

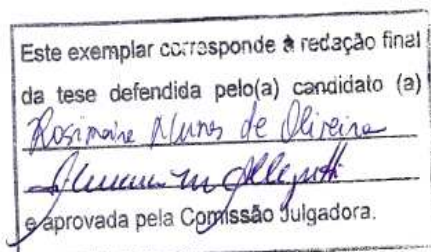
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ROSIMEIRE NUNES DE OLIVEIRA



**Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less)
DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de
*Schistosoma mansoni***



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

OL4e Oliveira, Rosimeire Nunes de, 1981-
Efeito esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less)
DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de
Schistosoma mansoni / Rosimeire Nunes de Oliveira. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Baccharis trimera*. 2. Extrato diclorometânico.
3. Óleo essencial. 4. Esquistossomose mansônica -
Tratamento. 5. *Schistosoma mansoni*. I. Allegretti,
Silmara Marques, 1963-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of antischistosomal *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* and
in vivo on adult worms of *Schistosoma mansoni*

Palavras-chave em Inglês:

Baccharis trimera

Dicloromethane extract

Essential oil

Mansonic schistosomiasis – Treatment

Schistosoma mansoni

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Mestre em Parasitologia

Banca examinadora:

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo

Marili Villa Nova Rodrigues

Data da defesa: 23-02-2012

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

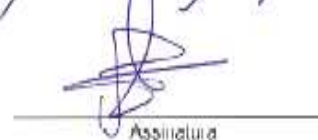
Campinas, 23 de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo


Assinatura

Profa. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada “**Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni***”

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

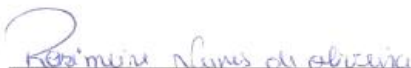
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

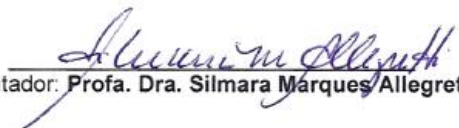
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. **2170-1**- Instituição:
Universidade Estadual de Campinas- Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

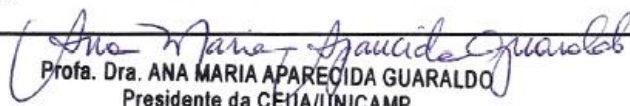

Aluno: **Rosimeire Nunes de Oliveira**


Orientador: **Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti**

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Dedico,

A minha mãe, Josefa. Minha vida, minha base, meu tudo.... que sempre me ensinou a seguir os caminhos do bem e nunca desistir dos meus sonhos. Minha formação e caráter são graças a você, Mãezinha, que me gerou com muito amor e sempre me incluiu em todas as suas orações pedindo proteção a Deus! Foi difícil superar a saudade... mas, a fé em Deus me fez superá-la !! Se não fosse por você, eu não estaria aqui, realizando esse sonho!

Te Amoo !!!

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e pela oportunidade que me foi dada em conseguir chegar até aqui, e seguir o meu caminho mantendo a minha fé e me fazendo superar todos os momentos de provação e dificuldades, principalmente a saudade de casa e da minha família amada!!

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pela orientação, amizade, cumplicidade, por todo carinho e confiança depositada em mim, pelo exemplo profissional e ético, por todos os ensinamentos, conselhos e palavras que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente! Meu muito e sincero obrigado! Admiro-te muito!!!

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Veronica de Lourdes Sierpe Jeraldo, Profa. Dra. Marilli Villa Nova Rodrigues e Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pelas importantes considerações e sugestões, as quais me auxiliaram a aprimorar este estudo.

À Profa. Dra. Vera Garcia Rehder, uma pessoa iluminada que me recebeu de braços abertos no CPQBA. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelas palavras, pelo carinho e apoio que sempre recebi todo esse tempo que passei com você!

À profa. Dra. Veronica Sierpe jeraldo por ter despertado em mim, o interesse pela pesquisa, e por ter sido o "elo" de ligação para realização desse sonho! Você sempre será meu exemplo de Mestre Amiga, obrigada pelas palavras nos momentos mais difíceis, pelos conselhos e por acreditar que sou capaz! Sempre serei grata por tudo! Parte dessa vitória é tua!!!

À profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, que eu amo de paixão! Um ser especial por quem tenho uma imensa consideração e respeito! Obrigada por me acolher, por sempre ter uma palavra amiga para me confortar nos momentos em que eu achei que não iria conseguir! Além disso, obrigada pelos chocolatinhos!! rsrs.

Ao prof. Dr. Rubens Madi, pelo carinho, amizade e por todo apoio que recebi quando cheguei ao Laboratório de Helminologia (L3), muito obrigada!

À profa. Dra. Mara Cristina Pinto, pela ajuda e disposição em todos os momentos que sempre precisei, obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, pela ajuda nas análises estatística e pelos seus ensinamentos.

Ao prof. Dr. Ílio Montanari Junior, da divisão de Agrotecnologia do CPQBA - Unicamp, por ter cedido a *Baccharis trimera* (Less) DC. e pelos seus ensinamentos, obrigada!

A todos os professores das disciplinas do Curso de Parasitologia, pelos seus valiosos conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos do Laboratório de Helminologia (L3) de modo especial, ao João Batista, que me acolheu quando cheguei, passando seus ensinamentos e técnicas parasitológicas, pela amizade e carinho, muito obrigada "Jones", sem você, tudo seria mais difícil !!!!

À técnica e amiga, Letícia Duarte Bastos que sempre me deu forças, sempre esteve do meu lado com uma palavra amiga... obrigada por tudo, "pequena", te adoro!!!!

As Amigas do "Schisto", Claudineide Oliveira (Clau) e Tarsila Frezza (Tarta) que me receberam de braços abertos no Laboratório, obrigada pelos primeiros ensinamentos nos testes *in vitro* e *in vivo*, com *S. mansoni*, por sempre estarem

do meu lado quando precisei, pelo apoio, carinho, pelas risadas e pela amizade nesses dois anos de caminhada... Adoro Vocês, suas xaropes!!!!

Aos demais amigos (as) que fazem parte do Laboratório de Helminologia (L3), Maria Isabel (Bella), Michele Santos (Mii), Júlia Molina (Moli), Anna Karolina, (Karol) Maria Francisca (Kika), Luciana, Eliana Camargo, Camila, Cíntia e ao amigo Lincoln, por todos os momentos que passamos juntos (as), durante essa caminhada, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e muitas risadas ... vocês sempre serão especiais!!!

A todos os amigos (as) que fazem parte da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA- Unicamp, em especial, a amiga Adriana da Silva Santos Oliveira (Drii), pelos ensinamentos nas preparações dos extratos, frações e cromatografias. Pela paciência e por toda atenção e disponibilidade que sempre recebi. Querida, obrigada! Te Adoro !!!

A todos que fazem parte do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (LMEV) em especial, a Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, e as técnicas, Adriane Cristina Sarti Sprogis e Antônia Maria Ferreira Lima, pelos ensinamentos durante os procedimentos de Microscopia eletrônica.

Aos meus pais, Josefa Nunes e Antônio Nunes, pelo exemplo de amor, responsabilidade, dignidade e cumplicidade. Vocês são meu tudo!!! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Denise Nunes, Reginaldo Nunes, Maria José Nunes, Carmem Nunes, Hellen Nunes, Reinaldo Nunes, Fábio Nunes e José Antônio Nunes. Agradeço pelo carinho, paciência e atenção que sempre me dedicaram, por nunca deixar me faltar nada e por serem pessoas maravilhosas as quais tenho muito orgulho... Amoo vocês!!!

Aos meus sobrinhos lindos que amo de paixão, Layla, yanne, yasmin, yngrid, Marielly, Kaio Phillipe, Gabriel, Francisco, Hugo Vinícius, Guilherme, Pedro

Henrique, e ao "Julinho", vocês fazem meus dias mais felizes, amo vocês!!!! Aos meus cunhados (a) Cleudivan, Valmir, Jackline, karol, Nília, Maria José e Pedro, pelo carinho que sempre recebi de vocês... pelo incentivo... Obrigada por tudo!!!

As minhas amigas de longos anos, Daniela Felix, Andreza Lima, Majane Marques, Michelle Fraga, Lorena Lima, Míriam, Tatiana Peixoto, Tainan Peixoto, Gicélia Peixoto e Luiza Rosa. Ao amigo Basílio e ao meu primo querido, Messias Peixoto, que sempre estiveram torcendo por mim durante todos esses anos de amizade e cumplicidade... adoro vocês!!

À Coordenação e subcomissão da Pós Graduação em Parasitologia, Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco, Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e o Prof. Dr. Flávio Dias Passos, pela assistência prestada.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que fazem parte do Departamento de parasitologia da Unicamp, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho, expresso minha gratidão, muito obrigada!

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."
(Chico Xavier)

"Dê sempre o melhor, e o melhor virá"
(Madre Tereza de Calcutá)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1-INTRODUÇÃO	1
1.1- Manifestações Clínicas da Esquistossomose Mansônica.....	7
1.2- Terapia da Esquistossomose Mansônica	8
1.3 - Desenvolvimento de Resistência ao Praziquantel	12
1.4- O uso da Fitoterapia no Tratamento da Esquistossomose	14
1.5 - <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC.....	19
2 – OBJETIVOS	27
2.1 - Objetivo geral	27
2.2 - Objetivos específicos.....	27
3- MATERIAL & MÉTODOS	29
3.1 - Fitoquímica	29
3.1.1 - Material Vegetal.....	29
3.2- Modelo Biológico	34
3.2.1- Parasitas e Animais	34
3.4- Ensaio <i>in vitro</i>	34
3.5- Ensaios <i>in vivo</i>	37
3.6- Acompanhamento e Finalização dos Tratamentos	39
3.7- Análise Estatística	41
4.Resultados	42
4.1- Análises Fitoquímicas.....	43
4.1.2- Obtenção e Rendimento das Amostras de <i>B. trimera</i>	44
4.1.3- Análises Cromatográficas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	46
4.1.4- Análise por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	47
4.2- Análises Biológicas: Ensaios <i>in vitro</i>	49
4.2.1- Efeito de <i>B. trimera</i> sobre a Motilidade dos vermes adultos de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	50
4.2.2- Efeito de <i>B. trimera</i> sobre a oviposição dos vermes fêmeas de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	53
4.2.3- Efeito da <i>B. trimera</i> sobre a Mortalidade dos vermes adultos de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	56
4.2.4- Mortalidade total dos vermes adultos, machos e fêmeas de <i>S. mansoni</i> submetidos a diferentes concentrações de <i>B. trimera</i> após 72 horas de incubação.	63
4.2.5- Efeito da <i>B. trimera</i> sobre a Morfologia dos vermes adultos de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	65
4.3- Ensaios <i>In vivo</i>	70

