercárias de <i>S. mansoni</i>	62
5.3.8	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito da 7-epi sobre esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>	62
5.3.9	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito 7-epi em associação com o PZQ sobre vermes adultos de <i>S.mansoni</i>	63
5.3.10	Teste de toxicidade aguda <i>in vivo</i> para avaliação da eficácia da 7-epi isoladamente e de sua associação com PZQ.....	63
5.3.11	Análises estatísticas.....	65
6	RESULTADOS	67
6.1	Rendimento dos extratos e frações.....	67
6.2	Teor de flavonoides.....	67
6.3	Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação do EEE de <i>G. brasileniss</i> e de suas frações obtidas por partição FH, FAE e FA.....	67

6.4	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito do EEE <i>G. brasiliensis</i> de suas frações obtidas por partição, FH, FAE, FA e das moléculas isoladas 7-ep e Fuk sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	70
6.4.1	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do EEE de <i>G. brasiliensis</i>	70
6.4.1.1	Cálculo do ED ₅₀ do EEE	71
6.4.2	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FH da partição do EEE de <i>G. brasiliensis</i>	73
6.4.2.1	Cálculo do ED ₅₀ da FH	74
6.4.3	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FAE da partição do EEE de <i>G. brasiliensis</i>	75
6.4.3.1	Cálculo do ED ₅₀ da FAE	76
6.4.4	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da FA da partição do EEE de <i>G. brasiliensis</i>	78
6.4.5	Comparação dos resultados <i>in vitro</i> do EEE e das frações, FH, FAE, FA, em comparação com o controle e com o PZQ sobre vermes adultos <i>S. mansoni</i>	79
6.5	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos compostos purificados sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	80
6.5.1	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da Fuk sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	80
6.5.2	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da 7-epi sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	81
6.5.2.1	Cálculo do ED ₅₀ da 7-epi	84
6.6	Efeito <i>in vitro</i> da 7-epi sobre a excreção da Resorufin em vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	86
6.7	Efeito <i>in vitro</i> da 7-epi sobre o tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> pela marcação da sonda Hoechst 3358	86
6.8	Efeito <i>in vitro</i> da 7-epi sobre cercárias de <i>S. mansoni</i>	87
6.9	Efeito <i>in vitro</i> da 7-epi sobre esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>	89
6.10	Efeitos <i>in vitro</i> da 7-epi em associação com o PZQ sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	90
6.11	Análise preliminares do Efeito <i>in vivo</i> da 7-epi isolada e em associação com o PZQ	92

7	DISCUSSÕES	94
8	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública em muitas partes do mundo, particularmente em muitos países em desenvolvimento, refletindo a situação econômica e social desses países. Neste contexto, as infecções por helmintos são consideradas prioridade na saúde pública em diversas partes do mundo (URBANI et al., 2003). Entre as helmintoses, a esquistossomose continua sendo a de principal significância médica em grande parte do planeta (HARDER et al., 2002) e uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo (ENGELS et al., 2002).

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. A partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o controle da esquistossomose passou a se concentrar na redução da doença através da quimioterapia com a oxamniquina e com praziquantel, envolvendo tratamento regular de todas as pessoas em grupos de risco. Contudo, o tratamento deve ser complementado com a educação sanitária, bem como o acesso à água potável e saneamento adequado (WHO 2012).

Apesar da oxamniquina e o praziquantel, serem os dois fármacos esquistossomicidas disponíveis para o tratamento da doença, o praziquantel tem sido praticamente o único fármaco utilizado no momento, e a utilização desse único fármaco em grande escala e em tratamentos recorrentes tem resultado no aparecimento de cepas resistentes (ARAÚJO et al.; 2008).

Desde as mais antigas civilizações o homem tem utilizado plantas para fins medicinais e alimentares. Todos os povos, em todos os continentes utilizam plantas com propriedades terapêuticas. É admirável que esse conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se (CARVALHO, 2004).

A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, onde se constata que aproximadamente 25,0 % dos medicamentos prescritos em todo mundo, originam-se de plantas, sendo 121 compostos ativos utilizados em uso comum. De 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11,0 % são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos semissintéticos obtidos de fonte natural (WHO, 2012). Ainda de acordo com a OMS,

aproximadamente 80,0 % da população mundial utiliza medicamentos tradicionais, básicos para a saúde, a maioria envolvendo uso de extrato de plantas ou compostos ativos isolados das mesmas (WHO, 2012). Vários produtos naturais isolados de plantas superiores, após vários estudos, tornaram-se agentes clínicos. Como exemplo pode-se citar os antimaláricos quinina e quinidina isolados da *Cinchona* spp, digoxina, um glicosídeo cardíaco, obtido da planta *Digitalis* spp, atropina da *Atropa belladonna*, morfina e codeína da *Papaver somniferum* além de muitas outras (PHILLIPSON, 2001).

A espécie *Garcinia brasiliensis* Mart. Também conhecida como *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, é encontrada 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).

Alguns pesquisadores já relataram a utilização dos frutos no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926; CORRÊA; PENNA, 1984). Compostos isolados do epicarpo desta planta já apresentaram atividade tripanocida contra *T. cruzi* (ALVES et al., 1999), entretanto, não existe relato na literatura de avaliações dos extratos do epicarpo desta planta e de suas frações obtidas por partição, ou de compostos isolados destes sobre *S. mansoni*.

Neste sentido, o presente estudo foi elaborado para avaliar, por meio de um ensaio bioguiado, o potencial esquistossomicida do extrato etanólico do epicarpo (EEE) de *G. brasiliensis*, suas frações obtidas por partição em hexano, acetato de etila e água e as moléculas isoladas fukugetina (fuk) e 7-epiclusionona (7-epi), nos contextos *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença social, encontrada principalmente em regiões pobres, rurais e da periferia das cidades com desenvolvimento socioeconômico precário, onde os habitantes têm contato frequente com águas contaminadas, como também rede de esgoto adequada não disponível.

Doença endêmica de importância mundial, a esquistossomose é a segunda parasitose de maior impacto em termos sócio - econômicos e de saúde pública, perdendo somente para a malária. Afeta amplas áreas geográficas, com aproximadamente 209 milhões de pessoas infectadas em 76 países por uma das diferentes espécies de *Schistosoma* e mais de 700 milhões vivendo sob o risco de infecção. É prevalente em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres, sem acesso a água potável e saneamento adequado (KING et al., 2005; WHO, 2012). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (VAN DER WERF et al., 2003). A doença é crônica e insidiosa, sendo pouco comum seu diagnóstico em estágios iniciais; sua evolução pode levar o desenvolvimento de formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (ENGELS et al., 2002).

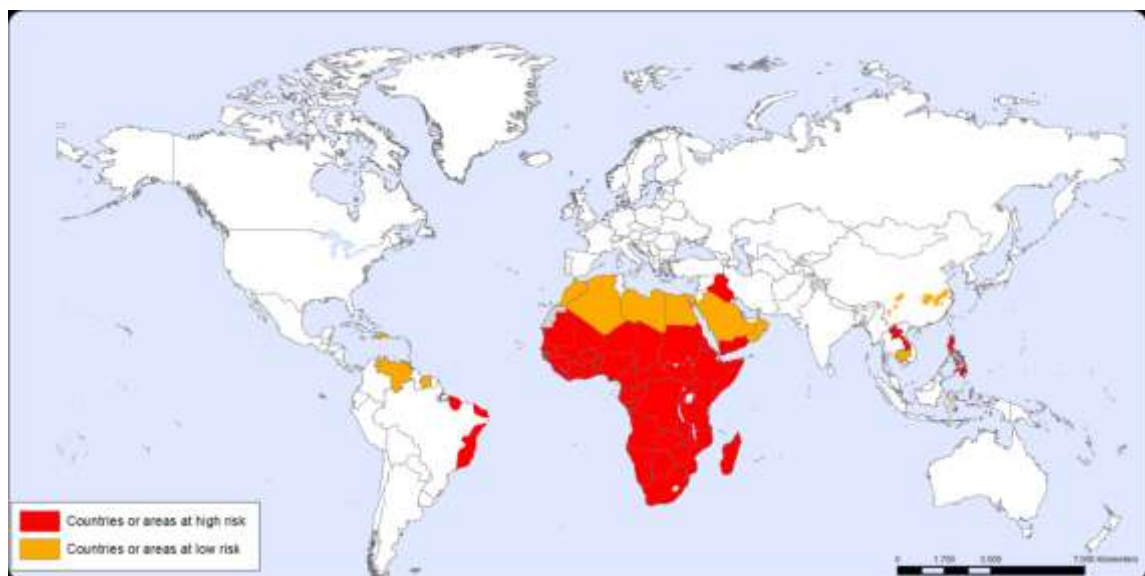


Figura 1: Mapa da distribuição da esquistossomose no mundo (WHO 2012)

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digênicos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. As principais espécies de *Schistosoma* que infectam o homem são (i) *S. mansoni*, transmitido por moluscos do gênero *Biomphalaria* e causador da esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na África, península Arábica, Caribe e América do Sul; (ii) *S. haematobium*, transmitido por moluscos do gênero *Bulinus* que causa a esquistossomose urinária na África e na península Arábica; (iii) *S. japonicum*, transmitido por moluscos do gênero *Oncomelania* que causa esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na China, Filipinas e Indonésia e (iv) *S. mekongi*, transmitido por moluscos do gênero *Neotricula* (GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados (ABATH et al., 2006). Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de alta prevalência, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média transmissão e focos isolados. Estima-se que 4 a 6 milhões de pessoas são infectadas por *S. mansoni* no Brasil e que os estados de Minas Gerais e da Bahia concentram 70,0 % dos casos com base em dois inquéritos nacionais de esquistossomose realizados no Brasil (COURA; AMARAL 2004).

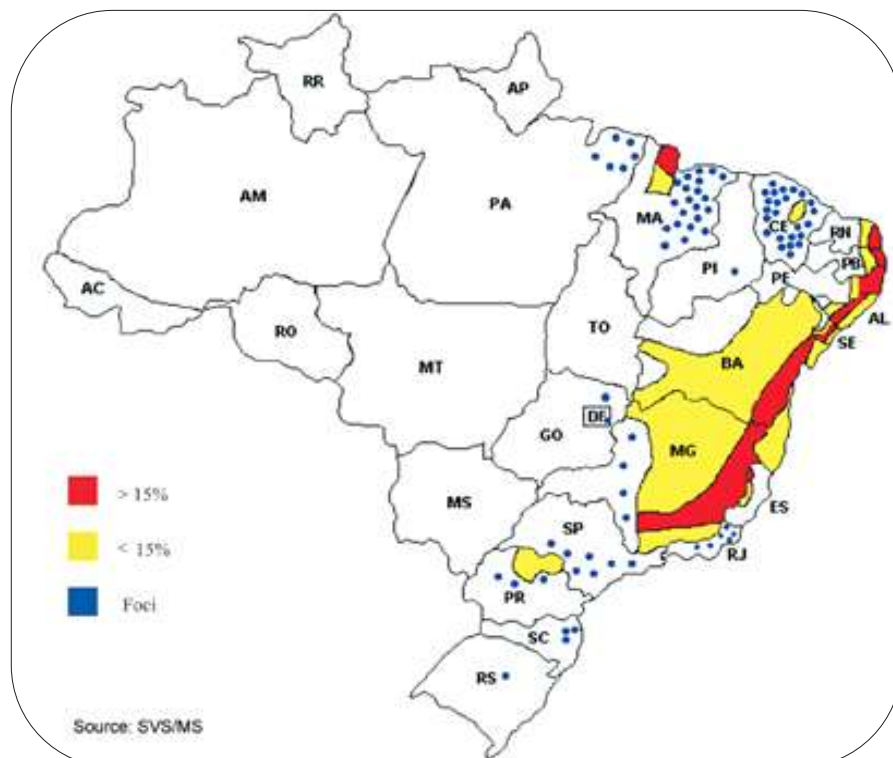


Figura 2: Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil (Drummond et al., 2006)

2.1.1 Ciclo de vida do parasito

O ciclo biológico (FIGURA 3) do *S. mansoni* é complexo, pois é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo do gênero *Biomphalaria*). Há, ainda, duas passagens de larvas de vida livre no meio aquático, que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de 45 dias. No molusco do gênero *biomphalaria*, o ciclo é assexuado, dura aproximadamente, 30 dias (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Os vermes adultos vivem nos vasos sanguíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado. O macho é de cor esbranquiçada e mede de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura. A fêmea é cilíndrica e mais fina e longa que o macho, mede de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura. Como não apresentam órgão copulador, a cópula ocorre pela justaposição do orifício genital feminino e masculino, quando a fêmea está alojada no canal ginecóforo (fenda longitudinal, no macho, para albergar a fêmea e fecundá-la) (KATZ; ALMEIDA, 2003).

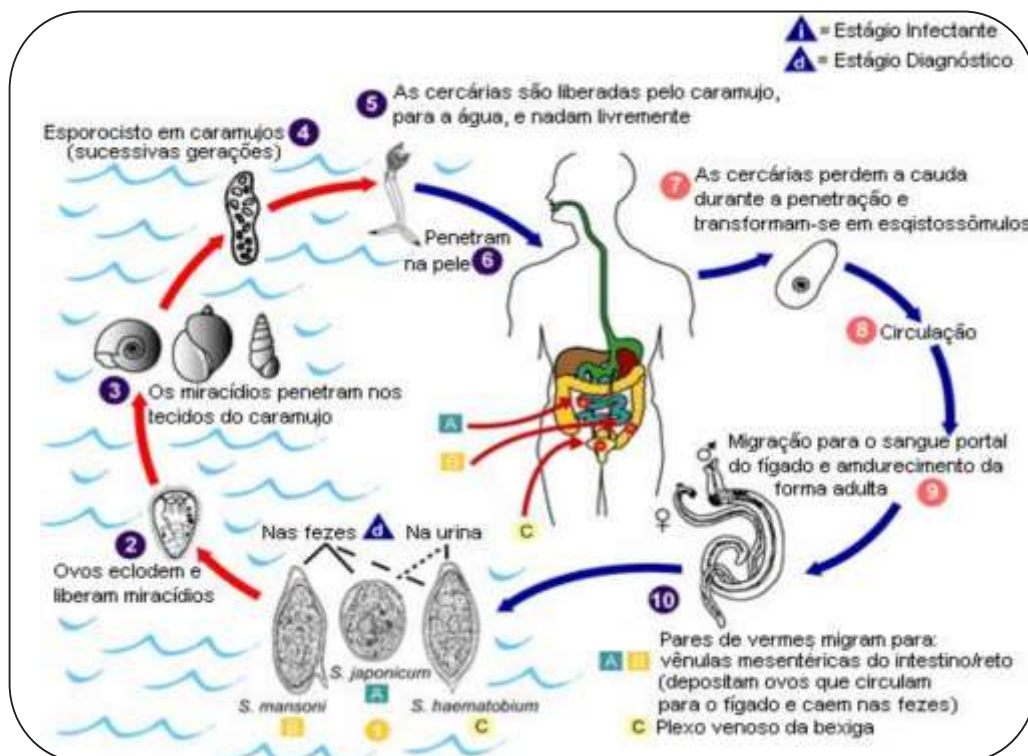
Uma fêmea coloca em média 300 ovos por dia, que necessitam de uma semana para o amadurecerem. A postura ocorre nas veias mesentéricas e no plexo hemorroidário superior do intestino do hospedeiro, quando parte desses ovos, passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes. Quando maduros, os ovos do *S. mansoni* medem em torno de 150 mm de comprimento por 65 mm de largura, tamanho considerado grande. Uma espícula lateral facilita a sua identificação. Onde não há rede de esgotos as fezes contendo ovos são lançadas indevidamente em rios e lagos, ao entrar em contato com a água, os miracídios eclodem dos ovos e são liberados (KATZ; ALMEIDA, 2003).

De formato oval e revestido por numerosos cílios, os miracídios mede em torno de 150 a 170 mm de comprimento e de 60 a 70 mm de largura, os miracídios têm a chance de nadar ao encontro do hospedeiro intermediário, o caramujo, dando continuidade ao ciclo evolutivo do parasito e, conseqüentemente, possibilitando a transmissão da parasitose ao homem (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Ao penetrar nas partes moles do molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas. As células remanescentes se reorganizam e, em 48 horas transformam-se em um saco alongado, denominado de esporocisto, repleto de células germinativas. Os esporocistos primários geram os secundários ou esporocistos filhos e as células germinativas, desse último, são transformadas em cercárias (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A cercária é uma outra fase de vida livre do parasito. Ela passa pela parede do esporocisto e migra para as partes moles externas do caramujo. É uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática e mede aproximadamente 500 µm. Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva. Nesse processo, que pode durar até 15 minutos, a cercária perde sua cauda. Depois de atravessar a pele, ela passa a ser chamada de esquistossômulo (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e penetram em seus vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Muitos deles são vencidos pelo sistema de defesa humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões e, posteriormente migram para o sistema porta hepático onde esses pequenos vermes se alimentam e tornam-se adultos. Os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (KATZ; ALMEIDA, 2003).



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

Figura 3: Ciclo evolutivo do *Shistosoma spp*

2.1.2 Imunopatologia e Diagnóstico

S. mansoni são trematódeos digenéticos que habitam as veias mesentéricas de humanos e outros mamíferos. Embora a maioria das pessoas infectadas com este parasito não apresente sintomas, uma pequena parte desenvolvem distúrbios graves, como as formas hepatoesplênica e cardiopulmonares crônicas da infecção, e menos frequentemente, a neuroesquistossomose (FERRARI et al., 2008).

A patogenia da esquistossomose depende de uma série de fatores: a linhagem do parasito, a idade, o estado nutricional e a imunidade do hospedeiro e, principalmente, a carga parasitária (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Esquistossomose é uma doença causada predominantemente pela resposta imune do hospedeiro contra os ovos desse parasito e pela reação granulomatosa provocada por esses ovos (GRYSEELS et al., 2006; WYNN et al., 2004). Os granulomas destroem os ovos e neutralizam antígenos patogênicos do ovo, mas também leva a fibrogênese nos tecidos do hospedeiro (WILSON et al., 2007). A intensidade e a duração da infecção podem determinar a quantidade de antígeno libertado dos ovos e a gravidade da doença fibro-obstrutiva crônica. A maioria da patologia desenvolve nos locais de máxima acumulação de ovos, que são intestino e fígado. No entanto, granulomas foram encontrados em muitos tecidos diferentes, incluindo a pele, pulmão, cérebro, glândulas supra-renais e musculatura esqueléticas (BURKE et al., 2009). A formação do granuloma é atribuída a uma resposta impulsionada por CD4 + TH2, semelhante a uma forma de hipersensibilidade do tipo retardada, que é altamente regulado por diferentes populações de células, como as citocinas e quimiocinas (WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007).

A fase inicial da esquistossomose é caracterizada por dermatite cercariana, provocada pela penetração das cercarias, devido a uma hipersensibilidade mediada por IgE. Essa dermatite é pouco frequente entre as populações endêmicas, mas é comum entre os visitantes e os migrantes, ela ocorre após infecções primárias. É caracterizada por erupções cutâneas pruriginosas, maculopapulares que se manifesta dentro de várias horas de exposição à água contaminada e pode persistir durante vários dias (BURKE et al., 2009).

A fase aguda é caracterizada por uma hipersensibilidade mediada por reações de imunocomplexos contra migração dos esquistossômulos e devido à deposição dos ovos. Esses sintomas se manifestam 14-84 dias após a exposição dos indivíduos com a infecção

esquistossomótica ou na sequência de reinfecção e são caracterizados por febre, fadiga, mialgia, mal-estar, dor de cabeça, tosse não produtiva, e eosinofilia com infiltrados irregulares visível na radiografia pulmonar. Sintomas abdominais podem também ocorrer e corresponder com a migração de vermes juvenis. A fase aguda é comum entre os indivíduos expostos pela primeira vez, mas é raro entre as populações endêmicas (BURKE et al., 2009).

A fase crônica apresenta dois estágios principais: forma intestinal ou hepato-intestinal e a mais grave que é a forma hepatoesplênica, representada pelo crescimento e endurecimento do fígado e do baço. Todavia, ovos e vermes adultos do parasito podem ser encontrados em qualquer órgão ou tecido do corpo humano como pulmões, cérebro, testículos, ovários, entre outros (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Esquistossomose intestinal crônica é caracterizada por dor intermitente e desconforto abdominal, perda de apetite e diarreia. Estes sintomas são causados por uma resposta granulomatosa aos ovos presentes na mucosa intestinal levando a hemorragia (BURKE et al., 2009). Esquistossomose hepatoesplênica começa com a deposição de ovos no tecido hepático que conduz ao desenvolvimento de granuloma e hepatomegalia. A inflamação granulomatosa leva ao excesso de deposição de colágeno e de outras componentes extracelular no fígado causando fibrose periportal progressiva e oclusão das veias porta. E por sua vez, a oclusão das veias porta leva ao desenvolvimento de hipertensão portal, esplenomegalia, ascite, varizes gastrointestinais e sangramento gastrointestinal que podem ser fatais (BURKE et al., 2009). A progressão da forma hepatoesplênica crônica leva 5-15 anos (GRYSEELS et al., 2006).

No decorrer de uma infecção, a resposta imune progride através de pelo menos três fases. Nas primeiras 3-5 semanas, durante o qual o hospedeiro é exposto a migração do parasita imaturo, a resposta dominante é T helper 1 (TH1). Como os parasitas amadurecem, acasalam e começam a produzir ovos na semana 5-6, a resposta altera acentuadamente, o componente TH1 diminui e isto está associado com o aparecimento de uma forte resposta TH2. Esta resposta é induzida principalmente por antígenos de ovo. Durante a fase crônica da infecção, a resposta TH2 é responsável pela formação de granulomas em torno dos ovos recentemente depositados (PEARCE; MACDONALD, 2002).

O diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica é feito principalmente através da constatação da presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes do paciente. O método mais utilizado é o exame parasitológico das fezes. A OMS recomenda o método Kato-Katz, por ser o exame parasitológico das fezes mais sensível, rápido e de fácil execução, além de ser o mais preciso qualitativa e quantitativamente (KATZ; ALMEIDA, 2003).

2.1.3 Controle

A esquistossomose é uma doença milenar, sendo seu ciclo evolutivo conhecido há mais de cem anos. Sua ampla distribuição geográfica e a facilidade de expansão no território brasileiro fazem com que a esquistossomose seja de grande relevância, no país, constituindo, assim, um grande desafio para a saúde pública.

A princípio, seu controle é limitado pela própria epidemiologia da doença, pois sua distribuição é endêmica e, frequentemente, muito peculiar a uma dada coleção hídrica e às relações que ela estabelece com as populações (SILVEIRA 1989).

O combate à esquistossomose até a década de 70 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 (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.

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 moluscicidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático.

De acordo com Coura e Amaral (2004), o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões tais como a disseminação dos hospedeiros intermediários; os altos custos para a implementação de condições sanitárias ideais e de suprimento de água tratada; além das dificuldades para proteção individual. Assim, verifica-se a continuidade de um intenso contato com águas naturais, propiciando a reinfeção. As dificuldades para a educação sanitária funcionar adequadamente e para atingir a adesão das comunidades de maneira efetiva aos programas de controle é outro problema complexo.

2.1.4 Tratamento

Desde 1918, diversas drogas foram indicadas para o tratamento clínico das esquistossomoses, mas muitas delas não são mais usadas, tais como: tártaro emético,

compostos antimoniais trivalentes, lucantone, niridazol e hicantone. Hoje, o tratamento pode ser feito com medicamentos disponíveis no mercado brasileiro: OXA ou PZQ.

Ambos são bem tolerados e de baixa toxicidade e a eficácia do tratamento gira em torno de 80,0 % dos casos, em adultos, e 70,0 % em crianças de até 15 anos. Atualmente, prefere-se o praziquantel por apresentar o menor custo, já que o medicamento vem sendo fabricado no Brasil por Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz (KATZ; ALMEIDA, 2003).

2.1.4.1 Oxamniquina (OXA)

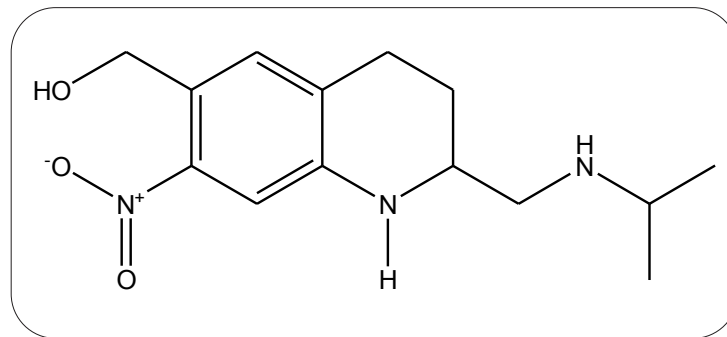


Figura 4: Estrutura química da oxamniquina.

A OXA (FIGURA 4) é uma tetraidroquinolina semi-sintética e tornou-se disponível para o tratamento da esquistossomose nos anos 70, sendo em passado recente muito utilizada no tratamento em massa, com aproximadamente 13 milhões de pessoas tratadas na América do Sul e África (FENWICK et al., 2003).

A OXA atua principalmente na espécie *S. mansoni*, sendo os vermes adultos machos mais susceptíveis à ação da droga que as fêmeas (CIOLI et al., 1995). Todos os estágios de infecção pelo *S. mansoni* podem ser tratados com OXA, embora os estágios invasivos (cercárias) e os vermes adultos sejam significativamente mais afetados pela droga que os estágios do fígado (esquistossômulos) e vermes jovens (FOSTER et al., 1971).

Apesar das suas propriedades anticolinérgicas, o principal mecanismo de ação da OXA está relacionado com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucléicos (PICA MATTOCCIA et al., 2004). A droga é ativada por esterificação através de enzimas do verme (sulfotransferases) e esta esterificação produz compostos eletrofílicos capazes de alquilar o DNA e outras macromoléculas do parasito (CIOLI et al., 1993).

Os efeitos adversos observados, nos pacientes, após a administração de OXA, são leves, de curta duração e, frequentemente, estão associados ao sistema nervoso central com 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).

Embora a OXA seja bem tolerada como mostrado por Prata et al (1975) e seja raro o aparecimento de reações adversas graves, alguns estudos demonstram sérios efeitos no sistema nervoso central, após sua administração (BINA et al., 1976; KRAJDEN et al., 1983; CARVALHO et al., 1985).

Atualmente, a OXA não está mais sendo comercializada 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.

2.1.4.2 Praziquantel (PZQ)

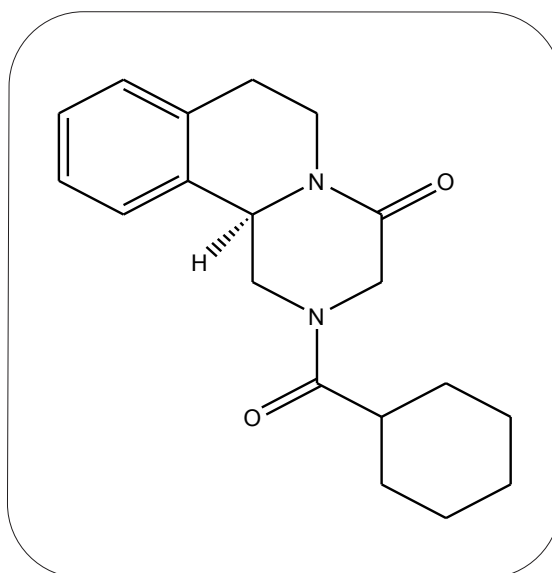


Figura 5: Estrutura química do praziquantel.

O PZQ (FIGURA 5) é um derivado sintético da pirazina isoquinolina, 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).

A dose recomendada para o tratamento da esquistossomose mansônica e hematóbica é de 40-60mg/Kg, 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; PICA-MATTOCCIA, 2003). É efetivo em pacientes de todas as idades e em diferentes formas clínicas da doença, inclusive na forma hepatoesplênica descompensada e atua mais eficientemente contra os vermes fêmeas (BASSILY et al., 1985).

Apesar de existirem muitas perguntas a serem elucidadas, inúmeros trabalhos estão sendo realizados na tentativa de esclarecer o modo de ação do PZQ, (DAY et al., 1992; REDMAN et al., 1996; CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2004). 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; 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.

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 a retirada do medicamento.

2.1.5 Resistência a drogas esquistossomicidas

Apesar da OXA e do PZQ, serem as duas drogas esquistossomicidas disponíveis para o tratamento da doença, sendo eficientes e apresentando poucos efeitos colaterais, alguns aspectos relevantes devem ser considerados. A OXA apresenta um processo de fabricação complicado, requerendo grandes tanques de fermentação para a síntese biológica, resultando em um custo elevado, quando comparado com o PZQ. Devido a esta dificuldade, o PZQ tem sido o único fármaco utilizado no momento, e à utilização de uma única droga em uma grande

escala e em tratamentos recorrentes pode resultar no aparecimento de cepas resistentes (ARAÚJO et al., 2008).

Segundo Kinotti (1997) o *S. mansoni* possui grande capacidade de desenvolver resistência às doses terapêuticas de OXA empregadas no tratamento da esquistossomose.

Segundo Cioli et al (1992), a resistência à OXA é controlada por um único gene autossômico recessivo. Essa resistência é caracterizada pela perda da enzima ativadora da droga (sulfotransferase) a qual está presente em vermes sensíveis e ausente nos vermes resistentes.

Possivelmente, uma inibição irreversível na síntese de RNA e DNA ocorra nos parasitos susceptíveis enquanto, nos resistentes esse fenômeno mostra-se reversível (CIOLI et al., 1993).

Katz et al (1991) e Gomes et al (1993) observaram a ineficácia do tratamento, com PZQ, em indivíduos acometidos pela esquistossomose. Entretanto, o primeiro relato de resistência a essa droga foi descrita por Fallon e Doenhoff (1994), em laboratório. A partir disso, alguns estudos têm sugerido a existência de resistência ao PZQ (FALLON et al., 1995; STELMA et al., 1995; ARAUJO et al., 1996; ISMAIL et al., 1996; ISMAIL et al., 1999, BONESSO-SABADINI et al., 2002). Sugere-se também, que baixos índices de cura, em algumas regiões, possam ser atribuídos à alta carga de vermes, altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença, em grandes proporções, de vermes imaturos, responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (DOENHOFF et al., 2002).

Segundo Cioli et al (2004), os valores da ED₅₀, (dose efetiva para matar 50,0 % dos vermes) em cepas menos susceptíveis ao PZQ, foram, significativamente, diferentes e três vezes maiores do que as doses utilizadas em cepas sensíveis. William e Botros (2004) também relataram uma maior ED₅₀ para isolados menos susceptíveis ao PZQ. Além disso, observaram uma correlação negativa entre o influxo de cálcio, a contração muscular e a ED₅₀. Alterações na expressão da enzima citocromo-c oxidase em cepas de *S. mansoni* resistentes e susceptíveis ao PZQ já foi observada (PEREIRA et al., 1988). Porém, a relação entre a redução da atividade da enzima e o fenótipo da resistência não foi esclarecido.

Uma diminuição na magnitude do dano causado no tegumento dos vermes resistentes quando comparado aos sensíveis foi também observada (WILLIAM et al., 2001). Apesar desses estudos, investigações sobre os mecanismos de resistência ao praziquantel são dificultadas devido à ausência de uma clara compreensão do modo de ação desta droga, no *Schistosoma* (REDMAN et al., 1996).

Resistência ou menor susceptibilidade do parasita aos medicamentos esquistossomóticos é um fato. No entanto, no presente, resistência a drogas não parece ter importância para a saúde pública, mas será necessário para o futuro (KATZ et al., 2008).

2.1.6 Associação de diferentes compostos com praziquantel

A associação de diferentes tipos de fármacos em baixas dosagens pode ser uma alternativa para trazer melhoras na terapêutica de várias doenças infecciosas. Quando fármacos são associados, para um mesmo fim, suas dosagens tendem a ser reduzidas. Este fato é de grande relevância, uma vez que a diminuição nas dosagens pode levar a uma diminuição dos efeitos colaterais e tóxicos. A associação pode ser um recurso para retardar e/ou evitar o aparecimento do fenômeno de resistência (ARAÚJO et al., 2008).

Muitos estudos (SHAW; BRAMMERR 1983; PUGH; TEESDALE 1983; CREASEY et al., 1986; CAMPOS et al., 1987; ZWINGENBERGER et al., 1987; BOTROS et al., 1989; CAMPOS et al., 1989; FARID et al., 1990; DELGADO et al., 1992; GRYSHECK et al., 2004; ARAÚJO et al., 2008; PORTELA et al., 2012) foram realizados para avaliar a eficácia da associação OXA e PZQ no tratamento da esquistossomose. No estudo sobre a associação do PZQ com a OXA realizado por Gryscheck et al (2004) observou-se que havia pouca toxicidade, porém eficácia inferior àquela observada com o uso de cada droga isoladamente, em esquema de dose única.

A atividade da lovastatina associada com OXA e com PZQ contra a esquistossomose mansônica foi avaliada por Araújo et al (2008). Nos ensaios *in vivo*, a associação de lovastatina com OXA ou com o PZQ não mostrou qualquer ação aditiva, mas houve mudanças no oograma quando a lovastatina foi associado com a oxamniquine.

Mahmoud e Botros (2005) constatou-se que o tratamento combinado de PZQ e artemether em camundongos infectados com a cepa de *S. mansoni* egípcio aumentou a erradicação dos vermes, mas a ausência de ovos do parasita não foi completa.

A atividade esquistossomicida do clonazepam em associação com OXA e PZQ foi avaliada experimentalmente em camundongos infectados com *S. mansoni*. O resultado da associação desta droga com OXA ou PZQ não foi significativamente diferente da obtida quando estes dois últimos medicamentos foram administrados isoladamente. No entanto, não

foram observados efeitos aditivos ou sinérgicos quando clonazepam foi utilizado em associação com oxamniquine ou praziquantel (ARAÚJO et al.; 2008).

Portela et al (2012) investigaram a redução da carga parasitária em camundongos infectados com *S. mansoni* após 21 dias, quando tratados por via oral com uma associação de PZQ e trioxaquine PA1647, a redução da carga em relação ao grupo controle foi de 73,0 %. Para efeitos de comparação, quando PZQ ou PA1647 foram usados como monoterapia a redução foi de 24,0 % ou de 18,0 %, respectivamente. Um efeito aditivo entre PZQ (redução na carga de vermes de 24,0 %), e PA1647 (redução da carga de verme 18,0%) teria fornecido na melhor das hipóteses uma redução de $(24 + 18) / 2 = 21,0\%$ na carga de verme com a combinação PZQ 25 mg/kg + PA1647 25 mg/kg. Contudo, essa combinação resultou numa redução significativamente maior de 73,0%. Assim, os resultados são consistentes com um efeito aditivo ou sinérgico contra vermes imaturos.

2.2 Plantas medicinais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se 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 et al., 2006).

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 médico-científicas, 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 quantitativas (DIAS, 2005).

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 250.000 espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17,0 % das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial farmacológico (LEWIS; HANSON, 1991).

2.2.1 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 as diretrizes impostas pela política nacional de plantas medicinais e de fitoterápicos; 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 as Universidades Brasileiras é o centro de pesquisas e eventualmente do desenvolvimento de medicamentos de plantas medicinais (FERREIRA, 1998).

2.2.2 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 por drogas alternativas. Muitas plantas medicinais tem sido estudadas para investigar seu potencial esquistossomicida (MOSTAFA et al., 2011).

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*.

Ensaio 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). ARAUJO et al., (1991) verificaram a redução dos vermes em hamsters infectados com *S. mansoni*, após o tratamento com artemete, um derivado da *A. annua*.

Barth et al (1997) verificaram em testes *in vitro* a redução da motilidade dos vermes de *S. mansoni*, inibição da postura de ovos e alta mortalidade dos parasitas quando utilizaram goyazensolide, 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 miracídeos de *S. mansoni* (LYDDIARD et al., 2002).

A atividade esquistossomicida do extrato aquoso bruto de gengibre contra *S. mansoni*, foi investigado por Mostafa et al (2011) o qual observou 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 foram observadas, além de numerosas bolhas em torno de tubérculos. Os dados histopatológicos indicaram uma redução no número e tamanho de infiltração inflamatória granulomatosa no fígado e intestino em comparação com ratos não tratados.

Levantamento realizado na África do Sul mostrou três plantas como potenciais agentes esquistossomicidas para o *S. haematobium*. São elas: *Berheya 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 *Mus musculus* infectados. 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 eficácia do mesocarpo dos frutos *Balanites aegyptiaca* foi comparado com PZQ 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 esquistossomicida 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 fêmeas. Dados revelaram que a *N. sativa* induziu o estresse oxidativo contra vermes adultos, o que foi 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-fosfatase (MOHAMED et al., 2005).

A *Eremanthus erythropappus*, é uma planta popularmente conhecida como Candeia (Asteraceae), com alta prevalência em Minas Gerais. O óleo essencial extraído da madeira de *E. erythropappus* tem o potencial de inibir a penetração ativa da cercária na pele e assim foi considerado o seu potencial esquistossomicida. Este efeito foi relacionado à presença de lactonas sesquiterpenos não insaturadas. No experimento foram escolhidos também o extrato etanólico, diclorometano e hexânico de folha de Candeia para avaliar o seu potencial

esquistossomicida em modelo experimental *in vitro*. Os danos causados pelos extratos sobre o verme adulto foram irreversíveis, confirmando a atividade *in vitro* dos extratos de Candeia em verme adulto de *S. mansoni*, causando a paralisia total dos machos e das fêmeas (FARANI et al., 2010).

Jatsa et al (2010) avaliou *in vitro* a atividade esquistossomicida do extrato aquoso de *Sida pilosa*, uma planta encontrada em Camarões e conhecida popularmente como “Obolsi”, “Otonde” ou “Ivangnoe”. Os índices de infectividade mostraram que o tratamento oral com extrato de *S. pilosa* resultou em redução significativa da carga parasitária e deposição de ovos.

O *Harpagophytum procumbens*, vulgarmente conhecido como Garra do Diabo é uma planta medicinal originária da África, especificamente, do deserto do Kalahari, usada pelos índios, na forma de infusão para o tratamento de doenças reumáticas, diabetes, aterosclerose e malária. As propriedades farmacológicas dos glicosídeos iridóides 0,5 a 3,0 % estão relacionados aos efeitos antiinflamatório e analgésico e além de estimular a liberação de interleucinas e migração de leucócitos na inflamação (RODOLPHO et al., 2010). Esses autores avaliaram o efeito inibitório do extrato bruto de *H. procumbens* na eliminação de ovos durante a infecção pelo *S. mansoni*. Após o tratamento houve uma redução significativa de ovos no grupo tratado com 15 mg/kg de extrato bruto. Neste sentido o tratamento com *H. procumbens* nessa dose pode contribuir para a redução de ovos durante a infecção com *S. mansoni*, podendo ser uma possível alternativa para o tratamento da esquistossomose.

O extrato metanol: diclorometano (2:1) de *Piper tuberculatum* também conhecida como pimenta d'arda, foi testado *in vitro* e atuou de forma eficiente sobre os exemplares de *S. mansoni* que morreram em até 72 horas, mesmo quando expostos a concentrações baixas. Os machos se mostraram mais sensíveis, enquanto que nos testes *in vivo*, este extrato não mostrou diferença significativa nos exames de Kato-Katz realizados antes e depois do tratamento, no oograma foi observado diminuição do número de ovos de primeiro e segundo estágios, indicando diminuição na oviposição. Contudo não houve diferença significativa no número de granulomas hepáticos e não alterou o número de vermes presentes na veia porta e nas veias mesentéricas (SIMÕES, 2009).

A piplartina é uma amida encontrada em várias espécies de *Piper* (Piperaceae). Esta amida mostrou diversas atividades biológicas, tais como antifúngica e inseticida, bem como efeito tripanocida e leishmanicida. O efeito da piplartina isoladas de *Piper tuberculatum* contra esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada, e os resultados

revelaram que piplartina é um composto eficaz contra larvas e vermes adultos de *S. mansoni* *in vitro* (MORAES et al., 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 ao uso esquistossomicida, enquanto nove combinações de plantas eram usadas contra a forma da doença urinária. *Cissus quadrangularis* e *Stylosanthes erecta* foram às plantas mais utilizadas e que foram relatados pela primeira vez, para ser usado contra a esquistossomose no Mali (BAH et al., 2006).

Clerodendrum umbellatum (*Verbenaceae*) é tradicionalmente usado em países como o Camarões para o tratamento de muitas doenças, incluindo helmintíases intestinais (JATSA et al., 2009). Esses autores avaliaram a atividade esquistossomicida *in vivo* do extrato aquoso de suas folhas em um modelo de *S. mansoni* em ratos. O extrato aquoso das folhas de *C. umbellatum* apresentou propriedades esquistossomicida em doses de pelo menos 80 mg/kg de peso corporal.

2.2.3 Família Guttiferae

A família de Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. Esta família possui 47 gêneros (por exemplo: *Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*) e mais de 1000 espécies que se agrupam em seis subfamílias que estão distribuídas amplamente por todo o Brasil (DEROGIS et al., 2008).

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 et al., 2001) e

benzofenonas (OLIVEIRA et al., 2005). Em função dessa gama de constituintes, as espécies desta família têm sido relatadas 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).

2.2.4 Gênero *Garcinia*

Vários estudos químicos vêm demonstrando que o gênero *Garcinia* é uma fonte importante com uma grande diversidade de metabólitos biologicamente ativos, incluindo benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas, que têm ações comprovadas contra várias doenças (DEROGIS et al., 2008).

Extratos de *G. pedunculata* demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica (JAYAPRAKASHA et al., 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 *Garcinia 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 *Garcinia 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 gambóxico, 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).

2.2.5 A espécie *Garcinia brasiliensis*

A espécie *G. brasiliensis* (Mart.), ou *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, é nativa da região Amazônica e é cultivada em todo o território brasileiro. É 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 (PEREIRA et al., 2010).

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 (FIGURA 6) são comestíveis (POTT et al., 2007), 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 et al., 2002). Cerca de 8,0 a 9,0 % 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 à nicotina (MORTON, 1987).

Habitantes dos países Tailândia, Sirilanka, Malásia, Filipinas e Índia, usam o pericarpo ou o fruto maduro como opção em medicina tradicional para o tratamento de dor abdominal, diarreia, disenteria, feridas, supuração e ulcera crônica (CUI et al., 2010).



Figura 6: Fruto/semente de bacupari (Fonte: Laboratório de fitoquímica e química medicinal).

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 epicarpo desta planta já apresentaram atividade tripanocida contra *T. cruzi* (ALVES et al., 1999), entretanto, não existe relato na literatura de avaliações dos extratos do epicarpo desta planta e de suas frações obtidas por partição, ou de compostos isolados destes sobre esquistossomose.

2.2.6 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, 1984).

As benzofenonas poliisopreniladas caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona (FIGURA 7) 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 8) (MARTINS, 2008).

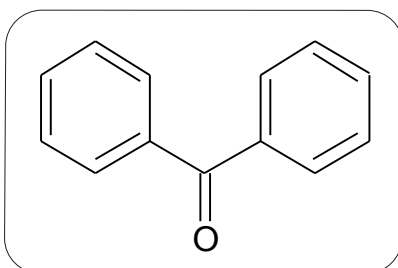


Figura 7: Anel difenilmetanona.

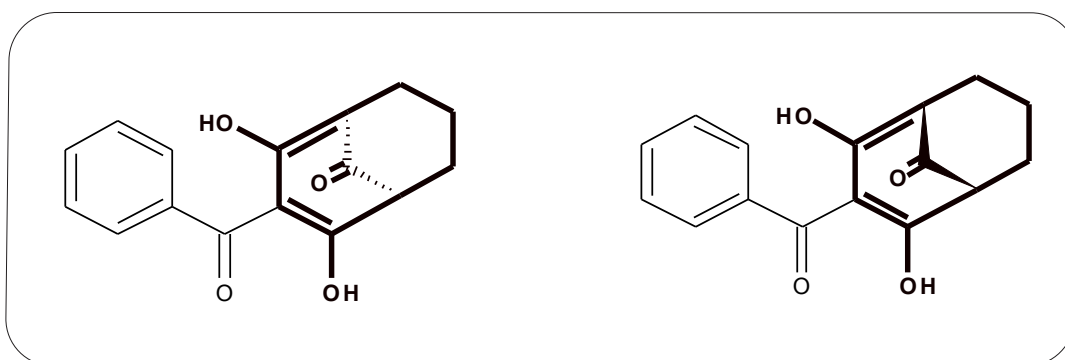


Figura 8: Em negrito, o anel biciclo [3.3.1] noneno como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.

Pela presença desse anel biciclo (FIGURA 8) 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-epiclusianona, e as hiperibonas H, I e L (FIGURA 9) (CIOCHINA et al., 2006).

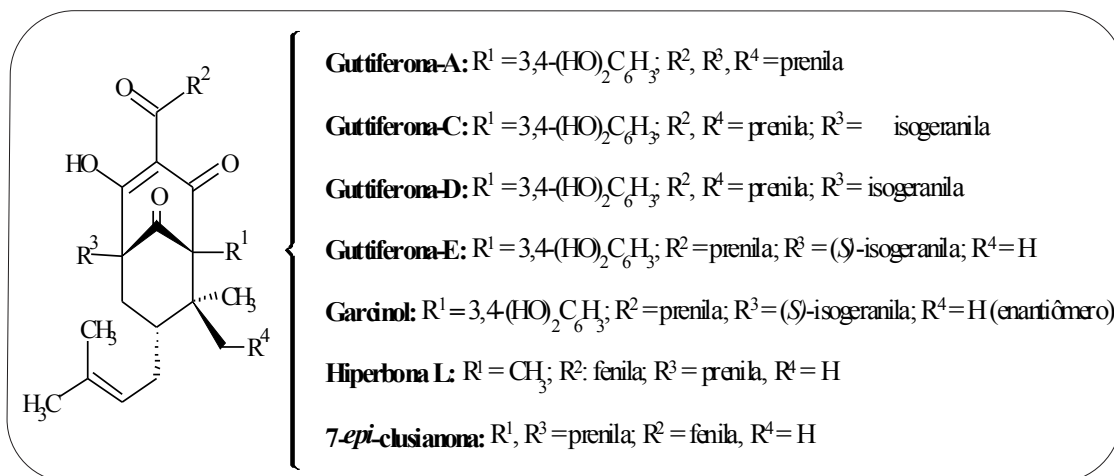


Figura 9: Exemplos de acilfloroglucinois poliprenilados.

Fonte: Ciochina e Grossman (2006, p. 3971).

O presente estudo foi elaborado para avaliar, por meio de um ensaio bioguiado, o potencial esquistossomicida do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*, e suas frações obtidas por partição em hexano, acetato de etila e água. Com exceção da fração aquosa, todos apresentaram atividade, contra verme adulto de *S. mansoni*, no contexto *in vitro*. Com base nestas descobertas, as frações hexânicas (FH) e acetato-etílica (FAE), obtidas da partição do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foram cromatografadas, obtendo varias frações, que resultaram em dois purificados, a benzofenona: 7-epiclusianona (7-epi) (FIGURA 10), e o biflavonóide fukugetina (FIGURA 11), também chamado morelloflavona.

2.2.7 A 7-epiclusianona

É uma benzofenona tetraisoprenilada (FIGURA 10) isolada pela primeira vez dos frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999). Cruz et al (2006) demonstraram que a 7-epi em baixas concentrações apresenta um efeito vasodilatador e em concentrações mais elevadas tem um efeito vasoconstritor. Segundo Santa-Cecília (2011, 2012) a 7-epi tem

notáveis atividades anti-inflamatória e analgésica. Foi também capaz de regular a liberação do ânion superóxido da inflamação, através de um mecanismo controlado por fosforilação da proteína tirosina e por uma estimulação direta da proteína quinase C.

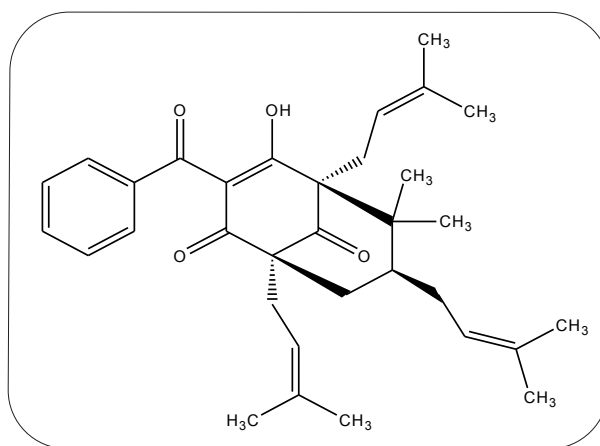


Figura 10: estrutura química da benzofenona 7-Epiclusianona

Dados mostram que a 7-epi, perturba o metabolismo do açúcar extracelular e intracelular de *S. mutans*, sendo um composto natural responsável por prevenir doenças relacionadas com o biofilme oral, podendo ser um potente agente farmacológico para a prevenção e controle da cárie dentária (MURATA et al., 2010). A atividade antimicrobiana da benzofenona prenilada 7-epi foi avaliada em relação a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e as culturas de *Bacillus cereus*. A relação direta entre o caráter lipofílico da estrutura e da atividade em bactérias gram-positivas foi observada (NALDONI et al., 2009).