4.3.1- Efeito de <i>B. trimera</i> sobre a carga parasitária dos animais tratados após 60 dias de infecção por <i>S. mansoni</i>	71
4.3.2- Efeito de <i>B. trimera</i> sobre a distribuição de ovos de <i>S. mansoni</i> no intestino	74
4.3.3 - Efeito de <i>B. trimera</i> sobre o número de Ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados nas Fezes	76
4.3.4- Efeito de <i>B. trimera</i> sobre os granulomas hepáticos	78
5- DISCUSSÃO	84
5.1- Análises Fitoquímicas.....	85
5.2- Ensaio <i>in vitro</i>	87
5.3- Ensaio <i>In vivo</i>	92
6- CONCLUSÕES	102
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais atividades biológicas da <i>B. trimera</i> descritas na literatura.....	23
Tabela 2: Amostras de <i>B. trimera</i> analisadas por CCD e seus respectivos eluentes.....	48
Tabela 3: Compostos do óleo essencial de <i>B. trimera</i> (Less) DC, identificados por CG-EM, Índices de Retenção calculados e teóricos e porcentagens relativas de cada composto DL50	69
Tabela 4: Motilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> e número de vermes separados após a exposição à <i>B. trimera</i>	78
Tabela 5: Mortalidade total dos vermes adultos, machos e fêmeas de <i>S. mansoni</i> em relação às concentrações avaliadas de cada amostras <i>B. trimera</i> após 72 horas de incubação e suas correspondentes DL50.....	79
Tabela 6: Efeito dos tratamentos realizados com as amostras de <i>B. trimera</i> e com praziquantel sobre os granulomas hepáticos dos camundongos tratados após 60 dias de infecção por <i>S. mansoni</i>	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global das espécies de <i>Schistosoma</i>	3
Figura 2: Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	5
Figura 3: Fórmula estrutural do praziquantel.....	14
Figura 4: <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC. A. Muda; B. Inflorescência.....	19
Figura 5: Estruturas moleculares de algumas classes de compostos identificados de <i>B. trimera</i>	21
Figura 6: Estruturas moleculares de alguns compostos identificados no óleo essencial de <i>B. trimera</i>	22
Figura 7: Sistema de evaporação a vácuo utilizado na secagem dos extratos e frações de <i>B. trimera</i>	30
Figura 8: Fotos da partição líquido-líquido do Extrato Hidroalcoólico de <i>B. trimera</i> . Obtenção das Frações Orgânica e Aquosa.....	31
Figura 9: Grupos experimentais para os ensaios <i>in vitro</i> utilizando diferentes concentrações das amostras de <i>B. trimera</i> sobre os vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	35
Figura 10: Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos, com as amostras de <i>B. trimera</i> OE, ED, FAA e PZQ, e as respectivas concentrações para avaliação <i>in vivo</i> contra vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após 60 dias de infecção.....	38
Figura 11: Esquema do processo de infecção, tratamento e perfusão dos camundongos para realização dos ensaios <i>in vivo</i>	40
Figura 12: Fluxograma de obtenção das amostras de <i>Baccharis trimera</i> e seus rendimentos para realização dos ensaios de atividade esquistossomicidas por meio de ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	45
Figura 13: CCD de todas as amostras de <i>B. trimera</i> utilizadas para os testes de atividade esquistossomicida contra <i>S. mansoni</i> , linhagem BH. Eluente: CHCl ₃ : MeOH (97:3 v/v) e revelador nisaldeído.....	46
Figura 14: Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>B. trimera</i> (Less) DC, obtidos por CG-EM.....	47
Figura 15: Efeito <i>in vitro</i> do praziquantel sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54
Figura 16: Efeito <i>in vitro</i> do Óleo essencial sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54

Figura 17: Efeito <i>in vitro</i> do Extrato Diclorometânico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54
Figura 18: Efeito <i>in vitro</i> da Fração Hexânica, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54
Figura 19: Efeito <i>in vitro</i> da Fração Acetona/Água, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54
Figura 20: Efeito <i>in vitro</i> do Extrato Hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	54
Figura 21: Efeito <i>in vitro</i> da Fração Aquosa, obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	55
Figura 22: Efeito <i>in vitro</i> da Fração Aquosa obtida a partir do extrato hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	55
Figura 23: Efeito <i>in vitro</i> da Fração 2 obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	55
Figura 24: Efeito <i>in vitro</i> da Fração 3 obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	55
Figura 25: Efeito <i>in vitro</i> da Fração 4 obtida a partir do extrato hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.....	55
Figura 26: Efeito do óleo essencial de <i>B. trimera</i> sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	58
Figura 27: Efeito do Extrato bruto Diclorometânico sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	58
Figura 28: Efeito da fração Hexânica, obtida a partir do extrato Diclorometânico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	59
Figura 29: Efeito da fração Água/Acetona, obtida a partir do extrato Diclorometânico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	59

Figura 30: Efeito do Extrato bruto Hidroalcoólico sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração e o período de incubação de 72 horas.....	60
Figura 31: Efeito da Fração Orgânica, obtida do extrato bruto Hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	60
Figura 32: Efeito da Fração Aquosa, obtida do extrato bruto Hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	61
Figura 33: Efeito da Fração 2 , obtida do extrato bruto Hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	61
Figura 34: Efeito da Fração 3, obtida do extrato bruto Hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	62
Figura 35: Efeito da Fração 4, obtida do extrato bruto Hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	62
Figura 36: Efeito do praziquantel sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.....	63
Figura 37: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após exposição do óleo essencial de <i>B. trimera</i> na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea- Controle; (B) Verme fêmea, extensa descamação da superfície tegumentar na região ventral; (C) Verme macho- Controle; (D) Verme macho, alterações na ventosa oral e descamação na superfície tegumentar.....	67
Figura 38: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após exposição da fração hexânica, obtida a partir do extrato bruto diclorometânico, na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea-Controle; (B) Verme fêmea, extensa descamação tegumentar na superfície dorsal; (C) Verme macho-Controle; (D) Verme macho, descamação da superfície tegumentar na região dorsal próxima a ventosa oral.....	67
Figura 39: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após exposição da fração acetona/água, obtida a partir do extrato bruto diclorometânico, na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea-Controle; (B) Verme fêmea, contração tegumentar e descamação tegumentar na superfície dorsal; (C) Verme macho-Controle; (D) Verme macho, descamação da superfície tegumentar na região dorsal e destruição dos tubérculos e espinhos resultando em uma superfície lisa.....	68

- Figura 40:** Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após a exposição do Extrato hidroalcoólico na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. **(A)** Verme fêmea- Controle; **(B)** Verme na fêmea, mostrando vesiculação, descamação e erosão na porção anterior da superfície dorsal; **(C)** Verme macho- Controle; **(D)** Verme macho, destruição dos tubérculos e espinhos e vesiculação da superfície dorsal..... 68
- Figura 41:** Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição do extrato bruto diclorometânico na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. **(A)** Verme fêmea- Controle; **(B)** Verme fêmea, mostrando destruição da ventosa oral e descamação tegumentar; **(C)** Verme macho- Controle; **(D)** Verme macho, mostrando a presença de bolhas ao redor das áreas de destruição de tubérculos e espinhos..... 69
- Figura 42:** Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição do praziquantel na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. **(A)** Casal de vermes - Controle; **(B)** casal de vermes, mostrando a contração da musculatura e descamação da superfície tegumentar; **(C)** Verme macho- Controle; **(D)** Verme macho; mostrando a presença de bolhas ao redor das áreas de destruição de tubérculos e espinhos..... 69
- Figura 43:** Quantidade de vermes Machos de *S. mansoni* recuperados após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água..... 73
- Figura 44:** Quantidade de vermes Fêmeas de *S. mansoni* recuperados após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água..... 73
- Figura 45:** Redução do número total de vermes recuperados após a perfusão do Sistema porta hepático e das veias mesentéricas, após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água..... 74
- Figura 46:** Oograma- Porcentagem de ovos encontrados- **Ovos Imaturos** (do primeiro ao quarto estágio de desenvolvimento); **Ovos Maduros** (quinto estágio de desenvolvimento) e **Ovos mortos**. Referente ao tratamento e a concentração avaliada dos grupos tratados com praziquantel, óleo essencial, extrato diclorometânico e fração acetona/água após 60 dias de infecção. Controle- PBS+TW..... 75
- Figura 47:** Quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água..... 77
- Figura 48:** Redução do número total de ovos por gramas de fezes (OPG) após 15 dias de tratamento- PZQ- praziquantel, OE- Óleo essencial; ED- Extrato diclorometânico; FAA- Fração acetona/água, de animais com 60 dias de infecção por *S. mansoni*..... 77

- Figura 49:** Granulomas hepático (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo Controle de camundongos infectados e não tratados. As setas indicam a presença do infiltrado inflamatório e o aglomerado de granulomas ao redor dos ovos de *S. mansoni*. É possível observar a presença do miracídio no interior dos ovos..... 80
- Figura 50** Granulomas hepático (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com o óleo essencial. **(A)**- 40 mg/kg, **(B)** 100 mg/kg, **(C)** 200mg/kg e **(D)** Controle não tratado. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados com a presença do miracídio em seu interior..... 80
- Figura 51:** Granulomas hepático (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com o Extrato diclorometânico. **(A)**- 40 mg/kg, **(B)** 100 mg/kg, **(C)** 200mg/kg e **(D)** Controle não tratado. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório..... 81
- Figura 52:** Granulomas hepático (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com a Fração acetona/água. **(A)**- 40 mg/kg, **(B)** 100 mg/kg, **(C)** 100mg/kg e **(D)** 200 mg/kg. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório e a presença do verme macho no fígado..... 81
- Figura 53:** Granulomas hepático (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com praziquantel. **(A)**- 40 mg/kg, **(B)** 100 mg/kg, **(C)** 100mg/kg e **(D)** 200 mg/kg. As setas indicam a presença dos ovos degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório e a presença do verme macho no fígado..... 82

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença crônica e está incluída na lista das doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A quimioterapia representa hoje, o principal recurso para minimizar a prevalência e incidência desta doença no mundo. Atualmente, no Brasil, o tratamento clínico da esquistossomose mansônica é baseado, principalmente, no uso do praziquantel (PZQ). No entanto, o emprego deste fármaco em larga escala, nas principais áreas endêmicas da doença, resultou no desenvolvimento de resistência a diferentes cepas de *S. mansoni*. Desta forma, faz-se necessária à busca de novos princípios ativos explorando as fontes de compostos sintéticos, semi-sintéticos, além das fontes naturais, para se obter alternativas terapêuticas contra a esquistossomose. No presente estudo, avaliou-se o efeito de *Baccharis trimera* (Less) DC. por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, sobre vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH. Esse estudo avaliou a motilidade dos vermes, machos e fêmeas, oviposição, alterações morfológicas, mortalidade dos parasitas, avaliação da carga parasitária, quantidade de ovos eliminados nas fezes, distribuição dos ovos nos tecidos intestinais e avaliação das reações granulomatosas no tecido hepático. Os resultados mostraram que os tratamentos *in vitro*, realizados com o óleo essencial e com os extratos orgânicos e frações de diferentes polaridades, nas concentrações de 130 e 91 µg/mL, reduziram a motilidade e causaram a mortalidade dos parasitas com alterações morfológicas no tegumento e nas ventosas, oral e acetabular. Os tratamentos *in vivo* alteraram a proporção dos vermes, machos e fêmeas, evidenciando que as fêmeas foram mais sensíveis a *B. trimera* do que os vermes machos. Também observou-se que os tratamentos realizados com o óleo essencial e com o extrato diclorometânico reduziram significativamente a quantidade de ovos eliminado nas fezes, além de provocarem alterações no oograma, reduzindo a distribuição dos ovos nos tecidos intestinais, quando comparados com o grupo controle. Além disso, esses mesmos tratamentos demonstraram uma redução do número de granulomas hepáticos e a diminuição do diâmetro médio, evidenciando uma redução da reação granulomatosa. De modo geral, observou-se que para cada parâmetro analisado, tanto nos ensaios *in vitro* quanto nos ensaios *in vivo*, houve uma variação de resultados de acordo com cada amostra de *B. trimera* avaliada e as concentrações testadas. O estudo indica o potencial terapêutico da *B. trimera* no tratamento da esquistossomose mansônica.

Palavras – chaves: *Baccharis trimera*, Extrato diclorometânico, Óleo essencial, *Schistosoma mansoni*, Tratamento.