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

A 7-epi é um agente natural promissor que apresenta múltiplos efeitos inibitórios na proliferação de células cancerosas *in vitro* (MURATA et al., 2010). Segundo Murata et al (2010) a toxicidade de 7-epi foi investigada através de avaliação histológica dos diversos órgãos obtidos de ratos. Exames externos em ratos revelaram que o estado nutricional e o desenvolvimento foram normais, sem nenhum sinal de doença, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os grupos, a pele e orifícios naturais não apresentaram alterações morfológicas. Macroscopicamente e microscopicamente, observação do coração, pulmão, pâncreas, baço, fígado, estômago, rins, intestino, ovário, cérebro, olhos, língua,

tecido palatal, e glândulas submandibular não demonstrou haver diferença entre os grupos experimentais, e não havia sinais detectáveis de patologias.

Resultados revelam que a 7-epi, produz resposta ativa contra anafiláticos sendo considerada como modelo molecular na descoberta de medicamentos para as síndromes alérgicas (NEVES et al., 2007). A administração oral de 7-epi reduz episódios de obstrução brônquica, podendo ser eficaz no tratamento da asma (COELHO et al., 2008).

2.2.8 A fukugetina

A fuk (FIGURA 11) é um biflavonóide que foi obtido inicialmente de plantas da espécie *Garcinia spp.* Estruturalmente, biflavonóides são moléculas polifenólicas compostas por dois flavonóides idênticos ou não, unidos de forma simétrica ou assimétrica por um ligante alquila ou alcóxi. As possíveis variações dependem das permutações na posição e natureza dos ligantes inter-flavonóides, o que lhes confere uma significativa diversidade estrutural.

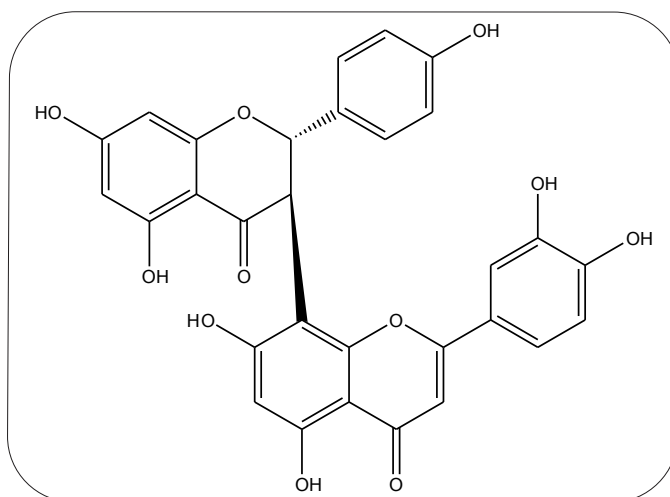


Figura 11: estrutura química do biflavonóide fukugetina.

A fuk apresenta atividade anti-inflamatória, por inibir fosfolipase A2 e ciclooxygenase-2 (LIM et al., 2006; CHEN et al., 2006). Esta molécula apresentou também atividade inibitória sobre transcriptase reversa do vírus HIV-1 (LIN et al., 1997), é também um inibidor potencial da angiogênese tumoral (PANG et al., 2009). Segundo Pereira et al (2010) a fuk isolada do epicarpo de *G. brasilienses* é um potente inibidor da protease de *L. (L.) amazonensis*.

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose mansônica, também conhecida como esquistossomíase, barriga d'água, bilharziose, xistose, e doença do caramujo, é uma doença considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e atinge aproximadamente 200 milhões de pessoas no mundo todo, sendo 6 milhões destas no Brasil (WHO, 2012).

É uma parasitose que pode se apresentar inicialmente assintomática, assim como causar sintomas graves na fase crônica. No ciclo biológico do *S. mansoni* a compreensão do habitat e da postura de ovos contribui para a explicação da sintomatologia da doença, pois o parasito atinge o sistema portal mesentérico. A partir daí, o parasito contribui para o desenvolvimento da característica mais marcante da doença, a ascite (barriga d'água).

Considerando o complexo ciclo biológico do parasito e a existência de cepas de *Schistosoma* resistentes ao PZQ, que é o único medicamento para o tratamento da esquistossomose; e o fato de que a doença tem recebido pouco investimento em pesquisas sobre novas drogas; faz-se necessário a descoberta de fármacos mais eficazes, como alternativa de tratamento, analisando as drogas já existentes, para que, a partir do seu mecanismo de ação, sejam formulados novos fármacos com maior potencial esquistossomicida.

O estudo químico de plantas, sobretudo daquelas pertencentes à flora brasileira, constitui-se numa estratégia economicamente importante para o futuro da indústria de corantes, medicamentos e defensivos agrícolas, além de servir como direcionador do desenvolvimento sustentado do país. Desta maneira, é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica. Apesar do uso terapêutico das plantas serem tão antigo, o conhecimento de suas propriedades é relativamente recente. É observado um enorme crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, de frações purificadas ou de componentes isolados.

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). Recentemente a espécie *Garcinia* tem recebido atenção considerável a partir de um ponto de vista farmacológico.

Este trabalho teve como proposta avaliar o potencial do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*, das frações obtidas por partição (fração hexânica, acetato etila e aquosa) e também as moléculas isoladas fuk e 7-epi isolada e em associação com o PZQ, quanto aos seus potenciais efeitos esquistossomicida nos contextos *in vitro* e *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Busca de novos compostos orgânicos naturais a partir do epicarpo da *G. brasiliensis* com potencial esquistossomicida

4.2 Objetivos específicos:

Avaliar:

- ✓ A eficácia do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*, das frações obtidas por partição (fração hexânica, acetato etila e aquosa) e também as moléculas isoladas fuk e 7-epi sobre verme adulto de *S. mansoni*, *in vitro*.
- ✓ Os danos causados sobre o sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* por meio do uso da sonda Resorufin *in vitro*.
- ✓ Os danos provocados pela 7-epi *in vitro* sobre o tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*, através do uso da sonda Hoechst 33258.
- ✓ A atividade da 7-epi *in vitro* sobre cercaria e esquistossômulo de *S. mansoni*.
- ✓ A atividade esquistossomicida *in vitro* da associação da 7-epi com o PZQ
- ✓ A atividade esquistossomicida *in vivo* da 7-epi isoladamente e em associação com o PZQ.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Coleta do material vegetal

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14'' sul e longitude 42° 52' 55'' 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

Os epicarpós de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C durante 8 dias com monitoramento de perda de água. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas, fornecendo 500g e submetido à extração por remaceração em etanol puro (CALIXTO; YUNES, 2001, Farmacopéia Brasileira, 1988). A seguir os extratos foram concentrados à pressão reduzida.

Uma porção do extrato etanólico do epicarpo (1,0 g) foi submetido à partição líquido/líquido do seguinte modo: a amostra foi dissolvida em etanol:água (1:4) (50,0 mL) e após adição do hexano (50,0 mL) a mistura foi vigorosamente agitada. A fase 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 (SCOPARO et al., 2012).

Do mesmo modo, a fase orgânica foi removida para produzir a fração acetato-etílica (este procedimento foi realizado cinco vezes). As frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e aquosa (FA) do extrato do epicarpo, foram concentradas à pressão reduzida utilizando evaporador rotativo e, em seguida secou-se sob liofilizador e foram armazenadas no congelador.

Para isolar os compostos bioativos, as frações FH e FAE obtidas da partição do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foram cromatografadas em colunas de sílica gel (CC) de sílica-gel (230-400 mesh) (8 × 100 cm) e eluída com misturas de polaridade crescente de 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 (TLC). Quando necessário, foram recromatografadas e, ou recristalizadas em metanol para obtenção dos compostos puros. Da FH foi isolada a substância 7-epi e da FAE foi isolada a 7-epi e a fuk, anteriormente isoladas no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG, cujos padrões foram usados para sua identificação além dos dados espectrais (SANTA CECÍLIA et al., 2011; GONTIJO et al., 2012). Sua pureza foi avaliada pela análise cromatográfica. O procedimento adotado na elaboração do extrato, das frações e das substâncias isoladas está esquematizado na Figura 12.



Figura 12: Esquema da extração e purificação dos constituintes a partir do epicarpo de *G. brasiliensis*.

5.2.2 Análises Cromatográficas

Os cromatogramas do extrato, das frações e das substâncias 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.

5.2.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação foi obtido segundo a técnica de Swartz & Krull, 1998 onde o limite de quantificação indica a concentração mínima da substância de interesse presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis por um procedimento experimental.

Os limites de detecção e quantificação para 7-epi foram 0,87 e 2,65 µg/mL respectivamente, e os limites de detecção e quantificação para fuk foram de 1,47 e 4,46 µg/mL (TABELA 1).

Tabela 1 – Cálculo dos limites de detecção e quantificação.

PARÂMETRO	DADOS ESTATÍSTICOS	
	7- epi	Fuk
Faixa de concentração* (mg/mL)	10,0 – 300,0	10,0 – 300,0
Coefficiente de correlação, r	0,9989	0,9996
Limite de detecção (mg/mL)	0,87	1,47
Limite de quantificação (mg/mL)	2,68	4,46

* cinco pontos, três injeções para cada nível de concentração.

5.2.4 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

Teor de flavonóides totais foi determinada segundo Kalia et al (2008). Num tubo de ensaio de 10,0 mL, 0,5 mL de 20,0 % (m/v) de extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*, 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de 10,0 % (m/v) de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ e 0,1 mL de acetato de potássio 1M foram combinados e misturados, e o volume foi completado até 5,0 mL com H_2O . Após 30 min, a mistura foi medida a 425 nm. A curva padrão para flavonóides total foi feita usando uma solução padrão de quercetina (10,0-80,0 $\mu g/mL$), utilizando o mesmo procedimento acima. Os flavonóides totais foram determinados como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/ g de extrato), e os valores são apresentados como médias de análises em triplicatas.

5.3 Ensaio esquistossomicida

5.3.1 Parasito

A cepa LE (Luiz Evangelista) de *S. mansoni* é rotineiramente mantida por passagens em série em modelos *Biomphalaria glabrata* e camundongos da linhagem 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).

5.3.2 Caramujos

Os caramujos do gênero *B. glabrata* foram mantidos em laboratório dentro de um aquário com água corrente e boa oxigenação, apresentando pH entre 7,2 a 7,8 e isenta de cloro, cobre ou zinco, que dificultam a sobrevivência dos mesmos. A linhagem da espécie citada foi susceptível às cepas de *S. mansoni*, mantidas em laboratório. As larvas do parasito foram obtidas a partir do fígado dos camundongos infectados (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

5.3.3 Infecção e exame dos caramujos

A infecção desses moluscos, como rotina, foi feita com 10 miracídios por caramujo, deixando-os juntos por algumas horas. Os caramujos foram transferidos para uma estufa ou sala para serem mantidos a 28°C. Após 30 dias, os caramujos foram colocados individualmente em beakers de vidros com água e expondo-os à luz (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

5.3.4 Infecção dos camundongos

Camundongos da linhagem swiss, fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade pesando em média 20g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos experimentos, para avaliação da atividade das drogas. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água, em todo experimento.

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

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único becker, originando um “pool” de cercárias LE provenientes de caramujos. De cada becker foi retirado uma alíquota de aproximadamente 0,3mL para serem contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas foram ajustadas a fim de se obter uma concentração equivalente a 100 ± 10 cercárias, em um volume de 0,3 mL.

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 usadas cercárias provenientes de 30 ou mais caramujos infectados.

5.3.5 Avaliação *in vitro* do efeito do EEE de *G. brasiliensis* e de suas frações obtidas por partição, FH, FAE e FA e das moléculas isoladas fuk e 7-epi sobre vermes adultos de *S. mansoni*

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, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965): posteriormente à exposição das vísceras abdominais e do coração, a veia porta foi seccionada, na altura dos rins, com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa. Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração foi injetado meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,2%), obtendo-se assim, os parasitos.

Os mesmos foram lavados cuidadosamente com RPMI-1640. Os vermes recuperados foram levados para capela de fluxo laminar para serem lavados mais uma vez com o meio de cultura RPMI-1640 estéril e, em seguida foram cultivados em placas de cultura de 6 poços (4 casais por poço) em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5,0 % soro fetal bovino inativado pelo calor e 1,0 % de penicilina (10000UI/mL) estreptomicina / (10mg/mL) (Sigma, EUA).

Após um período de 30 min de adaptação, as amostras (extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* e suas frações obtidas por partição: fração hexânica, fração acetato-etílica, fração aquosa e os compostos isolados 7-epi e fuk, solubilizados em metanol em uma concentração de 2,0 mg/mL) foram adicionados as culturas em diferentes concentrações, estes foram levados para estufa a 37°C e 5,0 % de CO₂, e analisados por 2 horas e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas os poços foram lavados, para que as amostras fossem retiradas do contato com os parasitas, com a remoção do meio de cultura dos poços e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por 5 vezes (ou até perceber que os compostos foram retirados).

Cada poço foi observado diariamente por 8 dias para avaliar se os vermes se recuperavam após retirá-los do contato com as amostras, comparado - os com os controles (três poços foram usados para controle, um com o PZQ, o outro somente com o meio de cultura suplementado e o outro com o acréscimo do solvente usado para dissolver as amostras, o metanol. A determinação do ED₉₀ (dose efetiva para matar 90,0 % dos vermes) e do ED₅₀

(dose efetiva para matar 50,0 % dos vermes) foram realizadas pelo programa de computador GraphPad Prism (versão 5.0). Os vermes foram avaliados e comparados com os controles, quanto a quantidade de vermes acasalados, movimento, contração/encurtamento, morfologia, desprendimento de tegumento e ovoposição. Todos os testes foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes, e o PZQ foi utilizado como medicamento de referência. De acordo com esquema mostrado na Figura 13.

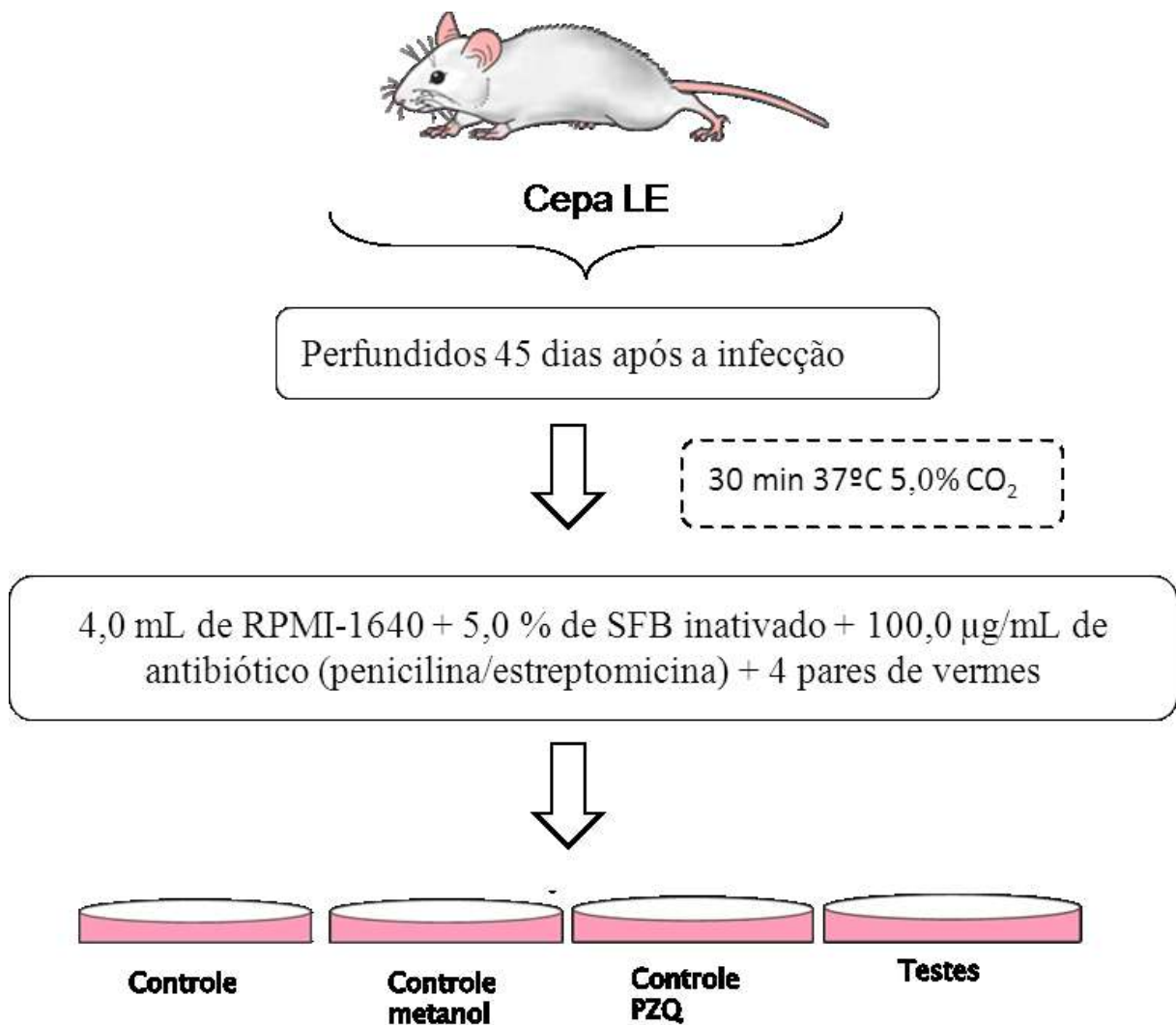


Figura 13 - Esquema da obtenção dos parasitas para teste *in vitro*.

5.3.6 Avaliação *in vitro* da atividade excretora e do dano causado no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* pela 7-epi através de sondas fluorescentes

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

5.3.6.1 Fluorescência (Microscopia de Fluorescência)

O fenômeno da fluorescência pode ser descrito sucintamente como um tipo de emissão de luz (luminescência) em que um corpo (sonda fluorescente ou fluoróforo) absorve luz e logo depois a emite. A absorção da luz ocorre de uma fonte de energia, que no caso da microscopia de fluorescência provem 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.

5.3.6.2 Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes

Para avaliar o efeito da 7-epi sobre o funcionamento do sistema excretor e sobre a camada superficial do tegumento do verme adulto de *S. mansoni*, foram realizados experimentos, utilizando dois marcadores fluorescentes (sondas) e microscopia de fluorescência.

A Resorufin (FIGURA 14) é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina), de natureza fluorescente e um modulador/substrato da P-glicoproteína (Pgp) (utilizada por: Sato et al. 2002). A Resorufin difunde-se passivamente através do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e é excretada do mesmo, através de uma suposta Pgp expressa no epitélio excretor.

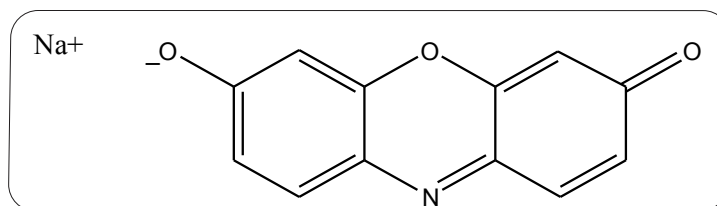


Figura 14 - Estrutura molecular da Resorufin (fonte: Sato et al. 2002).

Assim, avaliamos o efeito da 7-epi sobre a atividade excretora, mais precisamente sobre a Pgp, utilizando a sonda Resorufin. A Resorufin foi obtida da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sob a forma de pó e diluída em água destilada obtendo-se uma solução estoque com concentração de 10 mg/mL.

A Hoechst 33258 (FIGURA 15) (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) é uma sonda hidrofílica e fluoresce somente quando se liga ao DNA das células. Porém, por ser hidrofílica só consegue se difundir para o interior das células quando há presença de lesões, atuando como um indicador de integridade de membrana.

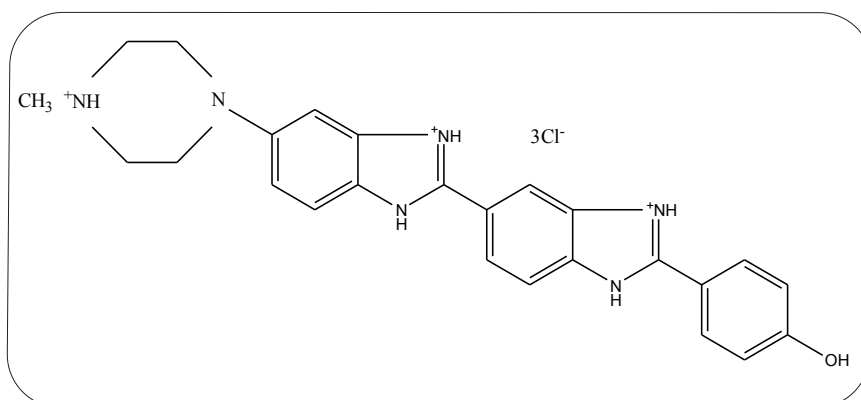


Figura 15 - Estrutura molecular da Hoechst 33258 (fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes).

A observação do dano causado pela 7-epi sobre a membrana tegumentar foi determinada pela fluorescência emitida pela sonda Hoechst 33258, quando está foi capaz de se ligar ao DNA. As áreas com fluorescência (azul) corresponderam a regiões lesadas (utilizada por: LIMA et al., 1994a). A Hoechst 33258 foi obtida da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sob a forma de pó e diluída em água destilada obtendo-se uma solução estoque com concentração de 10 mg/mL.

5.3.6.3 Perfusão – Obtenção dos parasitos para uso nas técnicas de fluorescência

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, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965), descrito no item 5.3.6.

5.3.6.4. Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* exposto a 7-epi após marcação com a sonda Resorufin

Posteriormente à perfusão, os vermes adultos foram lavados e transferidos para placas de cultura de 6 poços (4 pares por placa), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5,0 % (v/v) de soro bovino fetal inativado pelo calor (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) e 1,0 % de penicilina (10000,0 UI/mL) estreptomicina / (10 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), perfazendo um volume final de 4 mL para cada poço.

Adicionaram-se em cada poço 10,0 μ L de Resorufin (solução estoque a 10mg/mL), foram incubadas em estufa a 37°C e 5,0 % CO₂ por 30 minutos. Após este período, 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) 24 μ L (12,0 μ g/mL), 32,0 μ L (16,0 μ g/mL), 40,0 μ L (20,0 μ g/mL) de uma solução estoque de 7- epiclusianona a 2,0 mg/mL sendo que um dos poços continha apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado (controle). Estas placas foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período, os vermes foram lavados 5 vezes com 4mL de meio de RPMI-1640 suplementado. Esses testes foram feitos em triplicatas em 3 momentos diferentes e preparados para a visualização no microscópio de fluorescência (FIGURA 16).

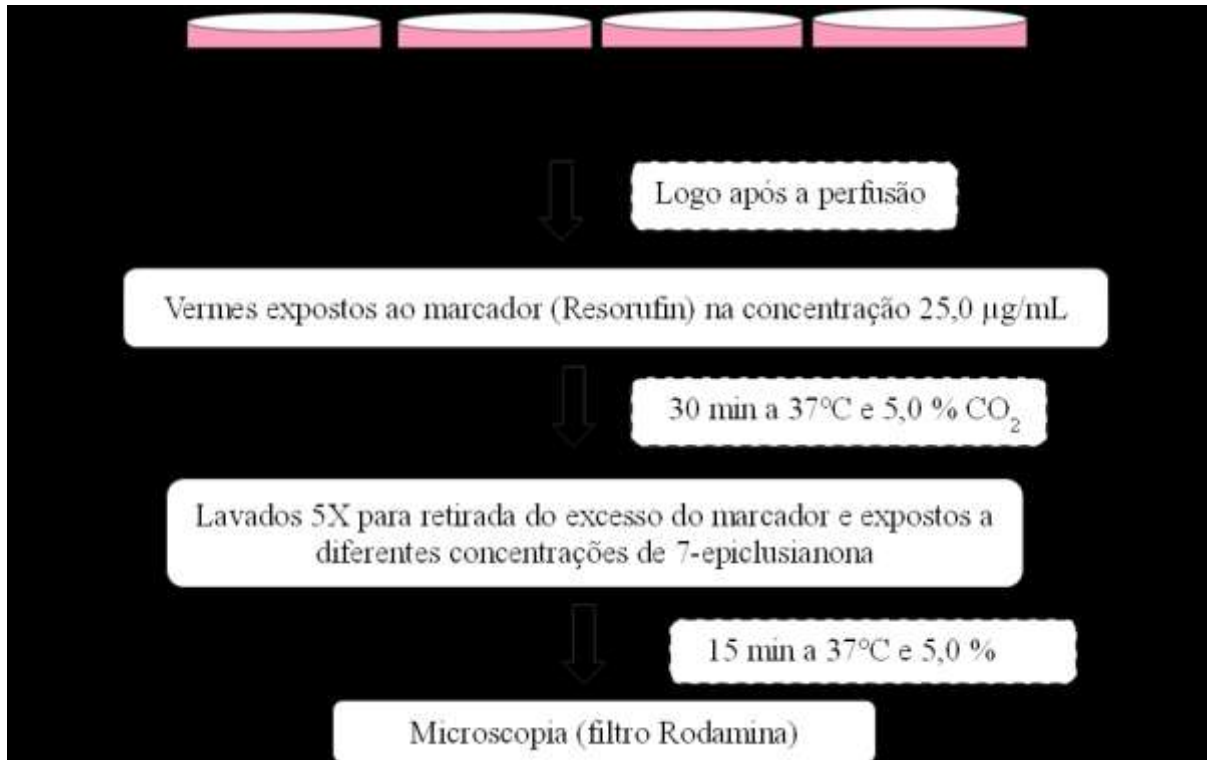


Figura 16- Esquema do experimento de marcação dos vermes com a sonda Resorufin.

5.3.6.5 Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto *de S. mansoni* exposto a 7-epi após marcação com a sonda Hoechst 33258

Posteriormente à perfusão, os vermes adultos foram lavados e transferidos para placas de cultura de 6 poços (4 pares por placa), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5,0 % (v/v) de soro bovino fetal inativado pelo calor (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) e 1,0 % de penicilina (10000UI/mL) estreptomicina / (10mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), perfazendo um volume final de 4,0 mL para cada poço. Após foi adicionados nos poços 40,0 µL de metanol (controle), 2,5 µL (2,0 µg/mL) de uma solução estoque de PZQ a 0,8 mg/mL (controle) 24,0 µL (12,0 µg/mL), 32,0 µL (16,0 µg/mL), 40,0 µL (20,0 µg/mL) de uma solução estoque de 7-epi a 2,0 mg/mL sendo que um dos poços contia apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado (controle). 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. Adicionaram-se em cada poço 10,0 µL de Hoechst 33258. Estas placas foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições anteriores.

Ao final deste período, os vermes foram lavados 5 vezes com 4,0 mL de meio de RPMI-1640 suplementado com 5,0 % (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (SBF) e 1,0 % de penicilina (10000,0 UI/mL) / estreptomicina (10 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), esses testes foram feitos em triplicatas e preparados para a visualização no microscópio de fluorescência (FIGURA 17).

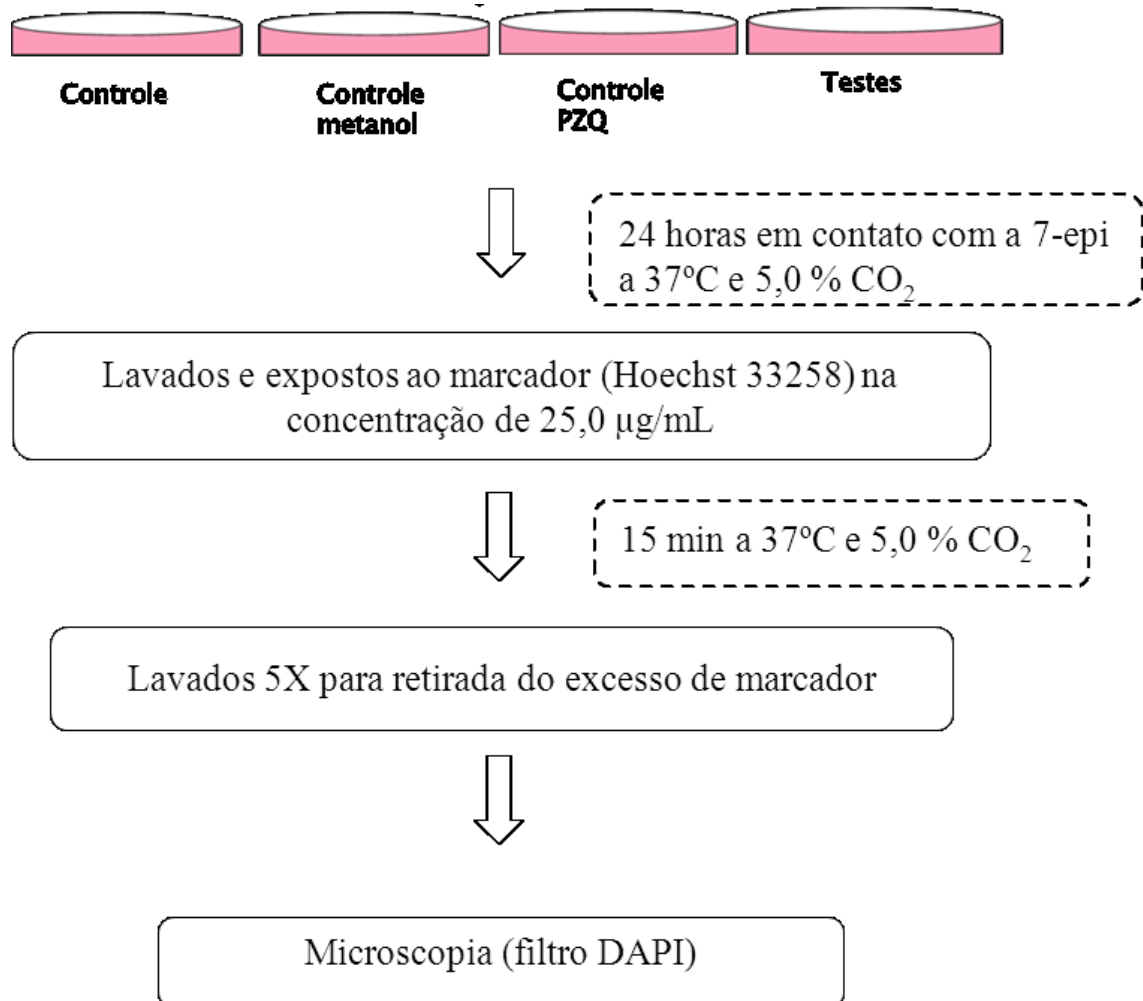


Figura 17 - Esquema do experimento de marcação dos vermes com a sonda Hoechst 33258.

5.3.6.6 Microscopia de Fluorescência (preparo das lâminas para leitura)

Ao final de cada experimento, os parasitos foram transferidos para lâminas delimitadas por pequenas quantidades de vaselina, a fim de se evitar o extravasamento dos vermes para

fora da lâmina. Os parasitos foram colocados nas lâminas 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. Em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (Nikon – Eclipse 80i) utilizando filtro Rodamina para Resorufin e (excitação/emissão máxima da Resorufin 571/585 nm) e DAP para Hoechst 33258 (excitação/emissão máxima da Hoechst 352/455 nm).

5.3.7 Avaliação *in vitro* do efeito da 7-epi sobre cercarias de *S. mansoni*

Biomphalaria glabrata infectados foram induzidos a eliminar cercarias através da exposição à luz por 1 hora, em água desclorada. Aproximadamente 100 cercárias (100,0 µL) foram colocados em uma placa de 24 poços com 900,0 µL de água desclorada expostos a 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 150,0 µg/mL de 7-epi. Após 1, 2, 4, 6 e 8 horas, motilidade, contração e perda da cauda foram observados (LIANG et al., 2009) utilizando microscopia invertida. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos três vezes utilizando 1% de DMSO e água desclorada como controle negativo e praziquantel (PZQ) a 12,5 µg/mL como controle positivo.

5.3.8 Avaliação *in vitro* do efeito da 7-epi sobre esquistossômulos de *S. mansoni*

Cercárias foram convertida em esquistossômulos por transformação mecânica, usando um misturador de Vortex, como descrito por Ramalho-Pinto et al (1974). Esquistossômulos foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado (RPMI-1640 + 5,0 % SFB (soro fetal bovino) + 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina (antibiótico). Exposto a 8,0, 12,0 e 24,0, 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL de 7-epiclusianona. Foram incubadas em estufa a 37°C com 5,0 % de CO₂ e analisadas com 2, 24 e 48 horas utilizando microscopia invertida. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos três vezes utilizando metanol e RPMI-1640 suplementado como controle negativo e praziquantel (PZQ) a 12,5 µg/mL como controle positivo.

5.3.9 Avaliação *in vitro* do efeito 7-epi em associação com o PZQ sobre vermes adultos de *S. mansoni*

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, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965), descrito no item 5.3.6.

Após um período de 30 min de adaptação, as amostras (7-epi solubilizados em metanol em uma concentração de 2,0 mg/mL e PZQ solubilizado em RPMI-1640 em uma concentração de 0,8 mg/mL) foram adicionados as culturas seguindo o esquema PZQ/7-epi na proporção $\mu\text{g/mL}$: 0,5/8,0; 0,5/4,0; 0,5/2,0; 0,25/8,0; 0,25/4,0; 0,25/2,0; e 0,125/8,0; 0,125/4,0; 0,125/2,0. Para o controle 10 poços foram usados sendo que 4 com o PZQ 0,5; 0,25; 0,125 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, 4 com a 7-epi 2,0; 4,0; 8,0 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$, 1 poço contendo somente o meio de cultura suplementado e o outro com o acréscimo do solvente usado para dissolver a 7-epi, o metanol. Foram levados para estufa a 37°C e 5,0 % de CO₂, e analisados por 2 horas e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas os poços foram lavados, para que as amostras fossem retiradas do contato com os parasitas, com a remoção do meio de cultura dos poços e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por 5 vezes (ou até perceber que as amostras tenham sido retiradas).

Cada poço foi observado diariamente por 8 dias para avaliar se os vermes se recuperavam após retirá-los do contato com as amostras, comparando-as com o controle. Os vermes foram avaliados e comparados com os controles, quanto a, quantidade de vermes acasalados, movimento, contração/encurtamento, morfologia, desprendimento de tegumento e ovoposição. Todos os testes foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

5.3.10 Teste de toxicidade aguda *in vivo* para avaliação da eficácia da 7-epi isoladamente e de sua associação com PZQ

Para o teste de toxicidade aguda foram selecionados 48 camundongos fêmeas, pesando entre 25,0 a 30,0 gramas, estes foram infectados por via subcutânea com 100 ± 10 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE), as Diretrizes do Comitê de Ética para a utilização de animais

experimental da Fiocruz foram seguidos. Após 45 dias de infecção, os camundongos foram pesados com o auxílio de balança eletrônica digital e divididos em 4 grupos de 12 animais cada. Os animais foram tratados com 7-epi, PZQ (FIOCRUZ/Brasil) e a associação 7-epi/PZQ (TABELA 2), com a dose ajustada por quilo de peso de acordo com cada grupo experimental. Com a ajuda de gral e pistilo, a 7-epi e os comprimidos de PZQ foram macerados individualmente para a obtenção do medicamento em pó. O fator de correção correspondente ao PZQ foi calculado em função da quantidade de princípio ativo de cada comprimido. Os farmacos foram pesados em balança analítica, suspensas em água e administradas por via oral com o auxílio de seringa e agulha própria para gavagem. Os tratamentos foram realizados individualmente em 1 dose por dia, por 3 dias consecutivos para a 7-epi e no último dia foi administrado o PZQ em dose única. O esquema terapêutico seguido foi: O grupo 1 não recebeu o tratamento (controle da infecção), os animais do grupo 2 receberam 400,0 mg/Kg/dia de 7-epi durante 3 dias consecutivos, o grupo 3 receberam 200,0 mg/Kg de PZQ em dose única e o grupo 4 receberam 400,0 mg/Kg/dia de 7-epi durante 3 dias sendo que no terceiro dia foi administrado 200,0 mg/Kg em dose única (TABELA 2). No grupo que recebeu ambas as drogas, essas foram administradas separadamente (0,3 mL de cada droga).

Tabela 2 - Grupos experimentais e tratamentos

Grupo	Número de animais	Tratamento
1	12	Controle
2	12	400,0 mg/Kg de 7-epi x 3 dias = 1200 mg/Kg
3	12	200,0 mg/Kg de PZQ dose única
4	12	400,0 mg/Kg de 7-epi (x 3 dias = 1200 mg/Kg)+ 200,0 mg/Kg de PZQ (dose única)

Quinze dias após o tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A perfusão dos camundongos foi realizada individualmente, segundo a técnica de Pellegrino e Siqueira (1956): após exposição das vísceras, a veia porta foi seccionada, próximo à penetração no fígado e a porção terminal do intestino foi amarrada. Com o auxílio de uma agulha acoplada a um pipetador automático (Brewer), foi injetada solução heparinizada (0,016 % = 0,83 UI/mL) de salina 0,85 % na aorta torácica, permitindo assim, a perfusão das veias mesentéricas e a recuperação dos vermes adultos existentes. A perfusão do

fígado foi realizada através de injeção da solução de salina descrita anteriormente no hilo hepático. Os parasitos foram coletados em becker de 200 mL, lavados em solução salina e contados com auxílio de lupa, separando-se machos, fêmeas e acasalados .

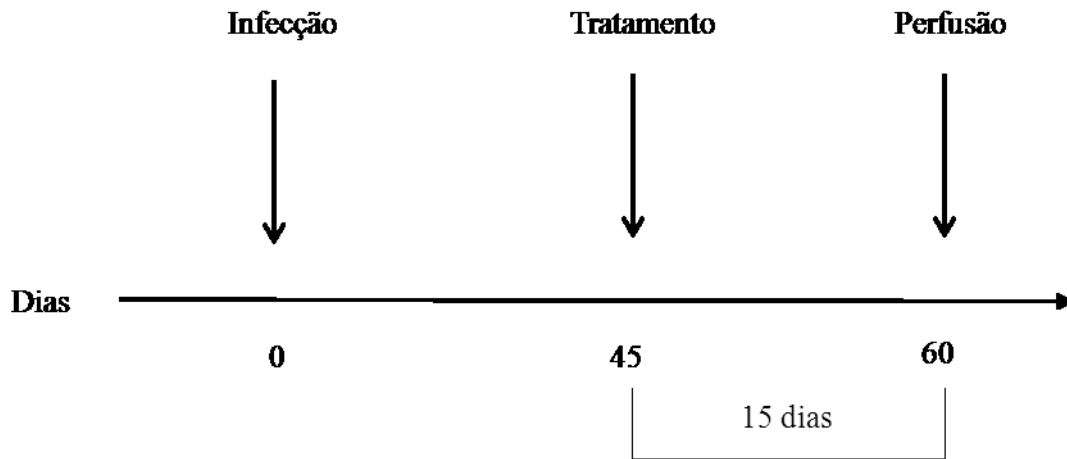


Figura 18 - Esquema de infecção, tratamento e perfusão

A atividade da 7-epi e de sua associação com PZQ foi avaliada por meio da perfusão dos animais pertencentes aos grupos tratados e do controle, considerando-se a média do número de vermes, as taxas de distribuição dos vermes nas veias mesentéricas e fígado, vermes mortos no fígado e alteração no oograma.

A contagem dos vermes mortos retidos no fígado foi feita, esmagando o fígado entre duas placas de vidro, observou em microscópio estereoscópico e contou os vermes mortos. (Técnica de Pellegrino e Siqueira, 1956, adaptada a camundongo).

O oograma foi feito da seguinte maneira: cortou-se um fragmento de ± 1 cm da porção distal do intestino delgado, esmagou entre lâmina e lamínula de plástico e observou ao microscópio óptico para caracterização dos ovos. O oograma é considerado alterado na ausência de ovos nos estágios iniciais de desenvolvimento (PELLEGRINO et al., 1962).

5.3.11 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 $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Rendimento dos extratos e frações

O rendimento do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi de 10,0 %. Já para as frações obteve-se um rendimento de: 39,0 % para a hexânica, 42,0 % para a de acetato de etila e 14,5 % para a aquosa.

6.2 Teor de flavonoides

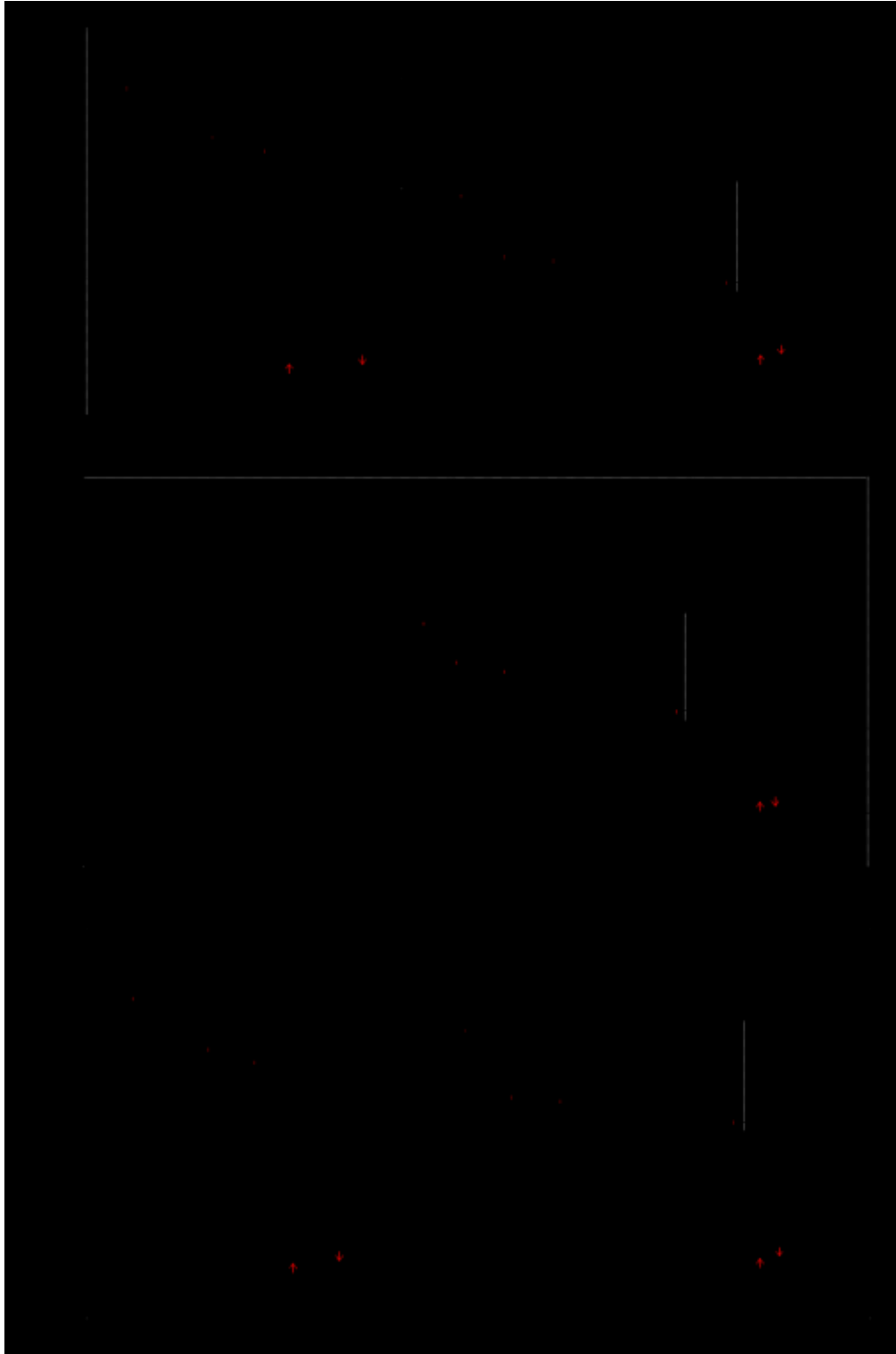
Os flavonóides totais do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi determinada a partir da regressão da equação da curva de calibração e expressos em equivalente de quercetina/grama (querc/g) de extrato. O teor de flavonóides totais encontrado no extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi de 22,52 µg em equivalentes de querc/g de extrato.

6.3 Análise cromatográfica, limite de detecção e quantificação do EEE de *G. brasiliensis* e de suas frações obtidas por partição FH, FAE e FA

Para análise do extrato etanólico de *G. brasiliensis* e suas frações obtidas por partição; fração hexânica (FH), fração acetato-etílica (FAE) e fração aquosa (FA); foram obtidos os cromatogramas, conforme Figuras 19. Os tempos de retenção, a área e a quantificação das substâncias isoladas no extrato e nas frações estão representados na Tabela 3. Alguns compostos, flavonóides e outros, que não foram identificados estão sendo investigados no Laboratório de Fitoquímica e Química Farmacêutica da UNIFAL (LFQM).

Análise química do EEE identificou a 7-epi como constituinte majoritário (140,02 mg/g) seguida pela fuk (35,86 mg/g) (FIGURA 19 A), na FH identificou a 7-epi como constituinte majoritário (278,74 mg/g) enquanto que o pico da fuk não foi identificado

(FIGURA 19 B), na análise química do FAE identificou a 7-epi como constituinte majoritário (209,04 mg/g) seguida pela fuk (24,19 mg/g) (FIGURA 19 C), na FA não foi identificado o pico da fuk nem o pico da 7-epi (FIGURA 19 D). Esses picos podem ser comparados com os padrões (FIGURA 19 E e F).



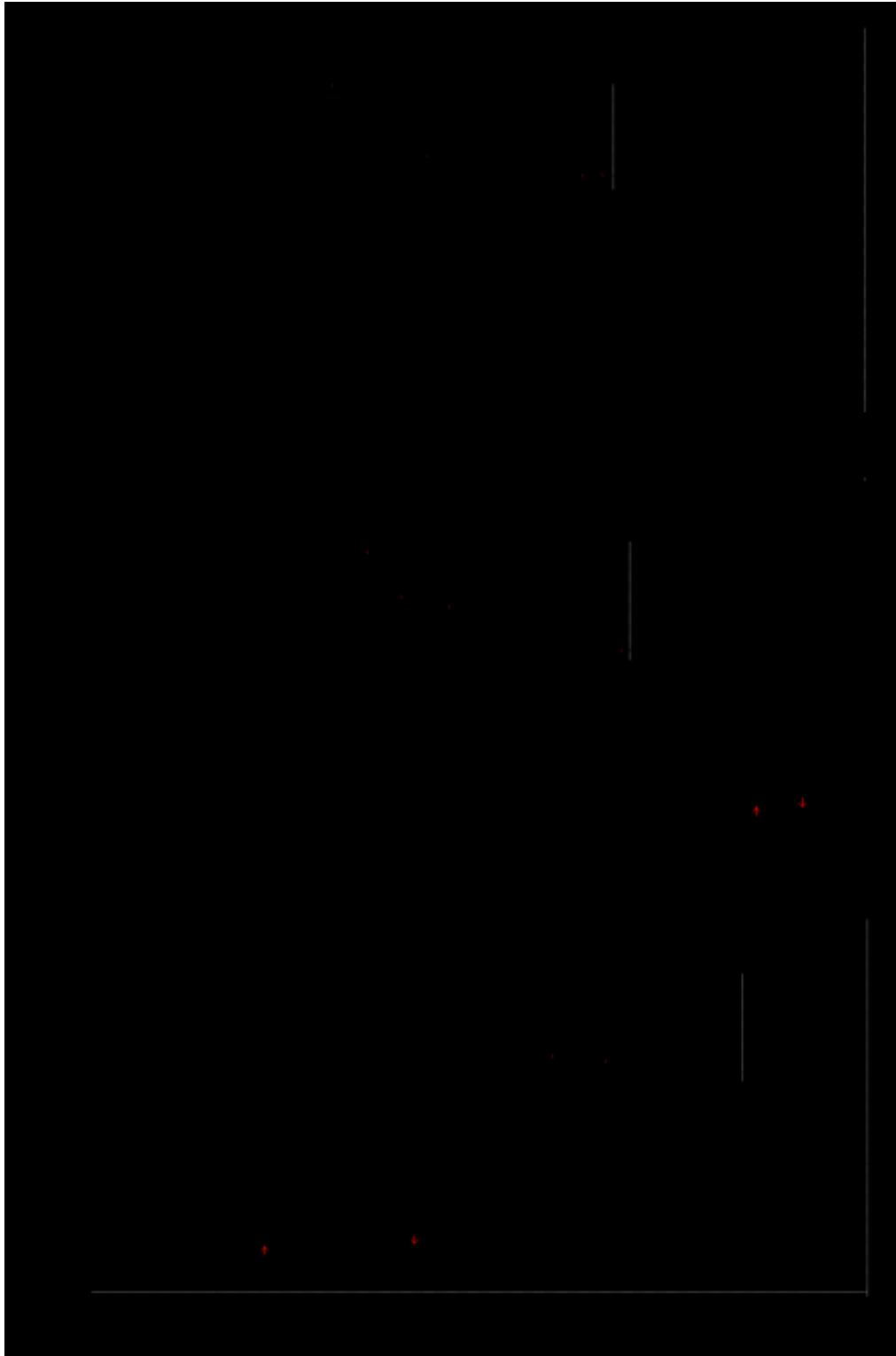


Figura 19: Cromatogramas obtido por cromatografia líquida alta performance: A cromatograma do **EEE** de *G. brasiliensis* mostrando a separação da 7-epi (1) (26,034 min) e da fuk (2) (8,502 min). B cromatograma da **FH** do EEE de *G. brasiliensis*, mostrando a separação da 7-epi (1) (25,988 min). C cromatograma da **FAE** do EEE de *G. brasiliensis* mostrando a separação da 7-epi (1) (26,036 min) e da fuk (2) (8,502 min). D cromatograma da **FA** do EEE de *G. brasiliensis*. E cromatograma do padrão da fuk mostrando o tempo de retenção (8,318 min). F cromatograma do padrão da 7-epi mostrando o tempo de retenção (26,008 min).