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is a chronic disease included in the list of Neglected Diseases by the World Health Organization (WHO). Chemotherapy is now the main resource to minimize the prevalence and incidence of this disease worldwide. Currently in Brazil, the clinical treatment of schistosomiasis is based primarily on the use of praziquantel (PZQ). However, the large scale use of PZQ in endemic areas resulted in the development of resistance to different strains of *Schistosoma mansoni*. Thus, it is necessary to search for new active principle exploring the sources of synthetic compounds, semi-synthetic, and natural sources to obtain therapeutic alternatives against schistosomiasis. In this study, we evaluated the effect of *Baccharis trimera* (Less) DC. on adult worms of *S. mansoni* BH strain *in vitro* and *in vivo*. This study evaluated the motility of the worms, males and females, oviposition, morphological abnormalities, parasite mortality, assessment of parasite load, number of eggs in the feces, distribution of eggs in the intestinal tissues and evaluation of granulomatous reactions in liver tissue. The results showed that *in vitro* treatments made with the essential oil and the organic extracts and fractions of different polarities at concentrations of 130 and 91 µg/mL, reduced motility, and caused the death of the parasites with morphological changes in tegument and the suckers, oral and acetabular. The treatments *in vivo* shifted the proportion of worms, males and females, indicating that females were more sensitive to *B. trimera* than male worms. It was also noted that the treatments performed with the essential oil and the dichloromethane extract significantly reduced the number of eggs eliminated in feces as well as cause changes in oogram, reducing the distribution of eggs in the intestinal tissues, compared with the control group. In addition, these same treatments showed a reduction in the number of hepatic granulomas and a decrease in diameter, showing a reduction of granulomatous reaction. Overall, it was observed that for each parameter analyzed in both, *in vitro* and *in vivo* assays, there was a difference in results according to each sample *B. trimera* evaluated and the concentrations tested. The study indicates the therapeutic potential of *B. trimera* in the treatment of schistosomiasis.

Key words: *Baccharis trimera*, Dichloromethane Extract, Essential oil, *Schistosoma mansoni*, Treatment.

Introdução

1- INTRODUÇÃO

A esquistossomose ou Bilharziose é uma doença parasitária crônica causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* (GRYSEELS et al., 2006). Esta parasitose está incluída na lista das doenças negligenciadas do mundo pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Ocupa o segundo lugar entre as enfermidades parasitárias com maior área de endemismo, constituindo-se em um sério problema de Saúde Pública com altos índices de morbidade e mortalidade (ENGELS et al., 2002). De acordo com dados mais recentes, estima-se que a esquistossomose afeta mais de 207 milhões de pessoas em todo o mundo, com até 280 mil mortes por ano em países africanos (KING, 2010; VAN DER WERF et al., 2003).

Entre as espécies de *Schistosoma* capazes de infectar o homem podemos citar: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*. As três primeiras são consideradas as principais, sendo que apenas *S. mansoni* pode ser encontrado nas Américas e no Brasil, enquanto *S. japonicum* ocorre na China, Indonésia e Filipinas, e o *S. haematobium* é encontrado na África e no Oriente Médio, conforme observados na Figura 1 (GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil a distribuição da espécie *S. mansoni* é endêmica em 19 unidades federais, onde os estados do Maranhão, Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Minas Gerais e Espírito Santo se destacam por apresentar as maiores prevalências de infecção. As áreas de transmissão focal estão distribuídas entre os estados do Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal (MS, 2011).

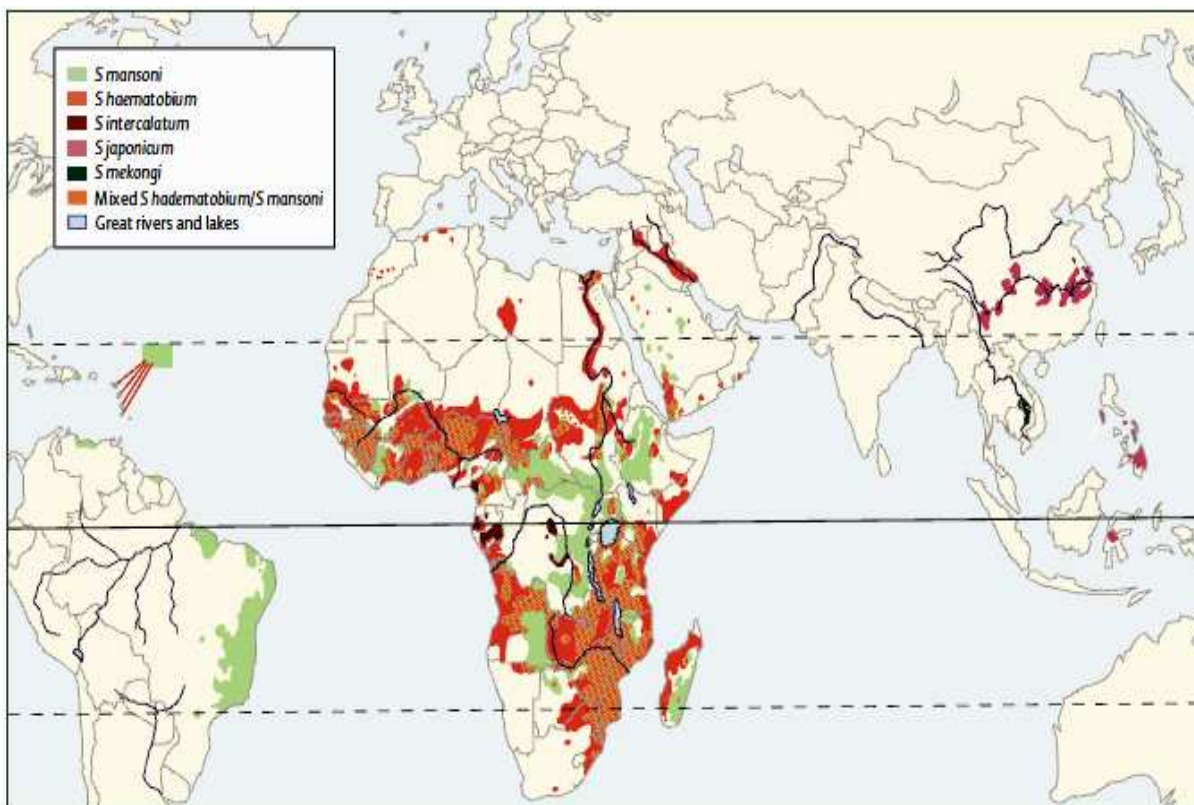


Figura 1: Distribuição global das espécies de *Schistosoma*. Fonte: Gryseels et al., 2006.

Acredita-se que a esquistossomose tenha sido introduzida no Brasil pelos portos de Salvador e Recife em meados do século XVI com o comércio de escravos africanos infectados pelo parasito. Estabelecidos os primeiros focos, a doença se dispersou do litoral para o interior (COURA & AMARAL, 2004). O clima tropical do Brasil propiciou condições ideais para a transmissão da esquistossomose devido à variedade de habitats aquáticos, onde havia o hospedeiro intermediário (moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*) além de altas temperaturas e luminosidade intensa, fatores que contribuem para a evolução das formas parasitárias nos moluscos hospedeiros do *S. mansoni* favorecendo o ciclo biológico heteroxênico (KATZ & ALMEIDA, 2003).

No Brasil, existem cerca de dez espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, sendo que apenas três são de importância médica pelo fato de liberarem cercárias em condições ambientais favoráveis, são estas, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Das espécies citadas, a *B. glabrata* apresenta maior

relevância epidemiológica na transmissão da esquistossomose em virtude da ampla distribuição geográfica (RAMOS, 2004).

A transmissão da esquistossomose mansônica (Figura 2), ocorre quando o hospedeiro definitivo infectado elimina ovos viáveis de *S. mansoni* através das fezes. Estes, em contato com a água, eclodem e liberam uma larva ciliada denominada miracídio, que penetra no hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, auxiliados pela ação de enzimas proteolíticas. No molusco, os miracídios passam por modificações morfológicas e se transformam em esporocistos, dando origem às formas infectantes-livres- natantes, denominadas cercárias (DOMINGOS & WARREN, 1969).

O hospedeiro definitivo se infecta ao entrar em contato com coleções de água-doce contendo cercárias. As cercárias penetram na pele intacta do hospedeiro definitivo e se transformam em outra larva, o esquistossômulo. Estes, por sua vez, penetram nos vasos sanguíneos e são levados pela circulação para o coração, pulmões e em seguida para o fígado, onde se tornam adultos e se diferenciam em machos e fêmeas (XAVIER et al., 1998).

Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas, onde ocorrerá a oviposição. Parte dos ovos atravessa a parede intestinal, alcança a luz e é eliminado junto com as fezes, enquanto que outra parte fica retida nos tecidos, como os do fígado, formando ao redor desses ovos, uma reação granulomatosa, principal causa da morbidade da doença (KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER et al., 2003; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2006).

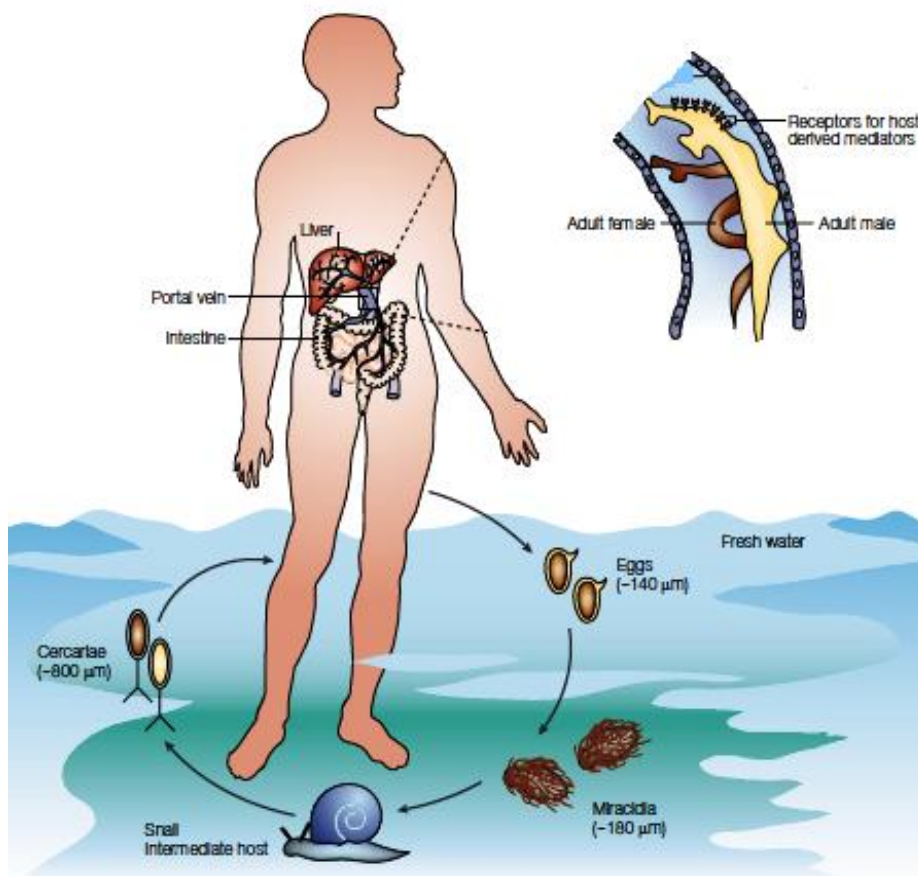


Figura 2: Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de Pearce & McDonald 2002.