Tabela 3: Principais componentes encontrados no extrato e nas frações identificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance.

	Tempo de retenção (min)		Quantidade encontrada (mg/g de extrato)	
	7-epi	Fuk	7-epi	Fuk
EEE	26,034	8,502	140,02	35,86
FH	25.988	Nd	278,74	Nd
FAE	26,036	8.502	209,04	24,19
FA	26,271	Nd	Nd	Nd

Nd: Não detectado.

Os resultados se mostram condizentes, pois na FH foi encontrada uma maior concentração de 7-epi devido a essa molécula ser mais apolar. A alta quantidade de 7-epi que ainda foi encontrada na FAE provavelmente se deve a quantidade insuficiente de hexano nas extrações líquido-líquido para que toda 7-epi fosse extraída do extrato.

6.4 Avaliação *in vitro* do efeito do EEE *G. brasiliensis* de suas frações obtidas por partição, FH, FAE e FA sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Primeiramente foi feito uma análise da atividade do EEE de *G. brasiliensis*, conforme descrito abaixo.

6.4.1 Avaliação da atividade *in vitro* do EEE de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram expostos a diferentes concentrações do EEE de *G. brasiliensis* a (25,0; 50,0; 60,0; 75,0; 100,0 e 150 µg/mL) e após 2 horas em contato com 150,0 µg/mL de EEE apresentavam pouco movimento. Porém, após 24 horas em contato com o extrato eles estavam imóveis, machos enrolados, fêmeas alongadas e com as extremidades enroladas. Bolhas no tegumento também foram observadas e assim permaneceram ao longo

de todo o experimento (TABELA 4). Até o 8º dia, ovos de *S. mansoni* estavam ausentes nos poços experimentais, além do desprendimento de tegumento (FIGURA 20). Os vermes do grupo controle apresentavam movimentos e morfologia normais, com presença de ovos nos poços durante as primeiras 24 horas, além dos miracídeos recém-eclodidos, quando examinados oito dias após o início do experimento.

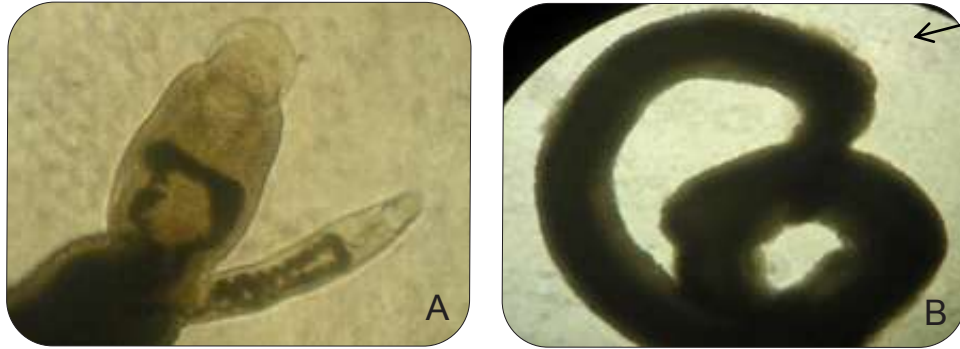


Figura 20: Avaliação da atividade *in vitro* do EEE de *G. brasiliensis* em vermes adulto de *S. mansoni*. Grupo controle não exposto ao fármaco. A: vermes adultos acasalados sem alterações morfológicas aparentes. Avaliação da atividade do EEE de *G. brasiliensis*. Grupo exposto a 100,0 µg/mL (ED₉₀) do extrato. B: vermes adulto macho, imóvel desacasalado e enrolado, com desprendimento de tegumento (seta) com quatro dias de cultura, sem presença de ovos. Em nenhuma das observações pode ser detectado ovos no grupo exposto a EEE.

6.4.1.1 Cálculo do ED₅₀ do EEE

O EEE apresentou ED₉₀ em torno de 100,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 66,0 µg/mL, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 21 e 22).

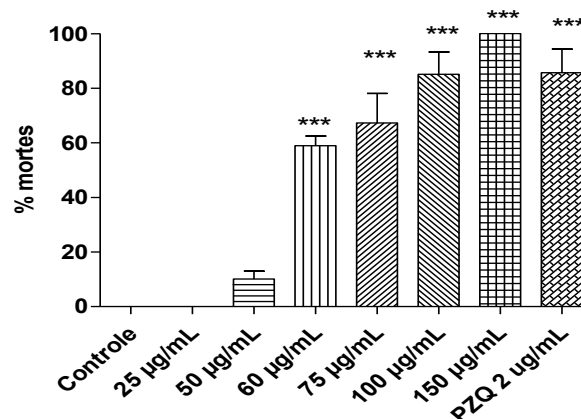


FIGURA 21: Atividade *in vitro* do EEE sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do EEE. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo.

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

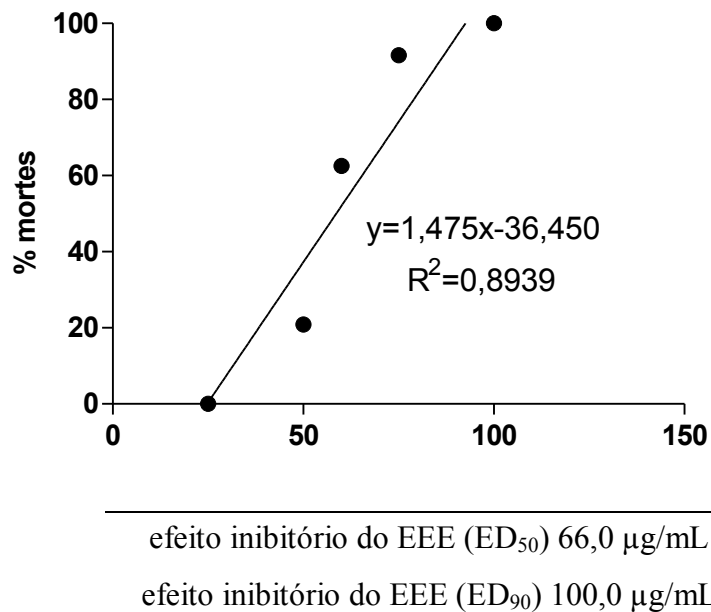


Figura 22: Cálculo do ED₅₀ do EEE na viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*. A linha indica a curva dose-resposta assumindo um efeito sigmoide da concentração do EEE. Os valores de ED₅₀ (concentração inibitória eficaz para matar 50,0 % dos vermes) e ED₉₀ (concentração inibitória eficaz para matar 90,0 % dos vermes) são mostrados na tabela anexa.

Em relação ao acasalamento e à postura de ovos (FIGURA 23) pelas fêmeas de *S. mansoni*, foi observado que em doses superiores a 50,0 µg/mL do EEE os vermes adultos machos e fêmeas mantiveram separados e não houve ovoposição.

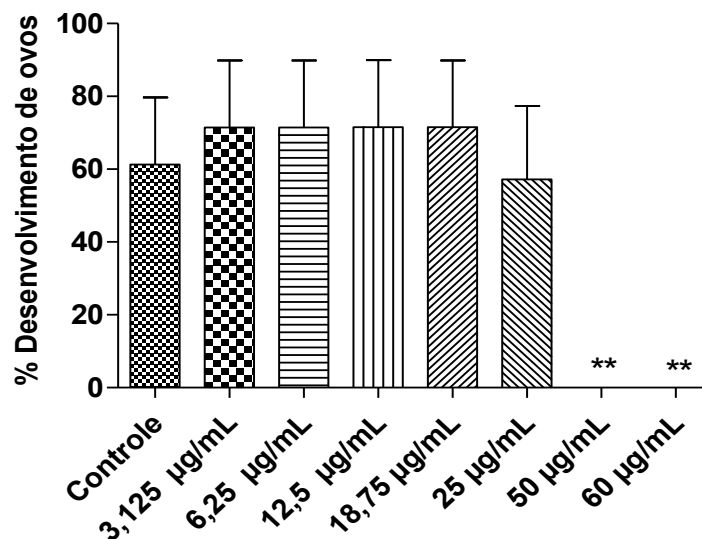


Figura 23: Efeito *in vitro* do EEE sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos. ** P < 0,05

Como foi observado atividade no EEE de *G. brasiliensis* testou-se suas frações obtidas por partição: FH, FAE e FA.

6.4.2 Avaliação da atividade *in vitro* da FH da partição do EEE de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram expostos a diferentes concentrações da FH da partição do EEE de *G. brasiliensis* (25,0; 35,0; 40,0; 50,0; 60,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$) e após 2 horas em contato com 75,0 $\mu\text{g/mL}$ da FH os machos apresentavam pouco movimento e as fêmeas estavam paradas. Porém, após 24 horas em contato eles estavam todos imóveis, com machos e fêmeas enrolados, bolhas no tegumento; e assim permaneceram ao longo de todo o experimento (TABELA 4). Até o 8º dia, ovos de *S. mansoni* estavam ausentes nos poços experimentais, além do desprendimento de tegumento (FIGURA 24). Os vermes do grupo controle apresentavam movimentos e morfologia normais, além de ovos durante as primeiras 24 horas; e com a presença de miracídeos recém-eclodidos, quando examinados oito dias após o início do experimento.

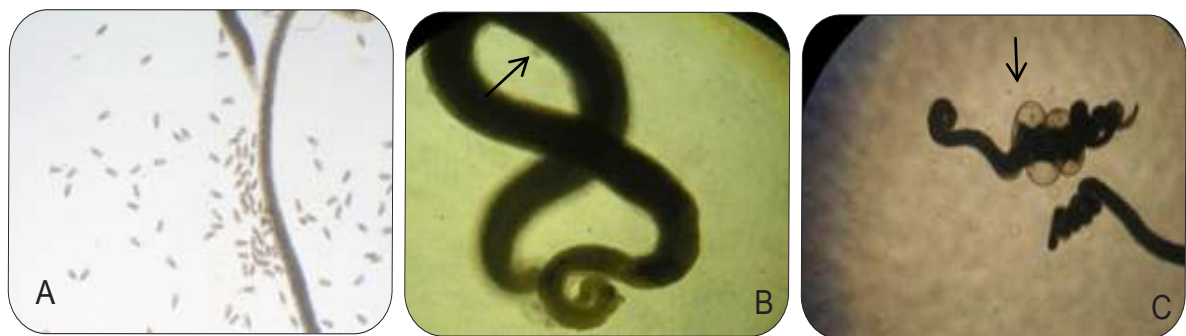


Figura 24: Avaliação da atividade *in vitro* da FH da partição do EEE de *G. brasiliensis* em vermes adulto de *S. mansoni*. Grupo controle não exposto ao fármaco. A: verme adulto fêmea, sem alterações morfológicas aparentes, presença de ovos nos primeiros estágios de desenvolvimento, com 24 horas de cultura. Avaliação da atividade da FH da partição do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*. Grupo exposto a 68,0 $\mu\text{g/mL}$ (ED_{90}) da fração. B: vermes adulto macho, imóvel desacasalado e enrolado, com desprendimento de tegumento (seta) com quatro dias de cultura, sem presença de ovos. C: Vermes adultos fêmeas estavam enroladas e com bolhas no tegumento. Em nenhuma das observações pode ser detectado ovos no grupo exposto a FH.

6.4.2.1 Cálculo do ED₅₀ da FH

A FH apresentou ED₉₀ em torno de 68,0 µg/mL contra vermes adultos de *S. mansoni* *in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 51,0 µg/mL, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 25 e 26).

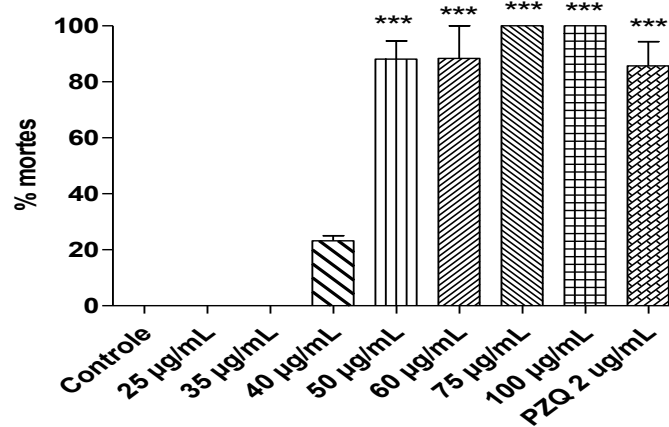


Figura 25: Atividade *in vitro* do FH sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do FH. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** P < 0,05.

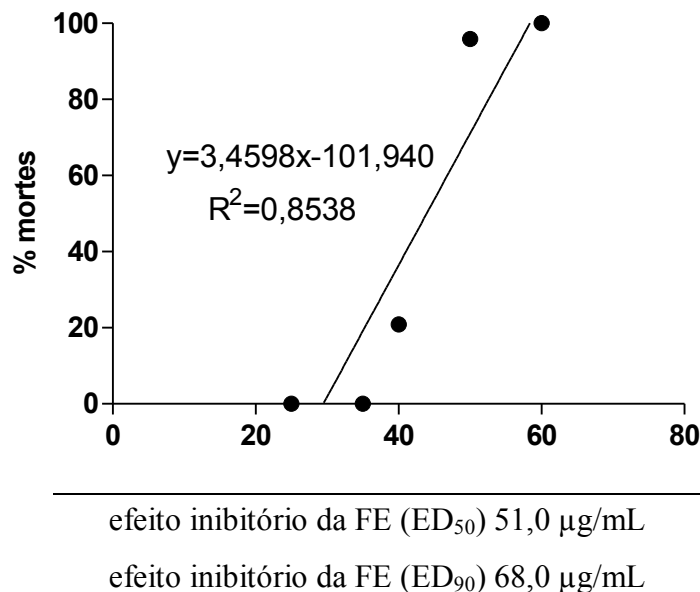


Figura 26: Cálculo do ED₅₀ da FH na viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*. A linha indica a curva dose-resposta assumindo um efeito sigmoide da concentração da FH. Os valores de ED₅₀ (concentração inibitória eficaz para matar 50,0 % dos vermes) e ED₉₀ (concentração inibitória eficaz para matar 90,0 % dos vermes) são mostrados na tabela anexa.

Em relação ao acasalamento e à postura de ovos (FIGURA 27) pelas fêmeas de *S. mansoni* foi observado que em doses superiores a 50,0 µg/mL da FH os vermes adultos machos e fêmeas mantiveram separados, e não houve oviposição.

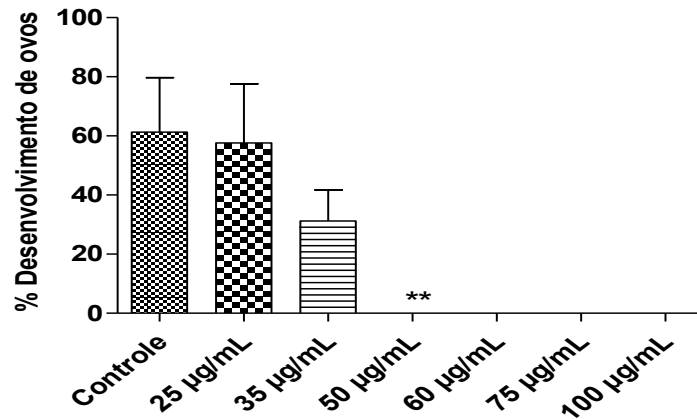


Figura 27: Efeito *in vitro* da FH sobre a oviposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos. ** P <0,05

6.4.3 Avaliação da atividade *in vitro* da FAE da partição do EEE de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram expostos a diferentes concentrações da FAE da partição do EEE de *G. brasiliensis* (25,0; 50,0; 60,0; 75,0; 100,0 e 150,0 µg/mL) e após 2 horas em contato com 100,0 µg/mL da FAE machos e fêmeas apresentavam pouco. Porém, após 24 horas em contato com o extrato eles se demonstraram todos imóveis, com machos e fêmeas enrolados, e assim permaneceram ao longo de todo o experimento (TABELA 4). Até o 8º dia, ovos de *S. mansoni* estavam ausentes nos poços experimentais, além do desprendimento de tegumento (FIGURA 28). Os vermes do grupo controle apresentavam movimentos e morfologia normais, além de ovos durante as primeiras 24 horas; e com a presença de miracídios recém-eclodidos, quando examinados oito dias após o início do experimento.

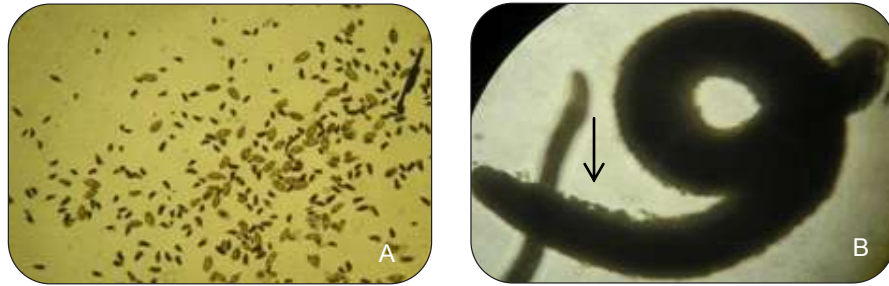


Figura 28: Avaliação da atividade *in vitro* da FAE da partição do EEE de *G. brasiliensis* em vermes adulto de *S. mansoni*. Grupo controle não exposto ao fármaco. A: presença de ovos de todos os estágios de desenvolvimento, com oito dias de cultura. Avaliação da atividade da FAE da partição do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*. Grupo exposto a 97,0 $\mu\text{g/mL}$ (ED_{90}) da fração. B: vermes adulto macho, imóvel desacasalado e enrolado, com desprendimento de tegumento (seta) com quatro dias de cultura, sem presença de ovos. Em nenhuma das observações pode ser detectado ovos no grupo exposto a FAE.

6.4.3.1 Cálculo do ED_{50} da FAE

A FAE apresentou ED_{90} em torno de 97,0 $\mu\text{g/mL}$ contra vermes adultos de *S. mansoni* *in vitro*. A partir do ED_{90} foi calculado o ED_{50} obtendo um valor de 61,0 $\mu\text{g/mL}$, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 29 e 30).

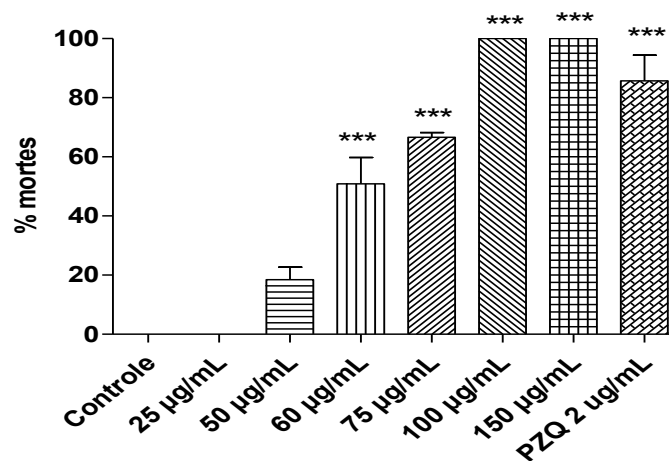


Figura 29: Atividade *in vitro* do FAE sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações do FAE. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** $P < 0,001$.

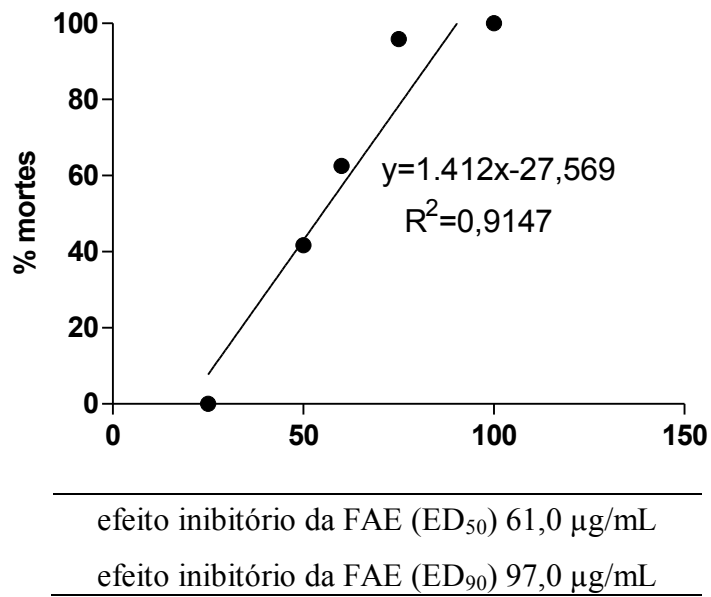


Figura 30: Cálculo do ED₅₀ da FAE na viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*. A linha indica a curva dose-resposta assumindo um efeito sigmoide da concentração do FAE. Os valores de ED₅₀ (concentração inibitória eficaz para matar 50,0 % dos vermes) e ED₉₀ (concentração inibitória eficaz para matar 90,0 % dos vermes) são mostrados na tabela anexa.

Em relação ao acasalamento e à postura de ovos (FIGURA 31) pelas fêmeas de *S. mansoni* foi observado que em doses superiores a 50,0 µg/mL da FAE vermes adultos machos e fêmeas mantiveram separados, o que impediu o processo de acasalamento e oviposição.

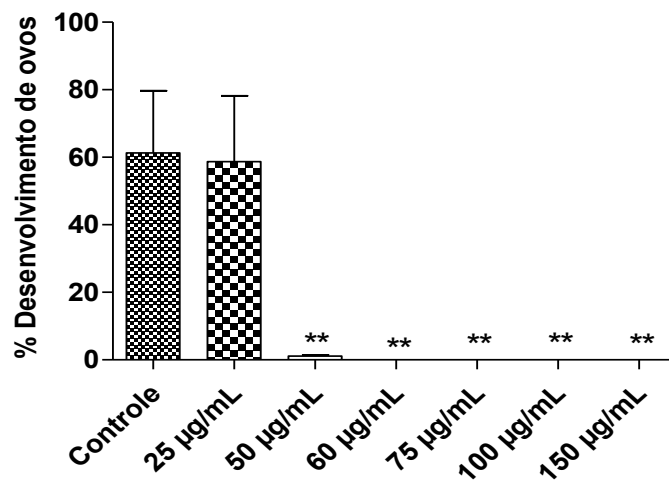


Figura 31: Efeito *in vitro* da FAE sobre a oviposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos. ** P < 0,05

6.4.4 Avaliação da atividade *in vitro* da FA da partição do EEE de *G. brasiliensis* sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram expostos a 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{g/mL}$ da fração aquosa da partição do extrato etanólico da semente de *G. brasiliensis*; e não apresentaram nenhuma mudança morfológica através da observação (FIGURA 32), usando um microscópio invertido com ampliação de 100X. O tegumento estava aparentemente sem modificações, os vermes apresentavam similaridade com os do grupo controle. Apresentaram ovos (FIGURA 33) durante as primeiras 24 horas com a presença de miracídios recém-eclodidos, quando examinados oito dias após o início do experimento (TABELA 4).

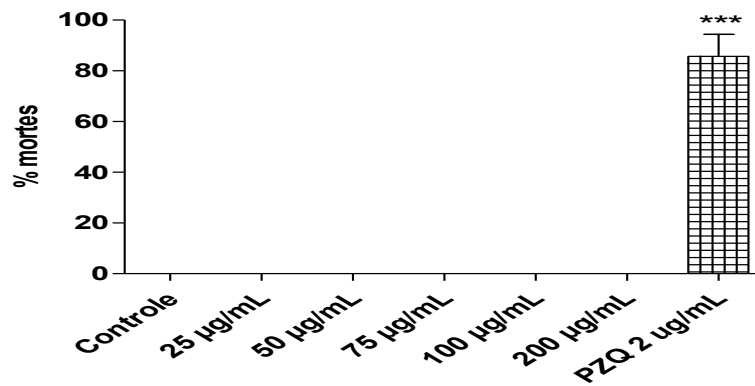


Figura 32: Atividade *in vitro* do FA sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações da FA. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** $P < 0,0001$.

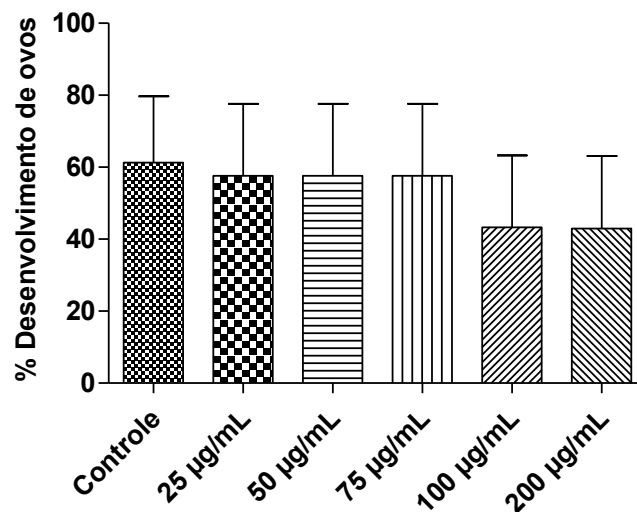


FIGURA 33: Efeito *in vitro* da FA sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou

não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos.

6.4.5 Comparação dos resultados *in vitro* do EEE e das Frações, FH, FAE, FA, em comparação com o controle e com o PZQ sobre vermes adultos *S. mansoni*

A Tabela 4 contém os resultados obtidos para a atividade esquistossomicida (ED₉₀) frente EEE, e as suas frações FH, FAE e FA.

Tabela 4: Análise da atividade esquistossomicida do extrato etanólico do epicarpo e de suas frações: hexânica, acetato de etila e aquosa, obtidas do epicarpo de *G. brasiliensis* frente ao ED₉₀.

Substância	ED ₉₀ (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração & encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	≥ 24h
CONTROLE	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
EEE	100	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/-
FH	68	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/+
FAE	97	+	-	-/-/-	-/-/-	+/-	+/-
FA	200	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
PZQ	2	+	-	+/-/-	+/-/-	+/-	+/+

+++ 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.

EEE: Extrato etanólico do epicarpo; FH: Fração hexânica; FAE: Fração acetato de etila;

FA: Fração aquosa; PZQ: praziquantel.

6.5 Avaliação da atividade *in vitro* dos compostos purificados sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Como foi observada atividade no EEE de *G. brasiliensis* assim como em suas frações (FH e FAE) obtidas por partição optou-se por analisar a atividade esquistossomicida dos principais componentes (7-epi e fuk) observados nos cromatogramas referentes ao EEE de *G. brasiliensis* assim como nos cromatogramas de suas frações.

6.5.1 Avaliação da atividade *in vitro* da fuk sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram expostos a diferentes concentrações de fuk (25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{g/mL}$). E nessas concentrações testadas não apresentaram nenhuma mudança morfológica conforme pode ser observado na FIGURA 34, usando um microscópio invertido com ampliação de 100X. O tegumento estava aparentemente sem modificações e os vermes apresentavam similaridade com os do grupo controle. Apresentaram ovos durante as primeiras 24 horas além de miracídios recém-eclodidos (FIGURA 35), quando examinados oito dias após o início do experimento (TABELA 5).

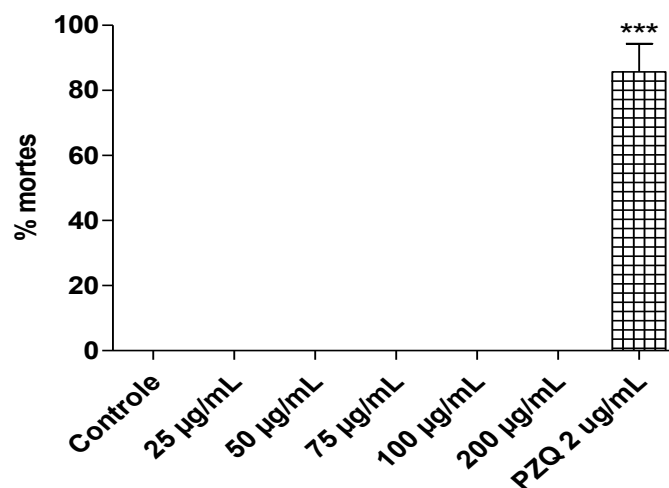


Figura 34: Atividade *in vitro* da fuk sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações da fuk. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo.

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

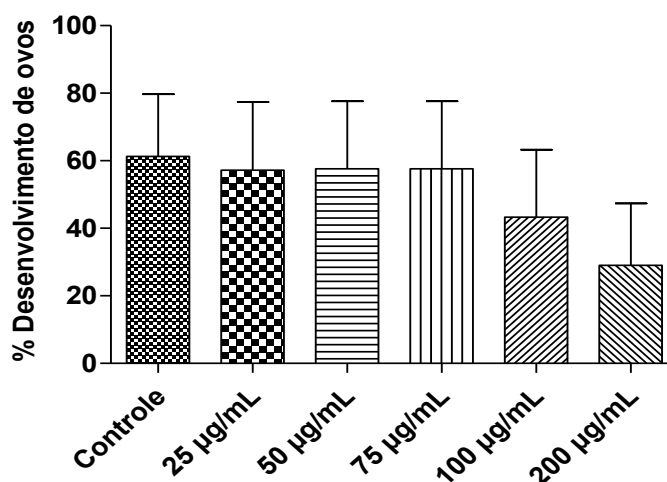


Figura 35: Efeito *in vitro* da Fuk sobre a ovoposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos.

6.5.2 Avaliação da atividade *in vitro* da 7-epi sobre vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes foram expostos a diferentes concentrações de 7-epi (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0; 26,0; 28,0; 30,0; 50,0 e 100,0 µg/mL) e após 24 horas em contato com 14,0 µg/mL (ED₉₀) da substância os vermes se apresentaram imóveis; e assim eles permaneceram ao longo do experimento (TABELA 5). Nas primeiras horas, alguns vermes poderiam ser visto enrolados; e 24 horas após o início dos experimentos, bolhas e desprendimento no tegumento foram observados. Até o 8º dia de observação os ovos de *S. mansoni* não foram observados nos poços experimentais. Os vermes nos grupos controles apareceram com movimentos e morfologia normais, apresentando ovos durante as primeiras 24 horas; além de miracídios recém-eclodidos, quando examinados oito dias após o início do experimento (FIGURA 36).

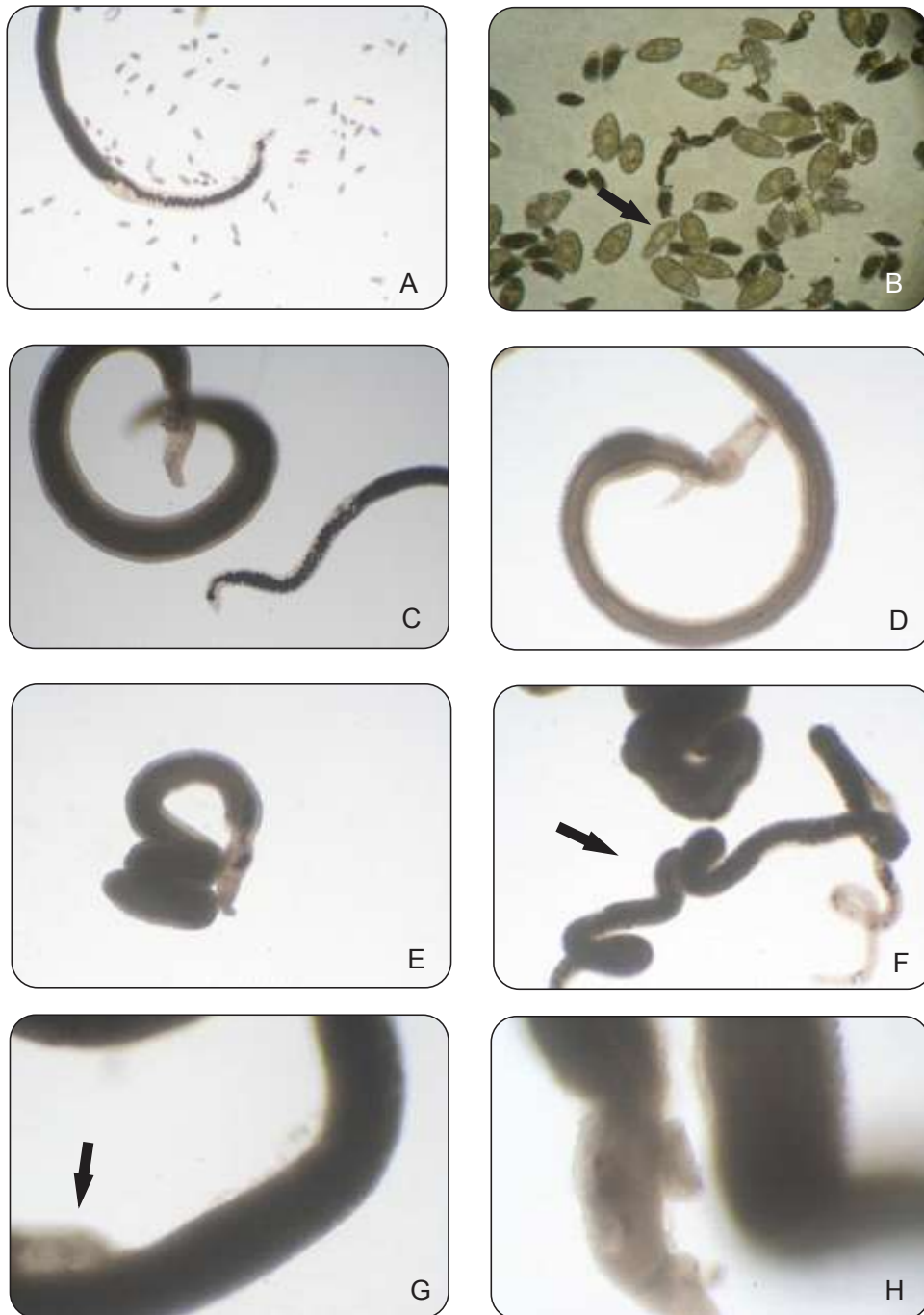


Figura 36: Avaliação da atividade *in vitro* da 7-epi em vermes adultos de *S. mansoni*. Grupo controle não exposto ao fármaco. A: Verme adulto fêmea, com presença de ovos em 24 horas de cultura; B: presença de ovos de todos os estágios de desenvolvimento, presença de miracídeos (seta) eclodidos com oito dias de cultura; C: vermes adultos, machos e fêmeas, sem alterações morfológicas aparentes; D: vermes adultos acasalados. Avaliação da atividade *in vitro* da 7-epi em vermes adulto *S. mansoni*. Grupo exposto a 13,4 $\mu\text{g/mL}$ do composto; E, F: vermes adultos: machos e fêmeas, imóveis desacasalados e enrolados, dois dias de cultura; G: vermes adultos: imóvel com bolhas no tegumento (seta) (24 horas após retirado do contato); H: Vermes adultos macho com desprendimento de tegumento (4 dias de cultura). Em nenhuma das observações pode ser detectado ovos nos grupos expostos a 7-epi.

Tabela 5: Análise da atividade esquistossomicida da 7-epiclusianona (7-epi) e da fukugetina (fuk) em diferentes concentrações.

Substância	Concentração (µg/mL)	Motilidade		Acasalamento/ Morfologia/ Presença de ovos		Contração & encurtamento/ Desprendimento do Tegumento	
		2h	≥ 24h	2h	≥ 24h	2h	≥ 24h
Controle	0	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
7-epi	16	-	-	-	-/-/-	+/+	+/+
	14	-	-	-	-/-/-	+/-	+/+
	12	+	+	-	-/-/-	+/-	+/-
	6	++	+	-	-/-/-	+/-	+/-
Fuk	200	+++	+++	+/+/-	+/+/+	-/-	-/-
PZQ	2	+	-	+/-/-	+/-/-	+/-	+/+

+++ 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. 7-Epi: 7-epiclusianona, Fuk: fukugetina, PZQ: praziquantel

Na Tabela 6 foi possível observar que a FH foi a que apresentou melhor atividade, devido a ter maior concentração de 7-epi.

Tabela 6: Comparação da atividade esquistossomicida (dose letal em µg/mL) do extrato e das frações e suas quantidades (mg/g) de 7-epi.

	EEE	FH	FAE	FA
Quantidade 7-epi (mg/g)	140,02	278,74	209,04	7,44
Dose Letal ED90 (µg/mL)	100	68	97	> 200

No gráfico abaixo (FIGURA 37) foi feito uma comparação do ED₉₀ da 7-epi e da fuk isoladamente em relação ao EEE de *G. brasiliensis* e sua frações (FH, FAE e FA) bem como ao PZQ. Observou-se que a 7-epi tem uma atividade melhor que o EEE e suas frações (FH e FAE) e ficou bem mais próxima ao PZQ, enquanto que a FA e a Fuk, não apresentaram atividade nas concentrações testadas.

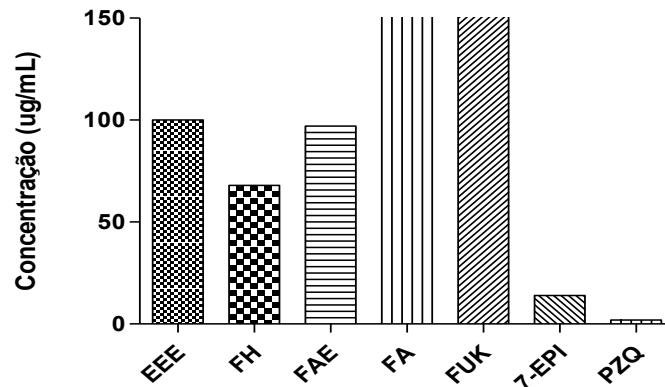


Figura 37: Atividade esquistossomicida: EEE de *G brasiliensis* (100,0 $\mu\text{g/mL}$) e suas frações, FH (68,0 $\mu\text{g/mL}$), FAE (97,0 $\mu\text{g/mL}$); FA (>200,0 $\mu\text{g/mL}$) e moléculas isoladas, 7-epi (13,4 $\mu\text{g/mL}$) Fuk (> 200,0 $\mu\text{g/mL}$) e PZQ (2,0 $\mu\text{g/mL}$).

6.5.2.1 Cálculo do ED₅₀ da 7-epi

A molécula bioativa 7-epi apresentou ED₉₀ em torno de 13,4 $\mu\text{g/mL}$ contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A partir do ED₉₀ foi calculado o ED₅₀ obtendo um valor de 8,3 $\mu\text{g/mL}$, como representado nos gráficos abaixo (FIGURA 38 e 39).

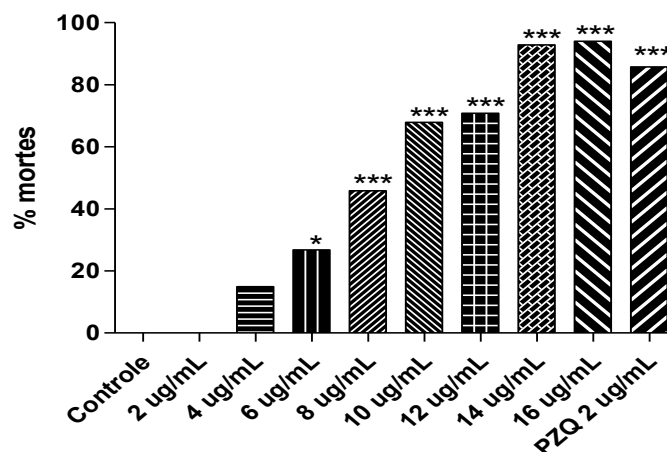
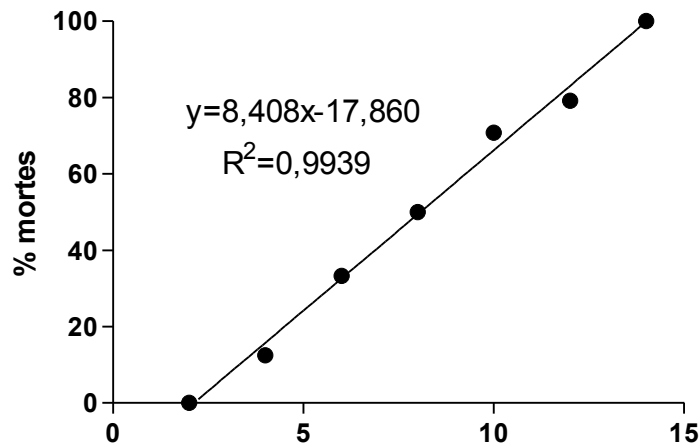


Figura 38: Atividade *in vitro* da 7-epi sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Pares de vermes adultos expostos a diferentes concentrações de 7-epi. O meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado, foi usado como controle negativo. Praziquantel (PZQ 2,0 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** P < 0,001.



50,0 % do efeito inibitório da molécula isolada 7-epi (ED₅₀) 8,3 µg/mL

90,0 % do efeito inibitório da molécula isolada 7-epi (ED₉₀) 13,4 µg/mL

Figura 39: Cálculo do ED₅₀ da 7-epi na viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*. A linha indica a curva dose-resposta assumindo um efeito linear da concentração de 7-epi. Os valores de ED₅₀ (concentração inibitória eficaz para matar 50,0 % dos vermes) e ED₉₀ (concentração inibitória eficaz para matar 90,0 % dos vermes) são mostrados na tabela anexa.

Em relação ao acasalamento e à postura de ovos pelas fêmeas de *S. mansoni* foi observado que em doses superiores a 4,0 µg/mL de 7-epi os vermes adultos machos e fêmeas mantiveram separados, e não houve oviposição.

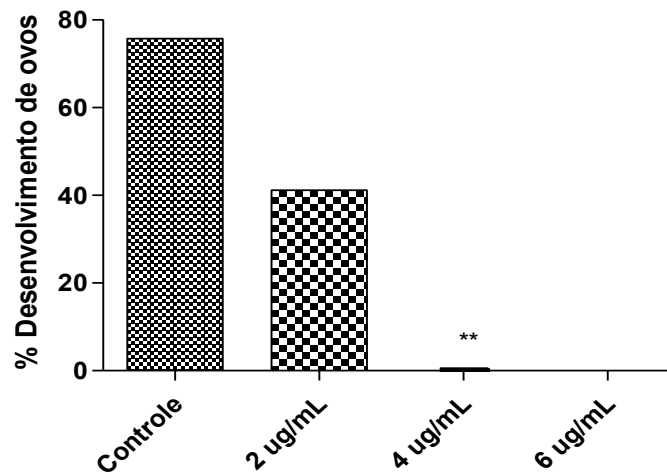


Figura 40: Efeito *in vitro* da 7-epi sobre a oviposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni* em diferentes concentrações. Após o tratamento, os ovos foram examinados microscopicamente e teve como desenvolvido ou não desenvolvidos com base na presença ou ausência do miracídio. Os dados são apresentados como a média de ovos desenvolvidos a partir de três experimentos. ** P < 0,05

Para avaliar a atividade excretora e o dano causado no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* pela 7-epi, os vermes adultos foram expostos às sondas fluorescentes, Resorufim e Hoechst 33258.

6.6 Efeito *in vitro* da 7-epi na excreção da Resorufin em vermes adultos de *S. mansoni*

Observou-se que os vermes expostos inicialmente à Resorufin e posteriormente incubados com 16,0 µg/mL de 7-epi, tiveram completa inibição da atividade excretora, caracterizada pelo acúmulo de sonda em outros tecidos que não o sistema excretor (FIGURA 41).

Assim, os resultados demonstraram que a 7-epi foi capaz de interferir na atividade excretora do verme adulto macho e fêmea de *S. mansoni*, atuando, provavelmente, na P-glicoproteína (Pgp).



Figura 41: Marcação dos danos no sistema excretor, pela sonda Resorufim: (A) Verme macho não exposto a 7-epi, Intensa atividade excretora visualizada pela marcação da porção final do sistema excretor. É possível observar o túbulo principal (TP) e o nefridioporo (N). (B) macho exposto a 16,0 ug/mL de 7-epi, a sonda está retida em outros tecidos que não o túbulo excretor. (C) fêmea exposta a 16,0 µg/mL 7-epi

6.7 Efeito *in vitro* da 7-epi sobre o tegumento do verme adulto de *S. mansoni* pela marcação da sonda Hoechst 33258

Para avaliar o dano causado no tegumento, os vermes expostos a 7-epi, foram incubados e posteriormente colocados em contato com a sonda Hoechst 33258.

Os resultados demonstraram que a 7-epi foi capaz de causar lesões no tegumento dos parasitos. As regiões de dano puderam ser observadas pela marcação com a sonda Hoechst 33258 (FIGURA 42).

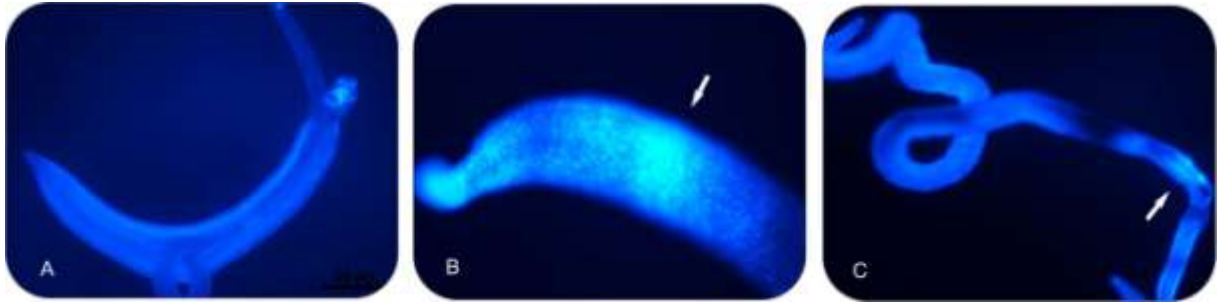


Figura 42: Marcação da sonda Hoechst 33258 (A) Macho e Fêmea acasalado (controle). (B, C) Vermes macho e fêmea expostos a 16,0 µg/mL de 7-epi, é possível visualizar as lesões que estão marcadas com a sonda Hoechst 33258 como indicam as setas.

6.8 Efeito *in vitro* da 7-epi sobre cercárias de *S. mansoni*

As cercárias foram expostas a 5,0; 10,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 150 µg/ mL de 7-epi. Os efeitos da 7-epi sobre cercárias, foram analisadas com base na taxa de perda da cauda (Liang et al., 2009) e alterações morfológica (FIGURA 43). Os registros foram feitos em 5 diferentes momentos 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Tem sido relatado na literatura que cercárias perdem infectividade rapidamente após 12 h (HOLTFRETER et al., 2011).

Por esta razão, a viabilidade das larvas foi avaliada a por até 8 horas O resultado está indicado na Tabela 7.

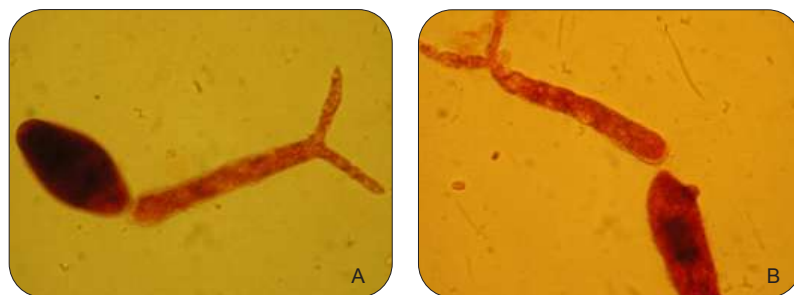


Figura 43 : Alteração morfológicas das cercárias de *S. mansoni* (A) e (B) após contato com a 7-epi *in vitro*. O tratamento com a 7-epi resultou na perda da calda e em uma vacuolização maciça e deformação do corpo.

Tabela 7: Comparação da taxa de perda da calda (%) quando exposto a diferentes concentrações de 7-epi por até 8 horas de incubação.