Para Ehrenberg & Steven (2005) a esquistossomose é considerada uma doença multifatorial, estando relacionada tanto a fatores intrínsecos como extrínsecos. Barata et al. (2000) e Silva et al. (2000), confirmam este fato mostrando que o modelo epidemiológico da esquistossomose está intimamente ligado a diferentes níveis de causalidade, onde fatores bioecológicos, socioculturais e socioeconômicos podem contribuir para o aparecimento de casos autóctones nas zonas urbanas das grandes cidades, causando grande impacto na disseminação da esquistossomose e de várias doenças emergentes e re-emergentes no Brasil.

Estudos realizados por Martins Jr. & Barreto (2003) indicaram que os movimentos migratórios, inter e intra-regionais, a ocupação humana nas periferias

das grandes cidades, a exploração inadequada de recursos hídricos, a ampla distribuição dos hospedeiros intermediários, a falta de educação sanitária, além da descontinuidade das ações do programa oficial de controle da esquistossomose, estão intimamente relacionados à manutenção da endemia, bem como, na dinâmica de transmissão desta parasitose. Desta forma, um dos maiores problemas nos países onde a esquistossomose mansônica é endêmica é o controle.

No Brasil, as diretrizes para o controle da esquistossomose têm acompanhado as recomendações da OMS, ajustadas às políticas de Saúde Pública e às características epidemiológicas próprias do nosso país (FAVRE et al., 2002). Nesse contexto, como tentativa de inspecionar esta parasitose, medidas isoladas ou combinadas poderiam ser usadas tais como: controle do hospedeiro intermediário com moluscicida, melhoria das condições de saneamento básico e abastecimento de água, educação sanitária para a população exposta, tratamento individual nas áreas de alta prevalência e o desenvolvimento de uma vacina (BARBOSA et al., 2008; COURA & AMARAL 2004).

Contudo, para realizar tais medidas, é preciso enfrentar algumas dificuldades tais como, a larga disseminação do hospedeiro intermediário, os altos custos associados à implementação de condições sanitárias e suprimento de água adequado, ao lado do intenso contato da população rural com coleções naturais de águas doces poluídas; tratamentos individuais podem ser eficientes para reduzir a morbidade, embora não impedem reinfecções e o desenvolvimento de resistência ao tratamento e, finalmente, ainda não existe uma vacina efetiva para tratamento da esquistossomose (COURA & AMARAL 2004).

1.1- Manifestações Clínicas da Esquistossomose Mansônica

As principais manifestações clínicas da esquistossomose mansônica estão correlacionadas com as fases de desenvolvimento do parasito no organismo humano podendo se apresentar no homem sob uma aguda e duas formas crônicas, uma assintomática e outra grave (PORDEUS et al., 2008). A fase aguda, em alguns casos, é caracterizada por prostração, febre e eosinofilia que podem surgir alguns dias após a exposição cercariana, ou com maior frequência, trinta dias após a infecção, coincidindo com o início da eliminação dos ovos do parasita nas fezes, o que pode provocar dores abdominais e diarreia sanguinolentas (HIATT et al., 1979).

A forma crônica habitual ou assintomática é a forma em que se encontra a maioria das pessoas infectadas, cerca de 90%, nas principais zonas endêmicas, ou eventualmente fora delas, na qual o indivíduo elimina ovos viáveis nas fezes com sintomas discretos e inespecíficos que tendem a desaparecer com ou sem tratamento (ANDRADE, 2008).

Em relação à forma crônica grave, os sintomas clínicos variam a depender da localização do parasito e da intensidade da carga parasitária, podendo apresentar as formas, hepatointestinal e hepatoesplênica, esta última aparece em 4 a 12 % das pessoas que residem em áreas endêmicas e de alta transmissibilidade (BINA & PRATA, 1983; MOHAMED-ALI et al., 1991), além da forma neurológica ou neuroesquistossomose. Além desses sintomas, esta fase pode ser caracterizada pela presença de numerosos granulomas periovulares em vários órgãos, especialmente no fígado e baço, podendo ser encontrados também, no intestino e pulmão (RASO & NEVES, 1965).

A reação granulomatosa e as alterações hepáticas ocorrem em consequência da evolução do processo inflamatório, em decorrência da liberação de substâncias hepatotóxicas produzidas pelos ovos do parasito, que desencadeia uma reação imune tipo Th2 (PEARCE et al., 1991). A inflamação granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células TCD4

(BOROS et al., 1975), que estimulam células e citocinas específicas, favorecendo assim, a formação de um infiltrado de células inflamatórias ao redor dos ovos (PEARCE & MCDONALD, 2002).

Os granulomas esquistossomóticos apresentam alterações de tamanho, forma e composição quando a infecção esquistossomótica avança para a fase crônica, fenômeno denominado “modulação imunológica”. Isso foi observado por Domingo & Warren, (1969), confirmando que essa “modulação imunológica” era dependente de uma dessensibilização endógena relacionada com a elevada produção de antígenos do ovo do parasita.

Posteriormente, Smithers & Doenhoff, (1976), mostraram que a diminuição do tamanho dos granulomas, coincidia, paralelamente, com o declínio da resposta imunológica mediada por células do hospedeiro. Para Lichtenberg (1964), a duração e o tamanho do granuloma, seriam proporcionais à persistência do ovo na lesão e a capacidade de destruição dos antígenos por parte das células do hospedeiro.

1.2- Terapia da Esquistossomose Mansônica

A terapia da esquistossomose começou em meados da Primeira Guerra Mundial, com o uso do primeiro agente terapêutico, o tártaro emético (CHRISTOPHERSON, 1918), um antimonial trivalente administrado por via intramuscular ou intravenosa. Entretanto, apesar desse composto ter constituído a base da quimioterapia da esquistossomose por cerca de 50 anos e de atuar com eficácia para *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, seu uso clínico foi proscrito em consequência dos severos efeitos colaterais e tóxicos que levava, na maioria das vezes, a interrupção do tratamento pela pouca tolerância do paciente a este fármaco (CUNHA, 1982; CIOLI et al., 1995; SILVA-PENILDON, 1994; CIOLI, 1998; NOVAES & ARAUJO, 1999). A retirada desse antimonial impulsionou o interesse na pesquisa de fármacos mais ativos e livres de metais (ARENA, 1997).

No período de 1960 a 1977, três fármacos esquistossomicidas tornaram-se disponíveis para o tratamento da esquistossomose, metrifonato (1962), oxamniquina (OXA) (1964) e praziquantel (PZQ) (1970), (ANDRADE, 2002).

O metrifonato, registrado sob o nome comercial de Bilarcil®, apresenta eficácia terapêutica contra o *S. haematobium* sendo utilizado ainda hoje no tratamento da esquistossomose urinária com administração de três doses orais (CIOLI et al., 1995; BERGE et al., 2011).

A oxamniquina, registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o nome comercial de Mansil® apresenta eficácia terapêutica contra *S. mansoni*, principalmente para os vermes machos (FOSTER & CHEETHAM, 1973). O praziquantel, descoberto na década de 1970 pelos laboratórios das indústrias farmacêuticas Merck & Bayer, registrado comercialmente como Biltricide®, Cysticide®, Cestox®, Distocid®, Pyquition®, (CIOLI et al., 1995), atua contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam o homem (UTZINGER et al., 2001; SHUHUA, 2005; JEZIORSKI & GREENBERG, 2006; SHAOHONG et al., 2006).

Atualmente, no Brasil, o tratamento clínico da esquistossomose mansônica é baseado no uso de dois fármacos, a oxamniquina (OXA) e o praziquantel (PZQ). A oxamniquina, 2-aminometiltetraidroquinolina e derivados é produzida por síntese biológica e apresenta boa aceitação pela população pesquisada e impacto imediato sobre as manifestações clínicas da esquistossomose, além de reduzir a prevalência dessa parasitose nas zonas de alta endemicidade (PICA-MATTOCCIA et al., 1997; FERRARI et al., 2003)

A OXA é bem absorvida tanto por via oral como por via intramuscular. A metabolização desse fármaco é realizada no fígado produzindo um metabólito inativo denominado 6-carboxi-oxamniquina que é eliminado pela via renal. Este fármaco apresenta atividade terapêutica nas formas intestinal e hepatoesplênica de infecções causadas exclusivamente por *S. mansoni*. Estudos mostram que a OXA é mais eficaz contra os vermes machos desta espécie, por outro lado, não apresenta nenhum efeito notável para outras espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem (CUNHA, 1982; FERRARI et al. 2003).

Pesquisas mostram que o mecanismo de ação da oxamniquina está relacionado com a capacidade de inibição da síntese de ácidos nucleicos do parasita, e por apresentar efeito anticolinérgico, o que aumenta a motilidade do mesmo (PICA-MATTOCCIA et al., 1989; CIOLI et al., 1995).

Efeitos colaterais provocados pela oxamniquina ocorrem em 40% dos casos. Predominam o mal estar, náuseas, sonolência, prostração, dores abdominais, cefaléias, azia, e em alguns casos, diarreias; tais efeitos surgem logo após a administração do medicamento com duração de algumas horas. Também já foram demonstrados efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (CUNHA, 1992; FERRARI et al., 2003; SHAOHONG et al., 2006).

Em virtude dos efeitos colaterais apresentados pela OXA e da resistência a esse fármaco, relatada pela primeira vez no leste da África, por meio de um estudo *in vitro* realizado com diferentes cepas isoladas de *S. mansoni* obtidas de um cruzamento genético (CIOLI et al., 1992), no final da década de 1990 o Ministério da Saúde (MS) passou a utilizar o praziquantel (PZQ) como fármaco de escolha para o tratamento dessa helmintíase (MS, 2008). No entanto, o uso extensivo em larga escala do praziquantel culminou no aparecimento de tolerância e resistência para algumas linhagens de *Schistosoma mansoni* como descrito por diversos autores, DIAS et al., 1978; CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; FALLON & DOENHOFF 1994; LIANG et al., 2001; CAFFREY, 2007; DOENHOFF, et al., 2008.

Diferentemente da OXA, o PZQ apresenta eficácia terapêutica para todas as espécies de *Schistosoma* capazes de infectar o homem. No Brasil, os primeiros estudos com esse fármaco foram realizados por Katz, Rocha & Chaves (1979), em pacientes infectados com *Schistosoma mansoni*; Davis & Wegner (1979), estudaram pacientes infectados por *S. haematobium* na Zâmbia e Ishisaki, et al (1979) estudaram pacientes infectados por *S. japonicum* no Japão e nas Filipinas.

O PZQ (Figura 3) é um derivado da isoquinolina-pirazina 2-(ciclohexilcarbonil) - 1, 2, 3, 6, 7, 11 b-hexahidro- 4H- pirazino (2, 1- a) isoquinolina- 4 ona (DOENHOFF, 2008). Os fenômenos relacionados ao efeito do PZQ sobre o *Schistosoma mansoni in vitro* e *in vivo*, ainda não foram completamente

elucidados. No entanto, se conhecem as principais ações: causa paralisia muscular do parasita após as primeiras horas de exposição ao fármaco, em consequência do rápido influxo de cálcio no interior do parasita, provoca alterações morfológicas na superfície tegumentar, representada por vacuolizações, destruição dos tubérculos e espinhos e aumento da exposição de antígenos na superfície do parasito, tal reação está relacionada à resposta imunológica do hospedeiro infectado (CIOLI et al., 1995; DOENHOFF et al., 2008).

Uma série de ensaios laboratoriais e clínicos mostraram a eficácia do PZQ em pacientes de todas as idades e nas diferentes formas clínicas da esquistossomose, incluindo casos avançados como a forma hepatoesplênica (BASSILY et al., 1985), esquistossomose cerebral causada por *S. japonicum* (WATT, et al., 1986) e síndromes neurológicas causadas por *S. mansoni* e *S. haematobium* (SCRIMGEOUR & GADJUSEK, 1985).

Embora o PZQ apresente eficácia terapêutica contra *S. mansoni*, este fármaco apresenta baixa efetividade sobre os esquistossômulos em infecções recentes, provoca também efeitos colaterais com o aumento da dose administrada, resultando em baixas taxas de cura em áreas de alta endemicidade da esquistossomose (CIOLI & PICA-MATTOCCIA, 2003; DOENHOFF et al., 2008). O PZQ também apresenta baixa solubilidade em água, resultando em problemas de biodisponibilidade, obrigando a administração de dosagens mais elevadas (MOURÃO et al., 2005).

Diante deste último aspecto, as alternativas tecnológicas que aperfeiçoam as propriedades dos fármacos pouco solúveis em água, têm sido focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, como nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, as micro e nanopartículas, microemulsões, dispersões sólidas e cristais líquidos, entre outros (KREILGAARD, 2002).

Esses sistemas possuem a capacidade de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico, podendo alterar a farmacocinética, aumentando a solubilidade dos fármacos lipofílicos (MOURÃO, 2001; CINTO, 2005), além de controlar a liberação destes de forma temporal e

espacial, quando administrados *in vivo*, reduzindo a distribuição inespecífica, aumentando a distribuição para tecidos alvos e, conseqüentemente, aumentando sua eficácia (UCHEGBU et al., 2006; BAJPAI et al., 2008).

Nesse contexto, Frezza et al. (2007) avaliaram o efeito do PZQ incorporado em lipossomas sobre vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH e observaram uma eficiência de 98% na redução da quantidade de ovos liberados no intestino de camundongos *Mus musculus*, quando sua eficácia foi analisada por meio de biópsia da mucosa retal (oograma).

Considerando todos os estudos descritos anteriormente, a disponibilidade de um único fármaco para o tratamento de milhões de pessoas com esquistossomose é uma condição preocupante devido ao aparecimento progressivo de resistência.

1.3 - Desenvolvimento de Resistência ao Praziquantel

O desenvolvimento de resistência aos fármacos esquistossomicidas é um eminente perigo com complicações sérias para a proteção da saúde de milhões de pessoas. A resistência é usualmente definida como a perda da sensibilidade dos parasitos às determinadas concentrações de fármacos, às quais esses se mostravam previamente sensíveis (COELHO et al., 1997).

Por ser considerado um fármaco de baixa toxicidade e apresentar uma elevada eficácia terapêutica contra todas as espécies de *Schistosoma*, o praziquantel é administrado em larga escala como principal método de controle e tratamento da esquistossomose. No entanto, o emprego deste fármaco em larga escala nas principais áreas endêmicas da doença, bem como os tratamentos sequenciais, resultou no desenvolvimento de resistência de diferentes cepas de *S. mansoni* oriundas de uma mesma região geográfica, ou de diferentes regiões (PARISE- FILHO et al., 2001).

O primeiro relato de resistência ao PZQ foi descrito por Fallon & Doenhoff (1994). Esses autores demonstraram experimentalmente que doses subterapêuticas do PZQ, sobre várias gerações de *S. mansoni*, produziam vermes menos sensíveis ao fármaco. A partir disso, a resistência foi de fato, reportada pela primeira vez em 1995 no Egito e no norte de Senegal, quando esse fármaco foi usado visando erradicar a esquistossomose mansônica, que tinha alcançado condições epidêmicas (FALLON et al., 1995; ISMAIL et al., 1996).

Alguns autores sugerem que os baixos índices de cura da esquistossomose, deve-se ao fato da quimioterapia ser utilizada em massa em algumas regiões, bem como a alta carga parasitária do indivíduo e as altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença, em grandes proporções, das formas imaturas do parasita, tornando o PZQ menos eficaz (DOENHOFF et al., 2002). Deste modo, o uso extensivo desse fármaco aumentou a preocupação sobre o desenvolvimento de cepas resistentes de *Schistosoma* sp. quando submetido ao tratamento das pessoas parasitadas (FALLON & DOENHOFF, 1994; DOENHOFF et al., 2009).

Desta forma, faz-se necessária a busca de novos princípios ativos por meio de estudos envolvendo a quimioterapia conjugada, explorando as fontes de compostos sintéticos, semi-sintéticos, além das fontes naturais, a fim de obter alternativas terapêuticas contra a esquistossomose (MACIEL et al., 2002).

Nesse contexto, as plantas medicinais são potenciais candidatas e merecedoras de estudos mais aprofundados, despertando o interesse dos pesquisadores em virtude da diversidade de atividades biológicas e pela variedade da flora nativa mundial (MATOS, 1994).

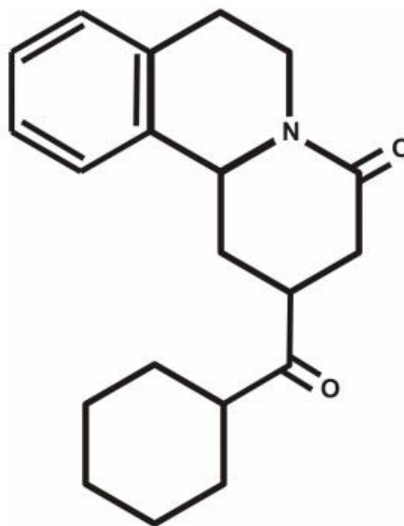


Figura 3: Fórmula estrutural do praziquantel

1.4- O uso da Fitoterapia no Tratamento da Esquistossomose

O uso de plantas medicinais tem sido uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, no tratamento de várias enfermidades (AKERELE, 1993). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação dos efeitos terapêuticos, prescritos com frequência, apesar de terem seus constituintes químicos na maioria das vezes, ainda desconhecidos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, a química, farmacologia e a biologia, que juntas, enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL et al., 2002).

O Brasil possui uma flora diversificada nos seus ecossistemas, com vegetações de diferentes características apresentando cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas e cujos princípios ativos são, na maioria das vezes,

desconhecidos, sendo que somente 8% destas espécies foram estudadas quanto a sua composição química e propriedades terapêuticas (VARANDA et al., 2006).

Apesar de a medicina popular utilizar plantas como principal fonte medicamentosa, apenas 25% dos produtos farmacêuticos prescritos são originados de substâncias encontradas em espécies da flora natural (DI STASI, 1996).

Para que se viabilize a inserção do uso das plantas medicinais, como por exemplo, nas farmácias de manipulação, deve haver investimentos na elaboração de documentos oficiais para tal fim (TOLEDO et al., 2003). Nesse contexto, o governo federal Brasileiro aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (BRASIL, 2009).

Diversas plantas são usadas no tratamento de uma ampla variedade de doenças infecciosas, incluindo a esquistossomose (NDAMBA et al., 1994). Apesar da existência de antiparasitários disponíveis comercialmente, o desenvolvimento de resistência de algumas espécies, justifica a busca de novos tratamentos, que venham substituir ou complementar os fármacos já existentes, (RATES 2001). Desta forma, nos últimos trinta anos, a comunidade científica vem pesquisando extratos brutos e compostos isolados, especialmente aqueles derivados de plantas medicinais, que apresentam propriedades esquistossomicidas (NDAMBA et al., 1994).

Segundo uma pesquisa feita por Clark et al. (1997) aproximadamente 95% das comunidades rurais da África do Sul fazem uso de remédios caseiros ou medicamentos de curandeiros tradicionais para tratar esquistossomose hematóbica. Um estudo realizado no Zimbábue avaliou o potencial esquistossomicida de uma variedade de plantas medicinais utilizadas pelos curandeiros tradicionais no tratamento da hematúria, principal sintoma da esquistossomose hematóbica. O material vegetal foi preparado de acordo com as

diretrizes dos curandeiros, e administrados por tubagem esofágica em hamsteres infectados com cercárias de *S. Haematobium*. As espécies de plantas utilizadas nesse estudo, estão listadas no trabalho de Ndamba et al. (1994).

Pesquisadores chineses também fazem uso de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional pelos povos ocidentais (VEIGA JR et al., 2005). Dentre elas, se destaca a *Artemisia annua* L (Asteraceae), conhecida como Artemísia ou Qinghaosu, uma planta oriunda da China e utilizada há séculos na medicina chinesa para o tratamento de estados febris. Essa espécie foi introduzida e naturalizada em vários países da Europa, do norte e centro da Ásia, na Índia, na Austrália, ao norte da África e na América do Norte e do Sul (KLAYMAN, 1993; WHO, 2006).

A artemisinina é um princípio ativo extraído da *Artemisia annua*, utilizada no tratamento da malária, que apresenta baixa toxicidade e não possui efeitos mutagênicos (GUO et al., 1998). A artemisinina vem sendo testada contra a esquistossomose desde a década de 1980, quando seus derivados - arteméter e artesunato - foram descritos por pesquisadores chineses (UTZINGER et al., 2001).

Observações experimentais demonstraram que a artemisinina é ativa contra *S. mekongi* (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2005) e *S. mansoni* em diferentes linhagens como as linhagens LE, Liberian e Porto Rico. Nas três linhagens são observadas diferenças na porcentagem de distribuição de vermes no sistema porta, na mortalidade e alteração no oograma. Entretanto, para a linhagem Porto Rico, a artemisinina mostrou-se ainda mais efetiva contra as formas imaturas e jovens-adultos (ARAÚJO et al., 1999; UTZINGER et al., 2002; SHAOHONG et al., 2005).

Pesquisas têm demonstrado que arteméter e artesunato apresentam eficácia terapêutica contra *S. japonicum* (LI et al., 2005; XIAO et al., 1995), *Schistosoma mansoni* (XIAO & CATTO, 1989), *Schistosoma haematobium* (XIAO et al., 2000), e *S. mekongi* (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2005).

Estudos recentes *in vivo*, demonstraram a eficácia e os efeitos terapêuticos do artesunato, em camundongos infectados por *S. mansoni* com dosagens de 300 mg/kg administradas por via oral em um intervalo de duas semanas depois da

infecção. Os resultados terapêuticos deste estudo mostraram inibição na maturação sexual dos vermes adultos, redução dos granulomas hepáticos, redução significativa no número de ovos, inibição do estado de maturação dos mesmos, além de alterações morfológicas observadas no tegumento do parasito. Sendo assim, o artesunato revelou uma proteção profilática contra a esquistossomose (UTZINGER et al., 2000; XIAO et al., 2000; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2006).

Como descrito anteriormente, princípios ativos para o tratamento clínico da esquistossomose, tem sido uma alternativa com o objetivo de usar uma menor dosagem do medicamento, visando diminuir a frequência dos efeitos adversos ou tóxicos e aumentar a eficiência terapêutica em indivíduos nas principais áreas endêmicas (CARVALHO, 2008). Sendo assim, pesquisas envolvendo a combinação da artemisinina com o praziquantel, tem demonstrado efeito curativo desta parasitose (UTZINGER et al., 2001).

Inyang-Etoh et al. (2009), avaliaram a eficácia terapêutica do praziquantel associado ao artesunato no tratamento da esquistossomose urinária em uma população de estudantes entre 20- 40 anos de idade na Nigéria, e observaram taxas de cura de 88,6%.

As pesquisas com plantas medicinais da flora nativa brasileira para o tratamento da esquistossomose mansônica, utilizando extratos brutos e compostos isolados, vêm sendo estudadas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. De acordo com Githori et al. (2006), plantas com atividade esquistossomicida geralmente contêm saponinas, alcalóides, taninos, polifenóis, lignanas, terpenos, lactonas, glicosídeos, e compostos fenólicos. Como resultado, muitas espécies brasileiras podem ser candidatos para estudos aprofundados sobre esta função.