	Tempo de incubação (hora)				
	1	2	4	6	8
Controle (Água desclorada)	0,0	0,0	2,0	3,4	3,4
Controle (DMSO)	2,0	2,2	2,2	2,4	2,4
Controle (PZQ 12,5 µg/mL)	79,0	86,5	87,9	97,3	99,0
7-epi 5,0 µg/mL	9,0	11,0	12,0	12,0	13,0
7-epi 10,0 µg/mL	25,0	25,0	26,0	30,0	42,0
7-epi 12,5 µg/mL	59,0	71,7	84,4	95,7	98,9
7-epi 25,0 µg/mL	62,0	77,3	95,9	99,3	100,0
7-epi 50,0 µg/mL	64,4	77,3	94,8	97,7	100,0
7-epi 100,0 µg/mL	85,8	94,0	97,3	98,3	100,0
7-epi 150,0 µg/mL	86,2	94,8	96,5	99,0	100,0

Quando expostas a 7-epi as cercárias iniciam um processo de separação das caudas de seus corpos. A taxa de desprendimento da cauda é usada aqui como uma medida de sensibilidade da cercaria a 7-epi. Imediatamente após ser exposto a 10,0 µg/mL de 7-epi, as cercárias permaneceram imóveis. Quando expostas a 12,5 µg/mL 50 % das cercárias sofreram contrações e a perda da calda pode ser notada na primeira hora. Comparação entre cercárias tratadas com 7-epi e as do controle mostraram diferença estatisticamente significativa (FIGURA 44). Cercárias dos grupos controle, não sofreram qualquer dano, até o final da observação (8 horas).

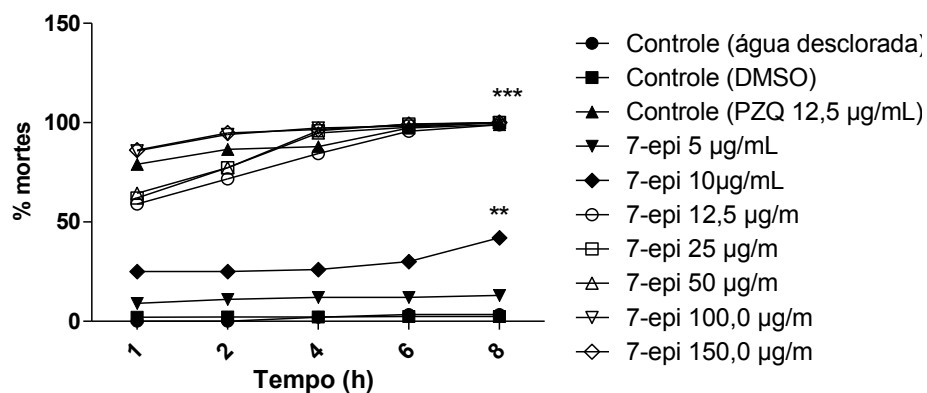


Figura 44: Efeito de diferentes concentrações de 7-epi sobre a viabilidade de cercárias, com base na taxa (%) de perda da calda. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** P<0.0001

6.9 Efeito *in vitro* da 7-epi sobre esquistossômulos de *S. mansoni*

Os esquistossômulos foram expostos a 5,0; 10,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de 7-epi. Os efeitos da 7-epi sobre esquistossomulos foram analisadas com base na taxa de mortes (sem movimento) e alterações morfológicas (FIGURA 45) e foram registradas em 3 diferentes momentos 2, 24 e 48 horas (TABELA 7).

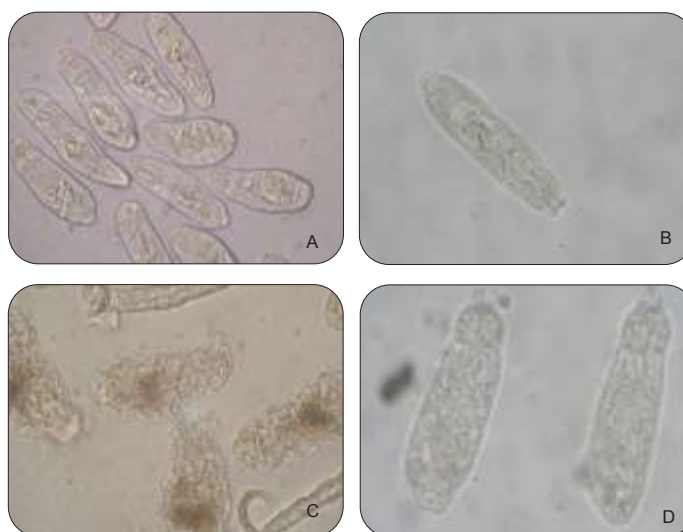


Figura 45: Alterações morfológicas dos esquistossômulos de *S. mansoni* após contato com a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ 7-epi *in vitro*. O tratamento com 7-epi (C, D) resultou em uma vacuolização intensa e deformação do corpo, em comparação com o grupo controle não exposto (A, B).

Tabela 8: Comparação da taxa de mortalidade (%) quando exposto a diferentes concentrações de 7-epi por até 48 horas de incubação.

	Tempo de incubação (hora)		
	2	24	48
Controle (RPMI)	0,0	0,0	0,0
Controle (metanol)	0,0	0,0	0,0
PZQ 12,5 $\mu\text{g/mL}$	61,0	100,0	100,0
7-epi 5,0 $\mu\text{g/mL}$	5,7	7,3	26,0
7-epi 10,0 $\mu\text{g/mL}$	6,3	30,0	55,0
7-epi 12,5 $\mu\text{g/mL}$	7,3	42,0	100,0
7-epi 25,0 $\mu\text{g/mL}$	54,0	100,0	100,0
7-epi 50,0 $\mu\text{g/mL}$	100,0	100,0	100,0
7-epi 100,0 $\mu\text{g/mL}$	100,0	100,0	100,0

Esquistossômulos pertencentes aos grupos controle negativos (RPMI ou RPMI Metanol 0,1 %) mostraram viabilidade normal até 48 horas. Esquistossômulos incubados com

7-epi nas concentrações de 10,0 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não apresentaram ausência total de motilidade, mas evidenciaram uma intensa vacuolização em todo corpo quando incubados por 2 horas.

Concentrações acima de 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causaram total ausência de mobilidade e vacuolização intensa após 24 h de incubação. Para PZQ, a ausência total de mobilidade e grave vacuolização foram observadas nos tempos estudados. Comparação entre esquistossômulos expostos com 7-epi e aos do controle mostraram diferença estatisticamente significativa (FIGURA 46).

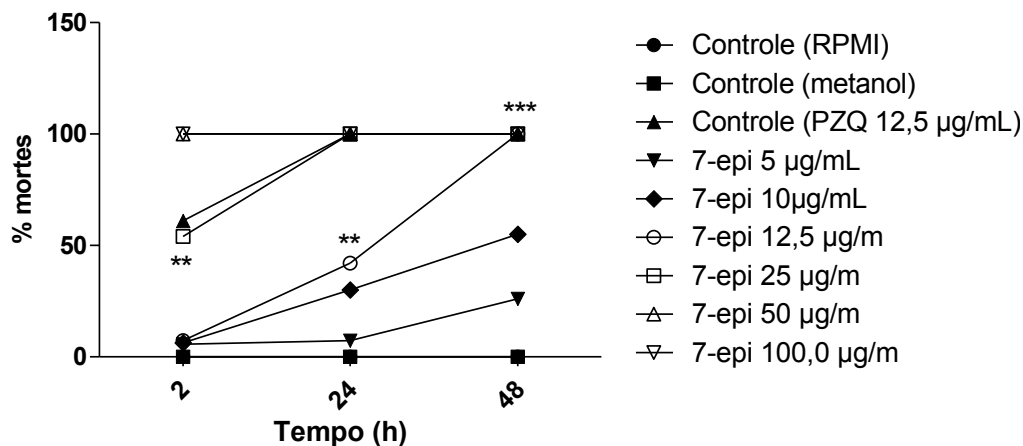


Figura 46: Efeito de diferentes concentrações de 7-epi sobre a viabilidade de esquistossômulos, com base na taxa (%) de perda de movimento. Os dados são apresentados com a média de três experimentos. *** $P < 0.0001$

6.10 Efeitos *in vitro* da 7-epi em associação com o PZQ sobre vermes adultos de *S. mansoni*

O efeito *in vitro* da combinação de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PZQ e diferentes concentração de 7-epi (8,0; 4,0; e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) estão relatadas na FIGURA 47. A associação do PZQ 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 7-epi 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou 91,7 % de mortes enquanto que na monoterapia a porcentagem de mortos foi de 17,2 % e 42,7 % respectivamente. Na associação do PZQ 0,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 7-epi 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a porcentagem de mortes foi de 74,0 % sendo que na monoterapia a porcentagem de mortes foi de 17,2 % e 9,4 %, respectivamente. Na associação PZQ 0,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 7-epi 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a porcentagem de mortes foi de 37,0 % e na monoterapia o de 17,2 % e 0% (FIGURA 52).

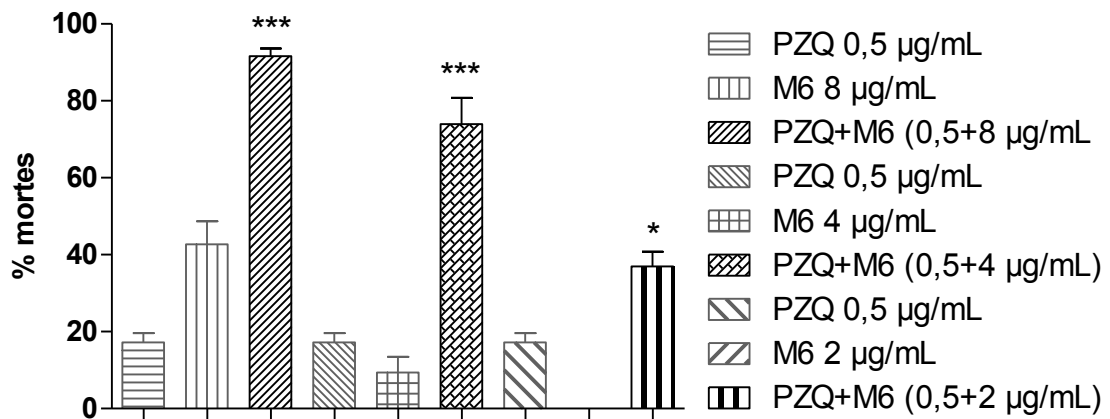


Figura 47: Avaliação da atividade *in vitro* da associação de PZQ 0,50 µg/mL com 7-epi 8,0 µg/mL, 7-epi 4,0 µg/mL, 7-epi 2,0 µg/mL. *** P < 0,0001

O efeito *in vitro* da combinação de 0,25 µg/mL de PZQ e diferentes concentração de 7-epi (8,0; 0,4 e 2,0 µg/mL) estão relatadas na FIGURA 53. A associação do PZQ 0,25 µg/mL / 7-epi 8,0 µg/mL causou 71,9 % de mortes enquanto que na monoterapia a porcentagem de mortes de 7,8 % e 42,7 %, respectivamente. Na associação do PZQ 0,25 µg/mL / 7-epi 4,0 µg/mL a porcentagem de mortes foi de 66,7 % a monoterapia foi de 7,8 % e 9,4 %, respectivamente. Na associação PZQ 0,25 µg/mL / 7-epi 2,0 µg/mL mL a porcentagem de mortes foi de 23,4 % e na monoterapia foi de 7,8 % e 0 %, respectivamente (FIGURA 48).

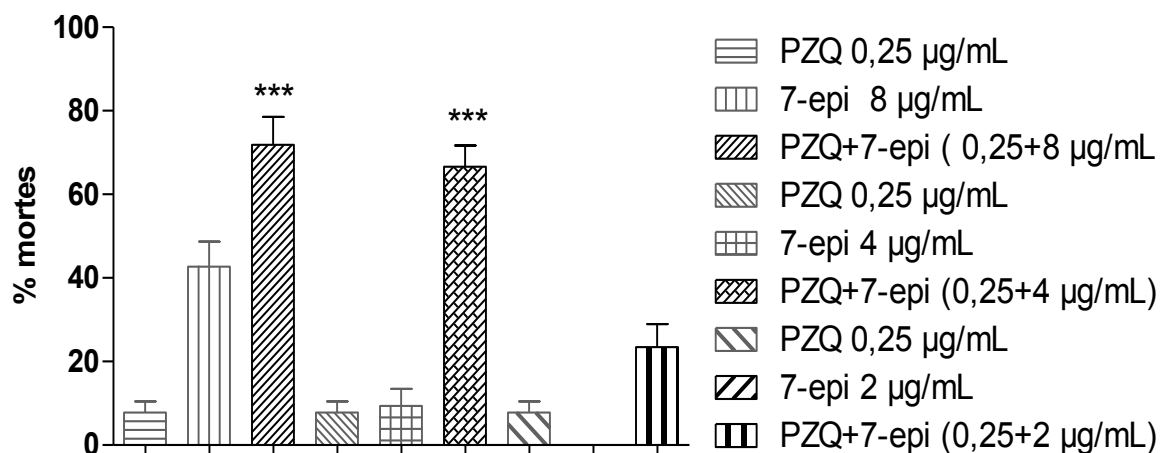


Figura 48: Avaliação da atividade *in vitro* da associação de PZQ 0,25 µg/mL com 7-epi 8,0 µg/mL, 7-epi 4,0 µg/mL, 7-epi 2,0 µg/mL. *** P < 0,0001.

O efeito *in vitro* da combinação de 0,125 µg/mL de PZQ e diferentes concentrações de 7-epi (8,0; 4,0; e 2,0 µg/mL) estão relatadas na Figura 54. A associação do PZQ 0,125 µg/mL / 7-epi 8,0 µg/mL causou 66,7 % de mortes enquanto que a monoterapia foi de 0,52 % 42,7 %, respectivamente. Na associação do PZQ 0,125 µg/mL / 7-epi 4,0 µg/mL a porcentagem de mortes foi de 51,0 % e na monoterapia foi de 0,52 % e 9,4 %, respectivamente. Entretanto a associação PZQ 0,125 µg/mL / 7-epi 2,0 µg/mL não apresentou atividade significativa (FIGURA 49).

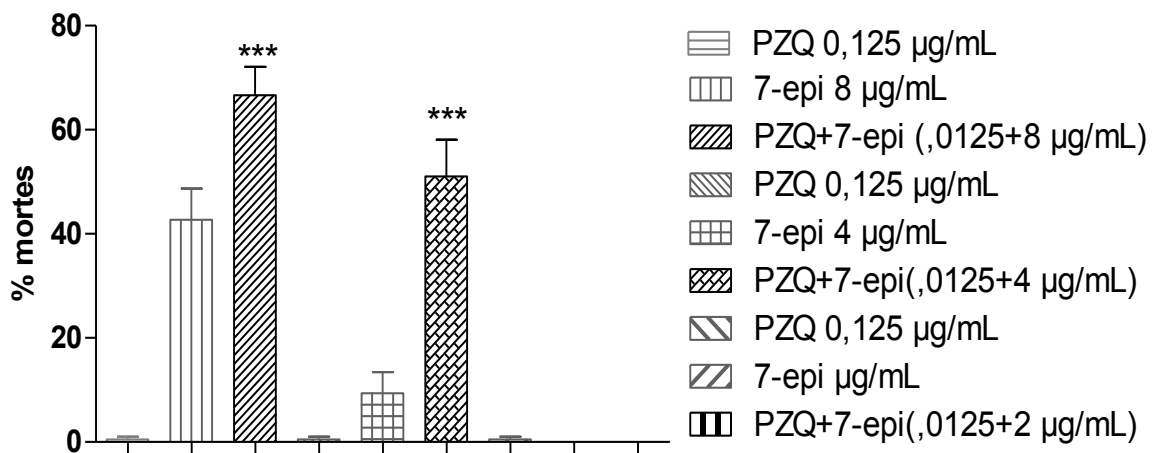


Figura 49: Avaliação da atividade *in vitro* da associação de PZQ 0,125 µg/mL com 7-epi 8,0 µg/mL, 7-epi 4,0 µg/mL, 7-epi 2,0 µg/mL. *** P < 0,0001

6.11 Análise preliminar do efeito *in vivo* da 7-epi isolada e em associação com o PZQ

Os resultados obtidos em camundongos infectados com *S. mansoni* tratados com 400 mg/kg de 7-epi com 1 dose por dia, por 3 dias consecutivos, com início no 45º dia de infecção e também o resultado da associação 400 mg/kg de 7-epiclusianona com 200 mg/kg praziquantel com 1 dose por dia, por 3 dias consecutivos, com início no 45º dia de infecção, por via oral podem ser visto na Tabela 9:

Tabela 9: Resultados obtidos da infecção de camundongos infectados experimentalmente com 100 ± 10 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE), tratados oralmente com 400 mg/Kg/dia de 7-epi isoladamente e em associação com 200 mg/Kg/dia por 3 dias, 40 dias após a infecção. Os camundongos foram sacrificados 15 dias após o final do tratamento.

Tratamento	Número de animais ao final do experimento	Distribuição dos vermes						Número total de vermes recuperados			Oograma
		Mesentério			Fígado			Vivos	Mortos	Vivos + Mortos	
		♂	♀	♂♀	♂	♀	♂♀				
Controle	11	3,0	4,0	23,3	0,2	0,4	0,7	31,6	0,0	31,6	S/A
400 mg/Kg 7-epi	7	3,9	5,6	22,0	0,6	0,9	0,3	33,3	0,0	33,3	S/A
200 mg/Kg PZQ	7	0,2	0,7	2,0	0,1	0,4	0,6	4,0	7,6	11,6	M/M
400 mg/Kg 7-epi + 200 mg/Kg PZQ	5	2,6	3,0	18,0	0,2	0,2	0,8	24,8	2,8	27,6	S/A

♂ - verme macho ♀ - verme fêmea ♂♀ - verme acasalado.

S/A – sem alterações.

M/M – maduros e mortos.

A média de vermes nos animais tratados com 400 mg/Kg de 7-epi foi distribuído da seguinte forma: 31,5 vermes no mesentério, e de 1,8 no fígado. No grupo tratado com PZQ, foram 2,9 no mesentério e de 1,1 no fígado. No grupo tratado com a 7-epi e PZQ, em associação, foi de 23,6 e 1,2 vermes recuperados do mesentério e fígado, respectivamente. Quando os animais foram tratados com PZQ ou com PZQ / 7-epi, as taxas de mortalidade foi uma média de 11,6 e 27,6 respectivamente. Nestes resultados a diferença não foi significativa, o que podemos observar foi que a 7-epi agiu como um antagonista, suprimindo, ou seja, reduzindo a atividade farmacológica do PZQ.

No que diz respeito à alteração no oograma podemos observar que a 7-epi também agiu como antagonista do PZQ.

O grupo de animais tratados com a 7-epi isoladamente, não apresentou mudanças no oograma quando comparado com o controle. Os vermes mortos no fígado, e a distribuição de vermes no mesentério e no fígado foram semelhantes ao do grupo de controle.

7 DISCUSSÕES

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado, dois medicamentos para o tratamento da esquistossomose mansônica: oxamniquina (OXA) e praziquantel (PZQ). No entanto, alguns estudos têm demonstrado a existência de cepas resistentes a esses fármacos, o que pode levar no futuro a um grande problema para o controle e tratamento desta parasitose (KATZ et al., 1973; GUIMARÃES et al., 1979; FALLON; DOENHOFF 1994; ARAÚJO et al., 1996; ISMAIL et al., 1996; COELHO et al., 1997; ISMAIL et al., 1999; BONESSO-SABADINI et al., 2002). Dessa forma, alternativas que busquem o desenvolvimento de novos fármacos possivelmente a partir de recursos naturais vêm sendo estudado (MONA et al., 2011).

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; BOISSIER et al., 2009; BOTROS et. al 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010). E as plantas continuam a ser uma importante fonte de compostos biologicamente ativos que podem fornecer estruturas para o desenvolvimento de novos fármacos (TONUCI et al., 2011). As plantas medicinais têm sido utilizadas em todas as culturas como fonte de medicamento, como base natural para a manutenção de uma boa saúde. Assim, 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).

A flora brasileira é rica em plantas medicinais, a *Guttiferae* é uma família de plantas tropicais dotada de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos como: antraquinonas, flavonóides, xantonas, floroglucinois (BARNES et al., 2001) e benzofenonas (OLIVEIRA et al., 1999), apresentando um elevado potencial para fornecer compostos biocidas (LEE et al., 2003; ABE et al., 2004; BOONSRIA et al., 2006; LENTA et al., 2007a; LENTA et al., 2007b; ALMEIDA et al., 2008).

O presente estudo foi elaborado para avaliar, por meio de um ensaio bioguiado, o potencial esquistossomicida do extrato etanólico do epicarpo de *G. brasiliensis*, e suas frações obtidas por partição em hexano, acetato de etila e água e duas moléculas isoladas das frações, a benzofenona: 7-epiclusianona, e o biflavonóide fukgetina, também chamado

morelloflavona. Este é o primeiro trabalho realizado para testar *in vitro* a atividade esquistossomicida desses compostos.

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* (XIAO et al., 1985; XIAO; CATTO, 1989; WILLIAM et al., 2001; SANDERSON et al., 2002; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; Xiao et al., 2007; DE ARAÚJO et al., 2007; DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2008; BOISSIER et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010).

No presente trabalho, a eficácia do extrato, das frações e das moléculas isoladas, foram avaliados *in vitro* contra vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*. Os parâmetros avaliados foram: (1) o efeito sobre a sobrevivência, (2) o efeito na ovoposição (3) o efeito sobre a atividade motora, (4) as mudanças na superfície tegumentar (5) efeitos sobre a atividade excretora de *S. mansoni*. Todos estes efeitos ocorreram de uma forma dependente da dose. Os efeitos da 7-epi também foram avaliados *in vitro* sobre cercaria e esquistossômulos, onde os parâmetros avaliados foram perda da calda e motilidade respectivamente. Avaliou-se também a associação da 7-epi com o PZQ *in vitro* e os parâmetros analisados foram: (1) o efeito sobre a sobrevivência, (2) o efeito na ovoposição (3) o efeito sobre a atividade motora e (4) as mudanças na superfície tegumentar. Os efeitos dessa associação da 7-epi e do PZQ também foram avaliados em camundongos infectados com *S. mansoni*, sendo analisada a redução de vermes coletados na perfusão.

Os resultados mostram que tanto o extrato como as frações hexânica, acetato-etílica, apresentaram atividade ED₉₀ em torno de 100,0; 68,0 e 97,0 µg/mL, e ED₅₀ 66,0; 51,0; e 61,0 µg/mL respectivamente, porém a fração aquosa não apresentou atividade em 200,0 µg/mL, que foi a maior dose testada (TABELA 4, FIGURAS 37). No que diz respeito, as moléculas isoladas, a fuk não apresentou atividade em 200,0 µg/mL (FIGURA 34), que foi a maior dose testada; já a 7-epi demonstrou atividade esquistossomicida significativa na concentração de 14,0 µg/mL nos ensaios *in vitro* (TABELA 5, FIGURA 38). Nesta concentração foi capaz de matar 100,0 % dos parasitas, com 24 horas de incubação, permitindo chegar ao valor do ED₅₀ em 8,3 µg/mL (FIGURA 39). O valor de ED₅₀ é útil para estabelecer e monitorar a susceptibilidade de drogas e perfis de resistência da cepa do parasita. Em diversos estudos de atividade *in vitro* têm sido observadas as disparidades na susceptibilidade de drogas entre machos e fêmeas de *S. mansoni*. Os machos de *S. mansoni* são muitas vezes mais suscetíveis

do que os vermes fêmeas em estudos de resistência com a oxamniquine (CIOLI et al., 1995) e em estudos que avaliaram a bioatividade do extrato de gengibre (SANDERSON et al., 2002). Em contraste, os resultados com outros compostos, tais como ácidos aminoalkanethiosulfuric (DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2008) e 2-(butilamino)-1-fenil-1-ethanethiosulfuric ácido (DE ARAÚJO et al., 2007), praziquantel (BASSILY et al., 1985) mostraram maiores taxas de sobrevivência para os machos do que para as fêmeas. Notavelmente, os dados *in vitro* obtidos no presente estudo demonstraram que tanto o extrato quanto a fração hexânica, acetato-etílica e a molécula isolada 7-epi exibiram uma melhor atividade contra vermes adultos machos de *S. mansoni*. Com efeito, a 7-epi foi mais eficaz nos vermes machos, apresentando 100,0 % de letalidade após 24 horas de incubação com 10,0 µg/mL de 7-epi quando comparado com vermes fêmeas, que apresetaram 100,0 % de letalidade após 24 horas de incubação com 16,0 µg/mL de 7-epi.