Esses dados, em conjunto, salientam a importância de novas pesquisas explorando a diversidade faunística brasileira, tendo em vista novos protótipos para o desenvolvimento de fármacos (SCHENKEL et al., 2001), ou a melhoria dos fármacos existentes para prevenção e cura da esquistossomose mansônica.

Diante da diversidade de espécies de plantas brasileiras, destacam-se as plantas da família Asteraceae. Esta se constitui de ervas perenes, subarbustos, arbustos e árvores. Devido ao seu poder de adaptação ambiental, podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em variadas condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até zonas temperadas (MONDIN, 2006).

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro da divisão Angiosperma, compreendendo aproximadamente 1.100 gêneros e 25.000 espécies. Plantas desta família têm sido extensivamente estudadas em virtude da sua composição química e atividades biológicas (VERDI et al., 2005).

O desenvolvimento de inúmeras pesquisas com espécies de plantas desta família resultou no isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque para os flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (EMERENCIANO et al., 2001), além de sua ampla eficácia terapêutica já demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos (MACHADO, 2008).

Por outro lado, essa família também se destaca na produção de óleos essenciais de importância comercial, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, sendo usados, em sua maioria, nas indústrias de perfumes e licores (CRAVEIRO et al., 1981). Óleos essenciais são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis, obtidos dos mais variados órgãos vegetais, em geral por extração a vapor ou através de solventes. Seus compostos mais importantes são incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (CALSAMIGLIA et al., 2007).

1.5 - *Baccharis trimera* (Less) DC.

A *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) (Figura 4) considerada uma planta nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil, pode ser encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (ALONSO, 1998; BONA et al., 2005; LORENZI & MATOS 2002). A origem do nome *Baccharis* vem do grego (*Bakkharis*), antiga denominação para algumas plantas arbustivas (KISSMANN & GROTH, 1999).

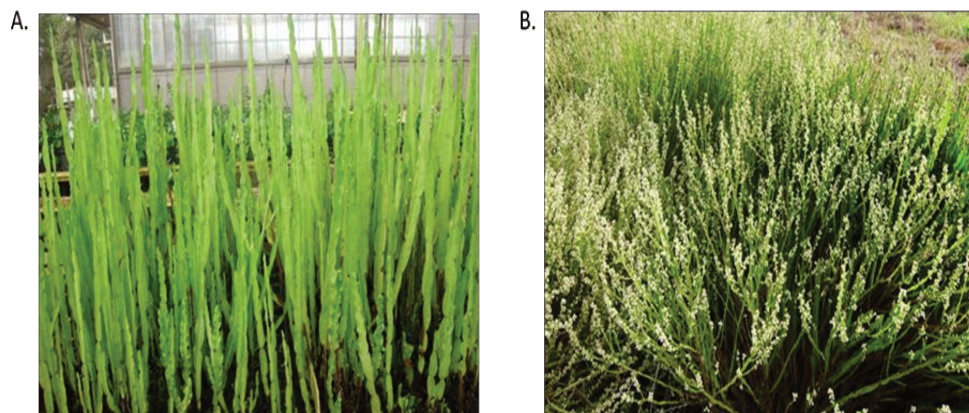


Figura 4. *Baccharis trimera* (Less) DC. A. Muda; B. Inflorescência.

O gênero *Baccharis* possui mais de 500 espécies (GIULIANO, 2001; MALIZIA et al., 2005). Segundo Barroso (1976), no Brasil, já foram descritas cerca de 120 espécies. Para esse mesmo autor, as espécies desse gênero que possuem cladódios, os quais fazem o papel de folha, uma vez que estas estão totalmente ausentes ou mostram-se reduzidas com função fisiológica restrita, são denominadas popularmente de carqueja e pertencem ao grupo *Trimera* - *B. trimera* (Less.) DC, *B. vincaefolia* Baker, *B. milleflora* (Less.) DC., *B. glaziovii* Baker, *B. opuntioides* Martius, *B. articulata* (Lam.) Persoon, *B. gaudichaudiana* DC., *B. usterii* Heering., *B. cylindrical* (Less.) DC., *B. myriocephala* DC., *B. crispa* Spreng., *B. microcephala* (Less.) DC., *B. phyteumoides* (Less.) DC., *B. sagitalis* (Less.) DC., *B. stenocephala* Baker (BARROSO, 1976). Dentre as espécies sumarizadas, a *Baccharis trimera* (Less) DC. é a mais estudada far-

macologicamente e está registrada na IV Farmacopéia Brasileira -1988-2003 (BUDEL et al., 2009).

A identificação desse grupamento vegetal é complexa entre as espécies. A problemática da caracterização botânica é relatada inclusive por especialistas desse gênero (WATANABE et al., 2005). Barroso & Bueno (2002) e Alonso & Desmarchelier (2006), afirmam que a *B. trimera* (Less.) DC. é muito confundida com *B. crispa* Spreng., *B. microcephala* (Less) DC., *B. stenocephala* Baker e *B. usterii* Heering. Esse fato acarreta o uso indiscriminado para a mesma finalidade terapêutica, devido à utilização da mesma sinonímia popular para diferentes espécies (BUDEL et al., 2009).

As características fitoquímicas desse gênero têm sido estudadas desde o início do século passado. Atualmente, mais de 150 compostos já foram isolados e identificados (ABAD & BERMEJO, 1999). Os compostos mais frequentes são os flavonóides e os terpenóides, como: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (MOREIRA et al., 2003; VERDI et al., 2005), além de saponinas (GENÉ et al., 1996). Na Figura 5 podem ser observadas as estruturas moleculares de algumas classes de compostos identificados de *B. trimera*.

O primeiro relato no Brasil sobre a utilização da *B. trimera* na medicina popular, foi descrito por Correa em 1931, in Lorenzi & Matos, (2002), que descreveu o uso da infusão das partes aéreas desta planta no tratamento da esterilidade feminina e impotência masculina.

B. trimera é uma erva consumida principalmente na forma de chá (VERDI et al., 2005). A principal indicação mencionada para esta espécie recai sobre suas ações terapêuticas para o aparelho digestivo, sobretudo relacionado com as funções hepáticas e biliares (SIMÕES et al., 2003). Nos estudos de atividades biológicas destacam-se os efeitos antimicrobianos, citotóxicos, analgésicos e antiinflamatórios, sendo que esses dois últimos são atribuídos principalmente às saponinas presentes nessa espécie (VERDI et al., 2005).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para investigar a composição química da espécie *B. trimera*. Dentre os principais constituintes químicos

identificados, estão: lactonas diterpênicas, sesquiterpenos, flavonóides, saponinas, taninos e polifenóis (SIMÕES et al., 2003; SOUSA et al., 1991). O óleo essencial dessa planta contém α e β -pineno, palustrol, canfeno, nerolidol, carquejol e acetato de carquejila- (MELLO & PETROVICK, 2000; AMARAL et al., 2010) e têm sido empregados no setor farmacêutico devido às suas propriedades antimicrobianas (BURT, 2004). O valor comercial desse óleo parece variar em função do teor de nerolidol e acetato de carquejila, seus constituintes majoritários (SOUSA et al, 1991). Na Figura 6 pode ser observada a estrutura molecular de alguns constituintes identificados no óleo essencial de *B. trimera*.

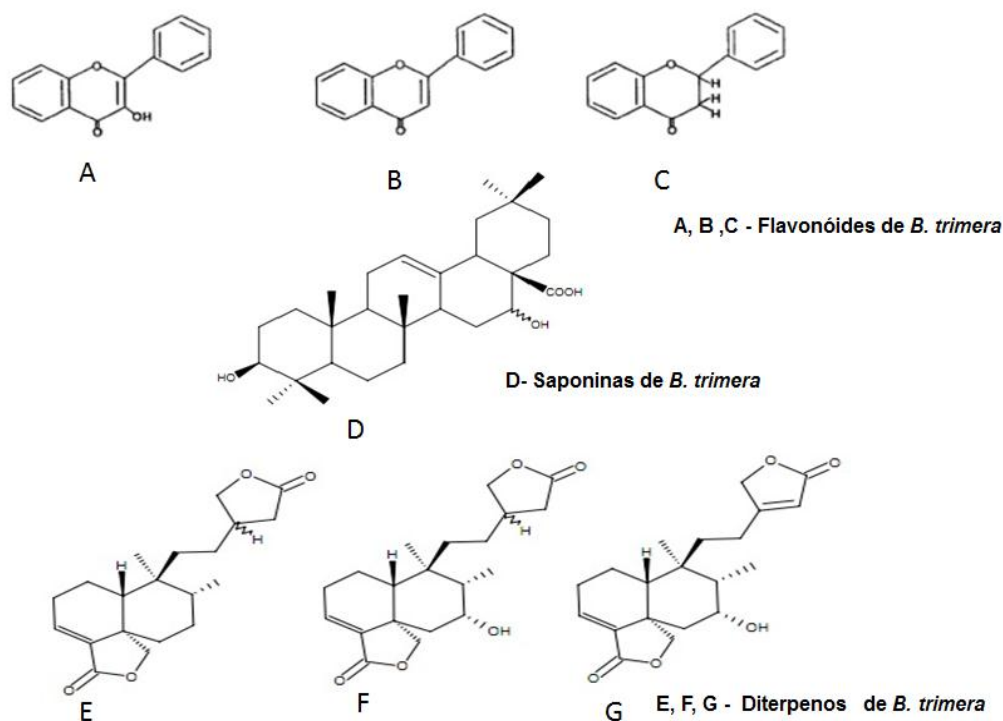


Figura 5: Estruturas moleculares de algumas classes de compostos identificados de *B. trimera* (Cook & Samman, 1996; Gené et al. 1996; Herz et al. 1997).

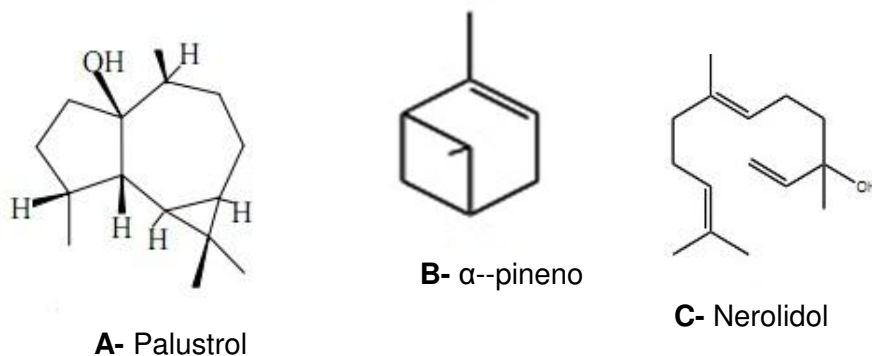


Figura 6: Estruturas moleculares de alguns compostos identificados no óleo essencial de *B. trimera* (Simões & Spitzer 2003).

Alguns óleos essenciais fornecem compostos de partida para síntese de outras substâncias úteis na indústria química e farmacêutica. Outros têm propriedades farmacológicas e são usados como antibacterianos, analgésicos, sedativos, expectorantes, estimulantes e estomáticos na composição de diversos medicamentos (CRAVEIRO et al., 1981).

Estima-se que 3000 tipos de óleos essenciais sejam conhecidos pela comunidade científica, e cerca de 300, são utilizados para fins comerciais como conservantes e aromatizantes de alimentos, produção de perfumes, cosméticos, repelentes, produção de antimicrobianos e antiinflamatórios. Além dessas aplicações, já foram evidenciadas atividades antifúngica, antiviral, antiparasitária e inseticida em muitos óleos essenciais (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Recentemente, Tonuci et al. (2012) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae) *in vitro*, sobre vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni* linhagem LE e observaram, inibição da atividade motora, redução na eliminação de ovos e uma mortalidade significativa dos vermes, nos tratamentos realizados com 100 µg/mL, após um período de 24 horas de incubação.

Em estudo semelhante, Melo et al. (2011) analisaram a atividade esquistossomicida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) e dos compostos isolados, Precoceno I e (E)- Cariofileno, sobre *S. mansoni* linhagem LE

e observaram alterações tegumentares nos vermes, redução na motilidade e um percentual de redução na oviposição de (74,3 %) para o composto Precoceno I e (14,2%) para o composto (E)- Cariofileno, constituintes majoritários do óleo essencial.

Magalhães et al. (2011) avaliaram a eficácia do óleo essencial da *Piper cubeba* L. (Piperaceae) *in vitro*. Os resultados relatados indicaram que este óleo é eficaz contra cercárias, esquistossômulos, e vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem LE. Além disso, este trabalho também destacou o potencial deste óleo essencial para a incorporação em sabonetes e outras formulações farmacêuticas a ser empregado na quimioprofilaxia da esquistossomose.

Parreira et al. (2010) demonstraram o potencial antiparasitário e antimicrobiano do óleo essencial da espécie *Baccharis dracunculifolia*, por meio de estudos *in vitro*. O óleo essencial apresentou atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani* e contra vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem LE. A atividade antimicrobiana foi evidenciada para as espécies, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

Nos últimos anos, as ações farmacológicas e biológicas da *B. trimera* têm sido bastante estudadas. Nesse contexto, os flavonóides eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, apigenina, hispidulina, quercetina, eupatorina, rutina, cirsiolol, canferol, eupatrina, eriodictiol, 5-OH-6,7,3,4-OMe flavona, 5,6-OH-7,3',4'-OMe flavona e 5,7,3,4-OH-3-O-ramnosil-glicosil flavona, foram isolados a partir do extrato metanólico (VERDI et al., 2005; BORELLA et al., 2006). Estudos evidenciaram que esses compostos são responsáveis pelas atividades antimutagênica e anti-hepatotóxica da *B. trimera* (SOICKE et al, 1986; NAKASUGI et al., 1998).

O extrato aquoso de *B. trimera* foi avaliado quanto ao seu efeito biológico em diferentes estudos, como o trabalho de Simões- Pires et al. (2005) que demonstraram suas atividades antiinflamatória e antioxidante. Paul, (2009) avaliou a ação hepatoprotetora e antiinflamatória em modelo experimental de lesões hepáticas induzidas pela Tioacetamida, em ratos Wistar.

Gamberini et al. (1991) comprovaram a atividade anti-diarréica, anti-espasmódica e antiácida, através de um estudo utilizando camundongos, o qual constatou uma redução no transito intestinal e uma redução na secreção hiperácida em lesões gástricas do estômago induzidas por estresse. Oliveira et al. (2005) observaram a redução da glicemia em camundongos, induzidas por estreptozotocina após sete dias de tratamento - indicando uma potencial atividade anti-diabética da *B. trimera*.

Pádua et al. (2010) descreveram a atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, Luize et al., (2005), revelaram a atividade antiparasitária de *B. trimera in vitro*, para as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata Planorbidae) foi estudada a partir de uma lactona diterpênica e de uma flavona isoladas dessa planta (SANTOS- FILHO et al., 1980).

Além dos estudos já descritos, outras atividades biológicas já foram demonstradas com a *B. trimera*, conforme podem ser observadas resumidamente na tabela 1.

Tabela 1: Principais atividades biológicas de *B. trimera* descritas na literatura

Atividades Biológicas	Tipo de Extrato	Referência
Desinfetante e Antisséptico	Decoto	Avancini, C A. M. et al., 2000
Efeito relaxante	Extrato Clorofórmico	Torres, L. M. B. et al., 2000
Anti- Parasitária	Extrato Hidroalcoólico	Luize, P. S. et al., 2005
Hepatorenal	Extrato Hidroalcoólico	Pádua, B.C. et al., 2010
Hipoclicemiante;	Extrato Aquoso	Barbosa- Filho, J. M. et al., 2005
Antiinflamatória	Extrato Aquoso	Paul, E. L. et al., 2009
Imunomoduladora	Extrato Aquoso	Leite, C. E. et al., 2007

Vários estudos biológicos realizados com *B. trimera* confirmam sua eficácia no que se refere à indicação popular, entre eles podemos destacar as atividades antiinflamatórias e hepatoprotetora. Contudo, até o momento, não há ainda pesquisas que relatem alguma atividade específica desta planta no tratamento da esquistossomose mansônica. Sendo assim, tendo em vista que as reações inflamatórias granulomatosas que se formam ao redor dos ovos do parasito no tecido hepático, principal patogenia da esquistossomose mansônica, essa espécie foi escolhida para esse estudo.

Objetivos

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a atividade esquistossomicida de *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo*, sobre a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*, linhagem BH.

2.2 - Objetivos específicos

- Obter as amostras de *B. trimera* (óleo essencial, extratos brutos e frações);
- Analisar por meio de ensaios *in vitro* a ação dessas amostras sobre a motilidade, oviposição, mortalidade, alterações morfológicas e susceptibilidade dos vermes adultos, machos e fêmeas de *S. mansoni*;
- Fracionar quimicamente as amostras bioativas e analisar sua atividade esquistossomicida;
- Analisar as diferentes classes de compostos químicos das amostras obtidas de *B. trimera*, por meio da cromatografia de camada delgada (CCD) e por Cromatografia a Gás acoplada e Espectrometria de Massas (CG - EM);
- Determinar a DL₅₀;
- Analisar por meio de ensaios *in vivo*, as amostras que apresentaram maior ação esquistossomicida durante a triagem *in vitro*, avaliando os seguintes parâmetros: carga parasitária dos animais tratados, quantidade de ovos eliminados nas fezes e alterações no oograma;
- Analisar o efeito dos tratamentos, realizados após 60 dias de infecção por *S. mansoni* em camundongos, sobre a formação de granulomas no fígado por meio de observações histológicas;
- Analisar por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) o efeito do das amostras que apresentaram maior ação esquistossomicida sobre o tegumento do *S. mansoni*.

Material & Métodos

3- MATERIAL & MÉTODOS

3.1- Fitoquímica

3.1.1 - Material Vegetal

Para realização deste estudo foram utilizadas as partes aéreas da *Baccharis trimera* (Less) DC, um cultivar, denominado “CPQBA1”, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Esta variedade foi selecionada pelo processo massal com controle gamético por cinco gerações, incluindo a geração parental sendo cultivada no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP- Campinas (-22°54'20"/-47°03'39") - São Paulo - Brasil. A planta cultivada, foi identificada pelo Prof. Dr. Grady L. Webster (University of Califórnia Davis, USA). A exsicata “typus” está depositada no Herbário do CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, Brasil sob o nº 1286.

3.1.2- Extração do Óleo Essencial (OE) de *B. trimera*

A extração do óleo essencial foi realizada por arraste a vapor em equipamento de inox de 210 L com 23 kg de folhas frescas e talos durante três horas de extração. O óleo resultante foi separado da fase aquosa em funil de separação e estocado em freezer em frasco apropriado.

3.1.3- Obtenção dos Extratos Diclorometânico (ED) e Hidroalcoólico (EHA) a partir das folhas da *B. trimera*

Para obtenção dos extratos, utilizou-se o resíduo vegetal, obtido das partes aéreas da planta fresca da *B. trimera* após a extração do óleo essencial.

Efetuuou-se inicialmente a extração do material moído (100 g) com 800 mL Diclorometano, em dispersor Polytron® por 5 minutos a temperatura ambiente. Filtrou-se o extrato a vácuo em funil de placa porosa e secou-se o extrato a vácuo

em rotaevaporador, obtendo-se o extrato Diclorometânico (ED). Em seguida, de modo análogo, o resíduo da planta foi submetido a uma nova extração utilizando 800 mL de uma solução etanol: água (70:30 v/v), gerando o extrato Hidroalcoólico (EHA). Na figura 7 está apresentado o sistema utilizado na secagem dos extratos.



Figura 7: Sistema de evaporação a vácuo utilizado na secagem dos extratos e frações de *B. trimera*.

3.1.4- Partição Líquido- Líquido do Extrato Diclorometânico (ED)

O extrato ED (4,0 g) foi solubilizado em 120 mL de uma solução de hexano e particionado em funil de separação, gerando a Fração Hexânica (FHE). Em seguida, o resíduo foi re-extraído por mais duas vezes com 120 mL de acetona e água destilada, gerando a fração Acetona/água (FAA). As frações foram agrupadas e secas em rotaevaporador a vácuo.

3.1.5- Partição Líquido- Líquido do Extrato Hidroalcoólico (EHA)

O extrato EHA (1,0 g) foi solubilizado em 30 mL de uma solução de diclorometano e particionado em funil de separação gerando a Fração orgânica (FrO). Em seguida, o resíduo foi re-extraído por mais uma vez com 30 mL de acetona e 30 mL de água destilada, gerando a fração Aquosa (FrA). As frações foram agrupadas e secas em rotaevaporador a vácuo. Na Figura 8 pode ser visualizada a separação das frações obtidas do extrato hidroalcoólico.

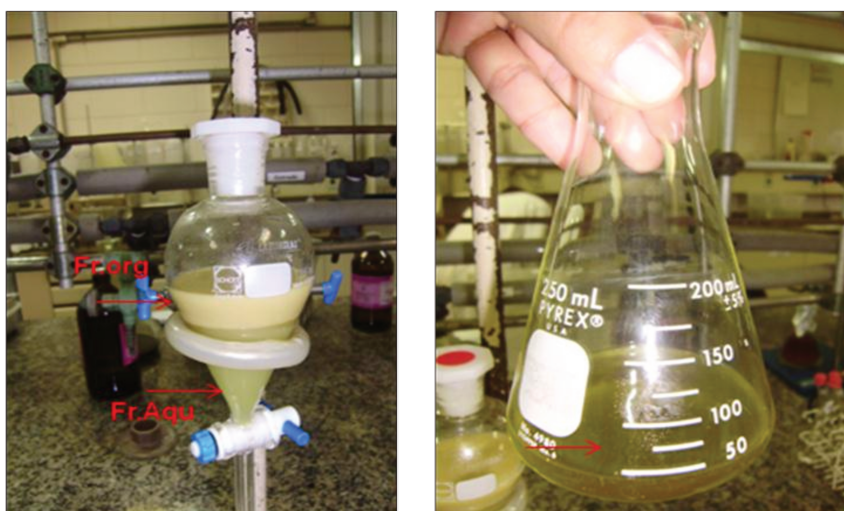


Figura 8: Fotos da partição líquido-líquido do Extrato Hidroalcoólico de *B. trimera*. Obtenção das Frações Orgânica e Aquosa.

3.1.6- Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico (EHA) em Cromatografia do tipo Coluna Seca

Para o fracionamento do extrato EHA (1,15 g), utilizou-se como suporte da fase estacionária uma membrana de acetato de celulose de 32 cm de comprimento e 1,7 cm de diâmetro. A membrana foi preenchida com 50 g de sílica gel 60 Merck (0,063 -0,200 mm) e após adição do extrato na forma de papa (mistura do EHA e sílica gel 1,5 g) sobre a sílica, procedeu-se a eluição utilizando

com o eluente clorofórmio: metanol (70: 30 v/v). A coluna foi dividida em quatro frações de 8 cm cada, denominadas Fr1 (descartada), Fr2, Fr3, e Fr4.

As frações foram filtradas utilizando-se funil de placa porosa em balões de fundo redondo de 250 mL e evaporadas a vácuo em rotaevaporador até a total remoção do solvente.