No que diz respeito à aptidão reprodutiva dos vermes adultos de *S. mansoni*, componentes de outras plantas têm mostrado efeitos sobre a ovoposição do verme. Por exemplo, a curcumina, extraída do rizoma de *Curcuma longa* (MAGALHÃES et al., 2009), e alguns derivados floroglucinol, obtidos a partir dos rizomas da espécie *Dryopteris* (MAGALHÃES et al., 2010), apresentaram efeitos *in vitro* sobre a postura de ovos. Uma diminuição na oviposição também foi observada usando *Nigella sativa* (MOHAMED et al., 2005) e o extrato do rizoma de gengibre (*Zingiber officinale*) (SANDERSON et al., 2002). No presente estudo observou-se atividade na incubação de vermes adultos de *S. mansoni* com o extrato etanólico e as frações hexânica e acetato-etílica em doses superiores a 40,0 µg/mL (FIGURAS 23, 27 e 31) e a 7-epi em doses superiores a 4,0 µg/mL (FIGURA 40). Nesta situação, os vermes adultos, macho e fêmea, mantiveram separados; o que impediu o processo de acasalamento e oviposição. Em contraste, em doses inferiores a 50,0 µg/mL para os extratos e frações e 4,0 µg/mL para a 7-epi os vermes permaneceram acasalados e houve ovoposição.

Do mesmo modo, também foram observadas graves alterações morfológicas tegumentares que ocorreu 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 10,0 µg/mL para a 7-epi. A análise por microscopia revelou danos progressivos sobre a superfície, provocando bolhas e desprendimento no tegumento. As alterações na superfície do tegumento apresentaram um efeito dependente da dose. Esses danos tegumentares foram semelhantes aos relatados em estudos com praziquantel (WILLIAM et al., 2001). Assim, o dano tegumentar

ocorreu 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).

Os danos tegumentares foram mais pronunciados nos vermes adultos machos do que nas fêmeas de *S. mansoni*. Lesões graves no tegumento foram relatadas em vermes adultos fêmeas de *S. mansoni*, quando tratados com artemether (XIAO et al., 1985, 2000). Os vermes machos do grupo praziquantel foram mais suscetíveis à ação tegumentar do que fêmeas. O tegumento é extremamente importante para o sucesso da infecção e sobrevivência no hospedeiro, e tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de medicamentos esquistossomicidas. Portanto, a maioria dos medicamentos usados atualmente contra a esquistossomose, como Praziquantel (SHUHUA et al., 2000, WILLIAM et al., 2001), Mefloquina (MANNECK et al., 2010) e Artemeter (XIAO et al., 2000), agem através do dano no tegumento do verme.

Os danos no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* foi confirmador pela sonda Hoechst 33258 que é um marcador específico para o DNA das células. A sonda Hoechst 33258 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). O resultado desse experimento com o marcador fluorescente demonstrou que 16,0 µg/mL de 7-epi *in vitro* foi capaz de lesar o tegumento dos parasitas, sendo que nos machos essas lesões foram mais pronunciadas que nas fêmeas de *S. mansoni* (FIGURA 42).

Os mecanismos pelo quais o extrato, as frações e a 7-epi exercem seus efeitos sobre o tegumento ainda não foram elucidados. Curiosamente, *in vitro* os efeitos do extrato, das frações e da 7-epi em vermes adultos de *S. mansoni* não têm uma correlação entre a função muscular (atividade motora) com o dano no tegumento. Em outras palavras, a indução de alterações letais tegumentares requer concentrações mais baixas do extrato, das frações e da 7-epi do que a requerida para provocar paralisia muscular seguido de morte.

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, a qual por sua vez é um substrato da P-glicoproteína (Pgp). Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que 14,0 µg/mL de 7-epi foram capazes de paralisar a atividade excretora dos vermes adultos de *S. mansoni*. Tal fato pôde ser

observado pela marcação dos parasitos com a sonda Resorufin anteriormente a exposição com 7-epi. A 7-epi impediu a saída da sonda (substrato da P- glicoproteína - Pgp) para o meio externo (FIGURA 41). Assim, sugere-se pela primeira vez, que de alguma forma a 7-epi, atue no sistema excretor, interferindo na atividade da Pgp. O mesmo resultado foi observado por Sato et al. (2002) na presença da amilorida (inibidor da bomba de Na⁺ e da Na⁺/H⁺ + ATPase).

Algumas hipóteses, porém, podem ser consideradas para justificar os resultados encontrados no presente estudo: a) é possível que a 7-epi atue na depleção de energia, através do aumento do influxo de cálcio para os tecidos, levando a um consumo excessivo de ATP, o que poderia vir a inibir a Pgp; b) a 7-epi pode atuar como um substrato inibidor competidor da Pgp; c) a 7-epi pode-se ligar diretamente a Pgp, perturbando a excreção da Resorufin; d) a 7-epi pode atuar, indiretamente, na excreção da Resorufin, afetando os fosfolípidios da membrana tubular, fazendo com que a sonda se disperse para outros locais que não o sistema excretor (HARDER et al., 1988), ou ainda; e) a simples contração induzida pela 7-epi, provocaria um retardo na excreção da sonda devido a ausência de um fluxo de conteúdo intestinal, proveniente da motilidade do órgão excretor. Assim, a sonda teria maior possibilidade de se difundir para os tecidos circunjacentes.

No presente estudo, utilizou-se a perda da motilidade e a perda da cauda como uma medida para avaliar a sensibilidade das cercarias quando incubadas com 7-epi. O mecanismo exato da indução da perda da cauda não é totalmente compreendido. Acredita-se que o processo está relacionado com uma estrutura especial entre o corpo e a cauda das cercárias. A extremidade posterior do corpo da cercarias é afunilada numa dobra como se fosse uma coleira sobre uma peça estreita que liga o corpo a cauda. Esta peça de ligação é delicada e pode ser facilmente quebrada (LIANG et al., 2009). Quando as cercarias foram incubadas com 12,5 µg/mL de 7-epiclusinona, após 2 horas estavam imóveis e com 8 horas de incubação a separação das caudas de seus corpos ocorreram em 99,0 % das análises (FIGURAS 43 e 44 e TABELA 7), enquanto que nos grupos controles (água desclorada; e água desclorada + 0,1 % de DMSO) as cercarias nadavam livremente e não foi observado perda da cauda, por até 8 horas de observação.

O efeito da incubação com diferentes concentrações de 7-epi sobre a viabilidade de esquistossômulos por até 48 horas está representada na Figura 51 e na Tabela 8. Na ausência da droga, esquistossômulos mostraram viabilidade normal, sem qualquer alteração morfológica por até 48 h. Ligeiras alterações morfológicas, tais como granularidade, encurtamento do corpo com uma forma falciforme e atividade reduzida, foram observadas

após 24 h de incubação com 10,0 µg/mL de 7-epi. A incubação com doses mais elevadas, na concentração de 12,5 µg/mL os esquistossômulos perderam o movimento em 48 horas de incubação nas doses de 25,0 µg/mL a perda do movimento ocorreu com 24 horas de incubação e nas doses de 50,0 µg/mL a perda do movimento foi observada com 2 horas de incubação. Contudo, nas doses de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, graves alterações morfológicas, tais como a granulações escuras, associados a uma redução nos comprimentos foram vistos nas duas primeiras horas. Estes efeitos foram semelhantes aos observados com esquistossômulos incubados com mefloquina em 15,0 µg/mL (MANNECK et al., 2010) e com 100,0 µg/mL de óleo essencial de *Piper cubeta* (MAGALHÃES et al., 2012).

Devido ao forte efeito biocidas da 7-epi *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*, investigamos seu efeito sinérgico quando estes foram expostos com a associação do PZQ/7-epi usando combinações inferiores as suas DLs₅₀, 0,5; 0,25; 0,125 para o PZQ e 8,0; 4,0; 2;0 µg/mL para a 7-epi, sendo que o parâmetro avaliado na associação foi a porcentagem de vermes mortos. Na associação usando 0,5 µg/mL de PZQ / 8,0 µg/mL 7-epi a taxa de mortes foi de 91,7 %, para efeito de comparação, a monoterapia forneceu uma taxa de morte de 17,2 % para o PZQ 0,5 µg/mL e 42,7 % para 7-epi 8,0 µg/mL $(17,2 + 42,7) / 2 = 29,95$ %. Quando a associação usada foi PZQ 0,5 µg/mL/7-epi 4,0 µg/mL a taxa de mortes foi de 74% enquanto na monoterapia foi de 17,2% e 9,4% respectivamente $(17,2 + 9,4) / 2 = 26,6$ % e na associação de PZQ 0,5 µg/mL/7-epi 2 µg/mL a taxa de morte foi de 37,0 % a monoterapia foi de 17,2 % e 0 % $(17,2 + 0) / 2 = 8,6$ %, o resultado dessas 3 combinações entre PZQ/7-epi demonstram um efeito aditivo quando comparados com a monoterapia (FIGURA 47). Quando a combinação foi de PZQ 0,25 µg/mL/7-epi 8,0 µg/mL a taxa de morte foi de 71,9 % e na monoterapia foi de 7,8 % e 42,7 % respectivamente $(7,8 + 42,7) / 2 = 25,25$ %, na combinação de PZQ 0,25 µg/mL/7-epi 4,0 µg/mL a taxa de morte foi de 66,7 %, e na monoterapia foi de 7,8 % e 9,4 % respectivamente $(7,8 + 9,4) / 2 = 8,6$ %, o resultado duas combinação demonstram estatisticamente um efeito aditivo, contudo na associação PZQ 0,25 µg/mL/7-epi 2,0 µg/mL a taxa de mortes foi de 23,4 % e na monoterapia foi de 7,8 % e 0 %, respectivamente, essa associação não apresentou estatisticamente atividade aditiva (FIGURA 48). Na associação PZQ 0,125 µg/mL/7-epi 8,0 µg/mL ocorreram 66,7 % de mortes enquanto que na monoterapia a porcentagem de mortes de 0,52 % e 42,7 % respectivamente $(0,52\% + 42,7\%) / 2 = 21,6$ % e na associação de PZQ 0,125 µg/mL/7-epi 4,0 µg/mL a taxa de morte foi de 51,0 % e a monoterapia foi de 0,52 % e 9,4 % $(0,52 + 9,4) / 2 = 4,96$ %. Essas 2 associações resultaram estatisticamente um efeito aditivo, entretanto a

associação PZQ 0,125 µg/mL/7-epi 2,0 µg/mL não apresentou atividade significativa (FIGURA 49). Resultados semelhantes foram demonstrado por Portela et al., 2012 onde testes *in vivo* foram realizados para avaliar os efeitos da associação de PZQ e trioxaquine onde a redução na carga de vermes foi de 73% quando comparadas com a monoterapia que foi de 24% e 18%, respectivamente, $(24 + 18) / 2 = 21\%$ o que confirma o efeito aditivo ou sinérgico dessa associação.

A atividade esquistossomissida (TABELA 9) da 7-epi isolada e em associação com o PZQ que foi observada *in vitro* não foi reproduzida nos testes *in vivo*, utilizando os esquemas de dosagens descritas. O composto ativo, 7-epi, por conseguinte, não conseguiu alcançar os vasos sanguíneos mesentéricos em concentrações que seria suficiente para matar os vermes adultos. Isto provavelmente se deve a combinação de fatores, tais como dose inadequada, degradação pelo ácido gástrico ou enzimas digestivas do trato alimentar, má absorção através da parede intestinal, adsorção de proteínas do soro, metabolismo de primeira passagem no fígado e outros órgãos ou a alta lipofilicidade desse composto o que dificulta a solubilidade do mesmo em um solvente adequado para administração oral. Ainda, não é claro até que ponto esses fatores contribuíram para o fracasso desse composto em alcançar concentrações séricas suficientes para que o composto ativo conseguisse alcançar os vasos mesentéricos e portal.

Mesmo que tais ensaios não apresentaram atividade efetiva, o fato é que este composto teve uma atividade significativa nos teste *in vitro* o que justifica novas alternativas para garantir que a 7-epi chegue até o habitat do parasita, *in vivo*. Isto poderia ser feito através da adaptação da formulação ou modificando a próprias moléculas que lhes permitam superar as barreiras de permeabilidade. 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).

Foi relatado que a atividade biológica de um composto pode ser aumentada pelo aumento do número de resíduos de prenila ligados (AGA et al., 1994; MARCUCCI et al., 2001; ZHURAVLEVA et al., 2012; MONCLA et al., 2012; SASAKI et al., 2012). Na elucidação da relação estrutura atividade no presente estudo, determinou-se que a atividade aumenta proporcionalmente com o número de grupos prenilas, ou seja, proporcionalmente a lipofilicidade. Como descrito por Urzúa et al (2008), Pereira et al (2010), Mazák et al (2011) a lipofilicidade mostrou ser uma variável importante que pode ser um fator importante na

atividade biológica. Assim, a 7-epi, o composto mais lipofílico foi a que apresentou melhor atividade *in vitro* em vermes adultos de *S. mansoni*. A fuk é menos lipofílica; o que pode ser uma justificativa para essa molécula não apresentar atividade biológica sobre vermes adultos de *S. mansoni in vitro*, talvez, devido à sua dificuldade em atravessar as barreiras, ou seja, o tegumento do parasita.

8 CONCLUSÕES

1) Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a ação *in vitro* do extrato etanólico de *G. brasiliensis* e de suas frações obtidas por partição as frações acetato de etila e hexânica e da molécula isolada 7-epi em verme adulto de *S. mansoni*, causando paralisia total dos machos e fêmeas, sendo os machos mais suscetíveis do que as fêmea, efeito sobre a aptidão reprodutiva e extensas alterações morfológicas no tegumento do parasita foram observados. Enquanto que na fração aquosa e na molécula isolada fukugetina esses efeitos não foram observados.

2) A 7-epi interferiu na atividade excretora, inibindo a excreção da Resorufin, e provocou graves lesões no tegumento dos parasitas o que pode ser observado pela marcação da sonda Hoechst 33258

3) A 7-epiclusianona foi ativa contra cercarias causando perda da cauda e paralisa.

4) Em esquistossômulos a 7-epi provocou graves alterações morfológicas, tais como granulações escuras associadas a uma redução do comprimento e perda do movimento.

5) Os testes *in vitro* para analisar o efeito do sinergismo da 7-epi em associação ao praziquantel em vermes adultos de *S. mansoni* se mostraram eficientes quando comparadas aos tratamentos com as substância empregadas isoladamente.

6) No entanto, com os esquemas terapêuticos utilizados experimentalmente em camundongos infectados, não foi possível detectar qualquer atividade contra *S. mansoni*, quando a 7-epi foi administrada isoladamente ou em associação com o praziquantel. Os efeitos sinérgicos não foram observados devido a essa associação provavelmente devido à alta lipofilicidade dessa substância. Entretanto, nos testes *in vitro* este composto apresentou uma atividade significativa o que justifica ensaios posteriores que serão realizados tendo como abordagem a mudança da lipofilicidade da 7-epi nos ensaios esquistossomicidas *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F. G. C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: Possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p.145-148, nov. 2006.
- 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.
- AGA, H. et al., Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci. Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, p. 945–946, 1994.
- 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.
- 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 oxamniquina e praziquantel e não curados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 467–476, 1996.
- ARAÚJO, N. et al, Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 781-785, 2008.
- ARAÚJO, N. et al, Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 450-454, 2008.
- 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 goyasensolides 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 Parasitenkd**, v. 63, p. 113-128, 1980.

BINA, J. C. & SPINOLA, A. Convulsão associada ao uso de oxamniquine. 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.

BOISSIER, J. et.al. *In vitro* activities of trioxaquinones against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4903-4906, 2009.

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

BONESSO-SABADINI, P.I.P.; DIAS, L.C.S. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine 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 oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 86–89, 1989.

BOTROS, S.S, et al. Antischistosomal activity of hexadecyloxypropyl cyclic 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine 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.

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 14 jun. 2012. **Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener** <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/index.html>

BURKE, M. L. et.al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p.163-176, 2009.

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 oxamniquine 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

CAMPOS, R. et al. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquantel. II– observações experimentais relativas à fase patente. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 44, p. 111 – 114, 1989.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmed**, Ribeirão Preto. 2004.

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

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, ago. 2004

CHEN, H. J. et al. Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2373, 2006.

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

CIOLI, D.; PICA MATTOCCIA L.; MORONI, R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine 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 & 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, P.M.Z.; LIMA, F.C.S.; NOGUEIRA, J.A.M. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 101-106, 1997.

COELHO, L. P. et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 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.

CREASEY, A. M.; TAYLOR, P.; THOMAS, J.E.P. Dosage trial a combination of oxamniquine and praziquantel in the treatment of schistosomiasis in Zimbabwean schoolchildren. **Central European Journal of Medicine**, v. 32, p. 7, p.165–167, 1986.

CRUZ, A. J. et al., Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on rat aorta. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 442-445, 2006.

CUI, J. et al. New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 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 ativos 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, p. 307-315, 2007.

DELGADO, V.S. et al. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and both sexes of the parasite. **The Journal Parasitology Research**, v. 78, p. 648–654, 1992.

DE OLIVEIRA PENIDO, M.L. et al. Antischistosoma activity of aminoalkanethiols, alkylaminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica**, v. 108, p. 249–255, 2008.

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, set. 1983.

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

DEROGIS, P. B. et al. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 278-282, 2008.

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.

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 oxamniquine 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.

FARANI, P. S. G. et al. Analysis of the *in vitro* potential schistosomicidal of the Candeia. In: 12 ° **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS**, Rio de Janeiro, 2010.

FARID; Z. et al. Combined praziquantel – oxamniquine treatment of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 807, 1990.

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

FENWICK, A. et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 509-515, 2003.

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

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.

GOMES, E. et al. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema valley - Ourinhos. **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS**, v. 4, p. 51, 1993.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230-1235, 2012.

GRYSHECK, R.C.B.; CARVALHO, S. A.; AMATO-NETO, V. Eficácia e tolerabilidade da associação oxamniquine 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. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p.1106-1118, 2006.

GUIMARÃES, R. X. et al. Resistência ao hicanthone e oxamniquina em doentes com esquistossomose forma clínica hepatointestinal. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v. 25, p. 48–50, 1979.

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, fev. 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.

HARDER, A. et al. Influence of praziquantel and Ca²⁺ on the bilayer- isotropic hexagonal transition of model membranes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 29, p. 55 – 60, 1988.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitology Research**, v. 88, n. 5, p. 395-397, 2002.

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, set.-out. 2003.

HOLTFRETER, M. C. et al; *Schistosoma mansoni*: schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 270–276, 2011.

ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 214–218, 1996.

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**, p. 191-199, 2002.

JATSA, H.B. et al. Evaluation of the *in vivo* activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines** , v. 6, n. 3, p. 216-221, 2009.

JATSA, H.B., et al; Biological activity of sida pilosa plant extract on *Schistosoma mansoni*. In: **12 ° INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS**, Rio de Janeiro, 2010

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 & Emerging Technologies**, v.7, n.3, p.246-250, set. 2006.

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

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

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p, 10129–10134, 2008.

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. 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 oxamniquine 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. & ALMEIDA, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. **Ciências e Cultura**, v. 55, n.1, São Paulo Jan./Mar 2003.
- KATZ, N., & COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of *Schistosomiasis mansoni*: The brazilian contribution. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 72-78, 2008.
- KING, H. C.; DICKMAN, K.; TISCH, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**; v. 365, p. 1561-1569, 2005.
- KINOTI, G.K.; COL, G.C. Defining resistance in *Schistosoma*. **Parasitology Today**, v. 13, p. 157-158, 1997.
- 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 oxamniquine 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 praziquantel-resistant 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 cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, v. 84, p. 202-207, 2009.

- LIM, K. H. et al. Effects of Anti-inflammatory Biflavonoid, Ginkgetin, on Chronic Skin Inflammation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1046, 2006.
- 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.
- LIN, Y. M. et al. *In Vitro* Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.
- 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.
- MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 110, n.5, p. 1747-1754, 2012.
- MAHMOUD, M. R., BOTROS, S. S. Artemether as adjuvant therapy to praziquantel in murine Egyptian *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 9, p. 175–178, 2005.
- MAHRAN, M. A. et al. 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.
- MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105–112, 2001.
- 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. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 3, p. 1230-1239, 2009.

MAZÁK, K.; KÖKÖSI, J.; NOSZÁL, B. Lipophilicity of zwitterions and related species: A new insight. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1-2, p. 68-73, 2011.

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, jun. 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.

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, Apr. 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.

MONCLA, B. J. et al. The inhibitory activity of typified propolis against enterococcus species. Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C. **Journal of Biosciences**, v. 67, n. 5-6, p. 249-256, 2012.

MORAES J. et al. Schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. In: **12° INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS**, Rio de Janeiro, 2010.

MORTON, J. Fruits of warm climate. Miami: Julia F. Morton, 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 Medicinal 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, ago. 2002.
- NEVES, J.S., et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenyl-475 lated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 73, p. 644-649. 2007
- OLIVEIRA, C. M. A. et al. Two polyisoprenylated 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. **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.
- PANG, X., et al. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting rho GTPases and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 518-525, 2009.
- PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, mai. 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.* 1956; 8: 589-597
- PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C.A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. 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.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and Medicinal Plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- 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, jan./fev. 2002.
- PORTELA, J. et al. Antischistosomal activity of trioxaquines: *in vivo* efficacy and mechanism of action on *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, art. n° 1474, 2012.
- 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
- RANG, H. P. et al. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- PRATA, A. et al. Tratamento da esquistossomose pela oxamniquine em dose única. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 127–136, 1975.
- PUGH, R. N. H.; TEESDALE, C. H. Synergy of concurrent low dose oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. **British Medical Journal**, v. 287, p. 818, 1983.
- RAMALHO-PINTO, et al. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 36, p. 360–372, 1974.
- 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 & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, jan. 2004.
- REDMAN, C. A. et al. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitology Today**, v. 12, n. 1, p. 14-20, 1996.
- RIBEIRO, F. et al. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 116, p; 229-236, 1998.
- RODOLPHO J. M. A. et al. Inhibitory effects of *Harpagophytum procumbens* on disposal of eggs during infection with *Schistosoma mansoni*. In: **12° INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS**, Rio de Janeiro, 2010.
- SANDERSON, L.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P. J. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**, v. 76, p. 241–247, 2002.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, 280-285, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. 7-epiclusianone, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 2, p. 200-205, 2012.

SANTOS, M. H. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr. e aplicações biológicas dos seus constituintes**. 1996. Dissertação (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, set./out. 1999.

SASAKI, H. et al. Prenylated flavonoids from *Desmodium caudatum* and evaluation of their anti-MRSA activity. **Phytochemistry**, v. 82, p. 136-142, oct. 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.

SCOPARO, C. T. et al. Analysis of camellia sinensis green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion×reversed phase). **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 29-37, 2012.

SHAW, J. R.; BRAMMER, K. W. The treatment of experimental schistosomiasis with a combination of oxamniquine and praziquantel. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 39-40, 1983.

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.

SIMÕES L.F. **Efeito do Extrato de *Piper tuberculatum* sobre o *Shistosoma mansoni* da linhagem BH**. 2009. 37p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Biologia)- Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

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.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I.S. Validation of chromatographic methods. *Pharmaceutical Technology*, v. 22, p.104-120,1998.

STELMA, F. F. et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, n. 2, p. 167-70, 1995.

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.

URBANI, C.; ALBONICO, M. Anthelmintic drug safety and drug administration in the controlo f soil-transmitted helminthiasis in community campaigns. *Acta Tropica*, v. 86, n. 2-3, p. 215-21, 2003.

URZÚA, A. et al. Antibacterial properties of 3 H-Spiro[1-benzofuran-2,10-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules*, v. 13, p. 2385–2393, 2008.

UTZINGER, J. et al. The potential of artemether for the control of schistosomiasis, *International Jornal 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.

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 morfologica distribuicion, producion y comercializacion del achachairu (*Rhedia spp.*) en Santa Cruz de la Sierra.** Santa Cruz de la Sierra: Universidad Autonoma "Gabriel Rene Moreno", Faculdade de Ciencias 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.

WILSON, M.S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology & Cell Biology*, v. 85, p. 148–154, 2007.

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/> [accessedo 11 de junho 2012].

BRASIL. Ministerio da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs/>. Acesso em 16 de novembro de 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.

WYNN, T.A. et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 156–167, 2004.

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. 1130–1137, 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**, 79: 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, abr. 2006.

ZHURAVLEVA, O. I. et al. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* blochwitz. **Phytochemistry**, v. 80, p. 123-131, 2012.

ZWINGENBERGER, K. et al. H. Efficacy of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs in *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, p. 305–311, 1987.