3.2- Análises Cromatográficas

3.2.1- Cromatografia por Camada Delgada (CCD)

O óleo essencial, os extratos, e frações foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck (0,063 - 0,200 mm).

Os eluentes utilizados nas análises foram definidos de acordo com as características dos compostos presentes nos mesmos de acordo com a tabela 2. As placas foram analisadas sob luz UV a λ 254 e 366 nm, com posterior pulverização de uma solução de anisaldeído e aquecimento em estufa a 100°C.

Tabela 2: Amostras de *B. trimera* analisadas por CCD e seus respectivos eluentes.

Amostras	Eluentes
OE	Diclorometano (97: 3 v/v)
ED e EHA	Clorofórmio:metanol (97: 3 v/v)
Fração Hex e Fração AA	Clorofórmio:metanol (97: 3 v/v)
Fração orgânica (FO) e Fração aquosa (FA)	Clorofórmio:metanol (97: 3 v/v)
Fração 2, 3 e 4	Clorofórmio:metanol (70: 30 v/v)

3.2.2- Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

O óleo essencial foi analisado por CG-EM em Cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890, equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, utilizando coluna capilar HP-5 (25 m x 0,25 mm i.d, x 1,0 µm), nas seguintes condições: temperatura do injetor (220 °C); temp. (250 °C); temp. da coluna (60 °C, 3 °C. min, 240 °C); gás de arraste: He (1,0 mL. min); e injeção Split. O espectrômetro de massas foi operado no modo EI a 70 V numa faixa de m/z de 42 a 350. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca espectral do equipamento (NIST-05), co-injeção de padrões de hidrocarbonetos para calcular os índices de retenção (IR's), e análise dos dados obtidos como descritos por Adams (2007). As porcentagens relativas dos compostos do OE foram expressas como porcentagens obtidas por normalização das áreas dos picos.

3.2.3 - Preparo das amostras de *B. trimera* para os ensaios de atividade esquistossomicida

Após a obtenção das amostras da *B. trimera* utilizando os diferentes métodos fitoquímicos, as mesmas foram preparadas para a execução dos ensaios biológicos contra vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH. Foram avaliadas as seguintes amostras: óleo essencial (OE), extrato bruto diclorometânico (ED), e suas frações, hexânica (FHE) e fração acetona/água (FAA), extrato bruto hidroalcoólico (EHA) e suas frações, aquosa (FrA), fração orgânica (FrO), fração 2, (Fr2), fração 3 (Fr3) e fração 4 (Fr4), e o praziquantel (PZQ). As amostras foram pesadas em balança analítica e solubilizadas em solução tampão PBS 2% (*Phosphate Buffered Saline*) autoclavada acrescida de 0,1 µg/mL de Tween 80 (Polysorbate) MERCK, usado como veículo de solubilização, com o auxílio de ultrassom e Vórtex.

3.3- Modelo Biológico

3.3.1- Parasitas e Animais

Nesse estudo utilizou-se a cepa BH de *S. mansoni* oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil; mantida em moluscos, planorbídeos *Biomphalaria glabrata*, no departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp. Fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss- SPF com 30 dias de idade pesando 20g, previamente infectadas percutaneamente, para a manutenção rotineira da cepa de *S. mansoni*. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

3.4- Ensaio *in vitro*

3.4.1- Obtenção dos vermes adultos de *S. mansoni*

Após quarenta e cinco dias de infecção do hospedeiro definitivo, os camundongos foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical. Os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de acordo com PELLEGRINO & SIQUEIRA, (1956). Os mesmos foram lavados em solução salina estéril, seguido de duas lavagens em meio RPMI-1640 (Nutricell).

3.4.2- Grupos Experimentais

Foram avaliados quatro grupos de estudos expostos a diferentes concentrações de cada amostra obtida de *B. trimera* - (C1) 130 µg/mL; (C2) 91 µg/mL; (C3) 48 µg/mL; (C4) 24 µg/mL (Figura 9). O grupo controle positivo foi exposto ao praziquantel nessas mesmas concentrações. Enquanto o controle negativo foi mantido em meio RPMI-1640 sem adição de extratos e fármacos. Os

parâmetros analisados durante os experimentos foram: motilidade, oviposição, alterações tegumentares e/ou morfológicas e a mortalidade dos parasitas.

Todos os ensaios foram realizados em cinco réplicas e observados durante três dias através de microscópio invertido Leica DMI-500, em intervalos crescentes e regulares de 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 30h, 48h, e 72h. Durante o período de observação após a exposição das amostras de *B. trimera*, para avaliar a motilidade, foi atribuída uma escala de movimentação dos vermes sendo- (0) para ausência de motilidade; (1) para motilidade baixa; (2) para motilidade moderada e (3) para motilidade intensa.

A	C1 130µg/ mL	C1 130µg/ mL	C1 130µg/ mL	C1 130µg/ mL	C1 130µg/ mL	CTRL
B	C2 91µg/mL	C2 91µg/mL	C2 91µg/mL	C2 91µg/mL	C2 91µg/mL	CTRL
C	C3 48µg/mL	C3 48µg/mL	C3 48µg/mL	C3 48µg/mL	C3 48µg/mL	CTRL
D	C4 24µg/mL	C4 24µg/mL	C4 24µg/mL	C4 24µg/mL	C4 24µg/mL	CTRL

Figura 9: Grupos experimentais para os ensaios *in vitro* utilizando diferentes concentrações das amostras de *B. trimera* sobre os vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

3.4.3- Procedimento Experimental

Todos os procedimentos realizados durante os ensaios *in vitro*, foram executados em cabine de proteção biológica. Os materiais utilizados foram cuidadosamente lavados e esterilizados em autoclave. Após a recuperação e lavagem dos vermes adultos, machos e fêmeas de *S. mansoni*, um casal de

vermes acasalados foi transferido para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços contendo as amostras de *B. trimera* e meio de cultura, RPMI-1640 (Nutricell) suplementado com 1% de penicilina (100 UI /mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Nutricell), totalizando um volume final de 2 mL por poço. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

3.4.4- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi utilizada como ferramenta para avaliar as alterações morfológicas dos vermes adultos de *S. mansoni* após os tratamentos *in vitro* com as amostras de *B. trimera* que apresentaram melhor atividade esquistossomicida. Os vermes foram expostos a uma dose letal (C1) 130 µg/mL e incubados por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Estes foram lavados com tampão cacodilato de sódio (pH 7.2), fixados em glutaraldeído 2,5 % (pH 7.4) durante 24 horas e pós fixado em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. A desidratação foi feita em uma série crescente de solução de etanol e as amostras foram secas em câmara de ponto crítico. Em seguida, as mesmas foram montadas sobre 'stubs' e cobertas com uma fina camada de ouro no "sputter coat". O material foi analisado e fotografado em Ultramicroscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM- 820.

3.4.5- Determinação da DL₅₀

O cálculo da dose letal mediana (DL₅₀) das amostras de *B. trimera* avaliadas nos ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro* foi realizado utilizando o programa Origin 7.

3.5- Ensaios *in vivo*

3.5.1- Hospedeiro Definitivo para os Ensaios *in vivo*

Para realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos albinos, fêmeas da linhagem Balb/C, com 30 dias de idade, pesando aproximadamente 20g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampas metálicas e receberam alimentação e água “*ad libitum*”. No manejo, os animais foram mantidos em gaiolas com maravalha autoclavada, com duas trocas semanais. Estes permaneceram em estante ventilada ALESCO, a fim de ampliar os níveis de segurança contra possíveis contaminações.

3.5.2- Infecção do Hospedeiro definitivo para os Ensaios *in vivo*

As fêmeas de camundongos Balb/C foram expostas individualmente para infecção, através da imersão caudal em suspensão cercariana contendo 70 cercárias em tubos de ensaio por um período de 2 horas, com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28°C. Para conter os animais durante o processo foram utilizados dispositivos específicos.

Após o período de exposição dos camundongos na suspensão cercariana, foi avaliada a quantidade de cercárias que não penetraram com o auxílio de estereomicroscópio. Para cada grupo de estudo foram infectados 30 animais, os quais foram distribuídos em seis gaiolas, com cinco camundongos em cada. (OLIVER & STIREWALT, 1952).

3.5.3 - Grupos Experimentais para os Tratamentos

Para a realização dos tratamentos *in vivo*, os camundongos (n-150), foram organizados em cinco grupos experimentais, de 30 animais cada, como esquematizado na Figura 10. Todos os grupos foram tratados em dose única, via oral, através de tubagem esofágica. As concentrações foram calculadas de acordo com o peso do animal e expressas em mg/kg para cada grupo experimental. Foram administradas 0,3 mL de cada amostra de *B. trimera* nas concentrações, 200mg/kg; 100mg/kg; 40mg/kg, após 60 dias de infecção para avaliar o efeito da *B. trimera*. O grupo controle negativo infectado, recebeu 0,3 mL de solução tamponada PBS + 0,001% de Tw 80. O grupo controle positivo infectado foi tratado com praziquantel nas mesmas concentrações das amostras de *B. trimera*. Duas semanas após o tratamento, os animais foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical.

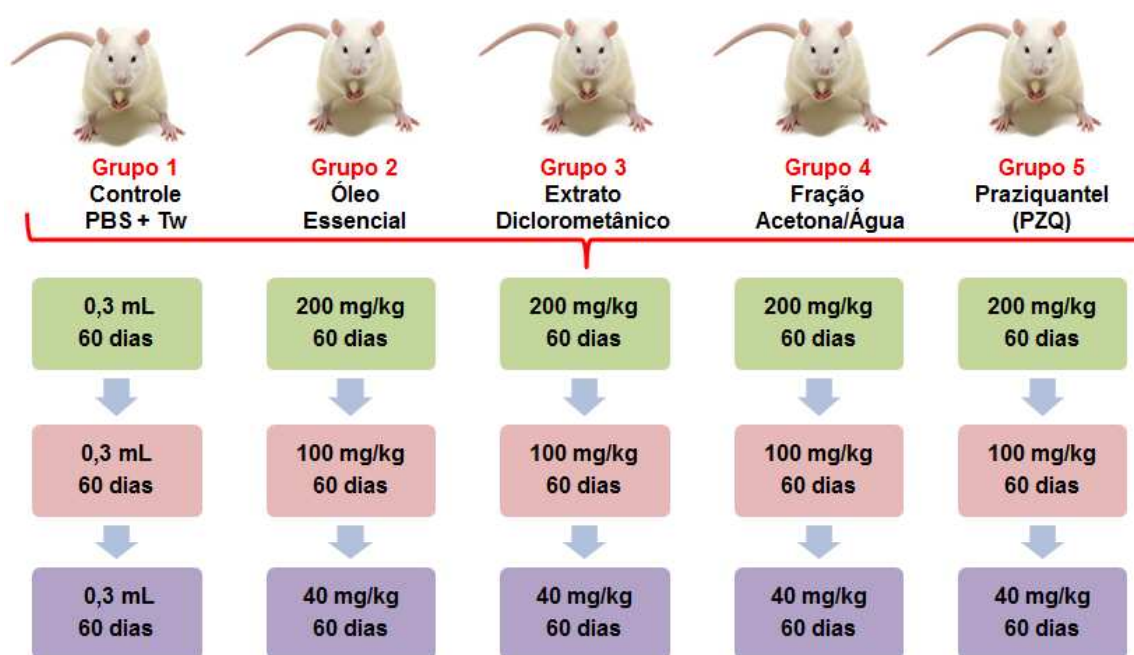


Figura 10: Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos, com as amostras de *B. trimera* OE, ED, FAA e PZQ, e as respectivas concentrações para avaliação *in vivo* contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após 60 dias de infecção.

3.6- Acompanhamento e Finalização dos Tratamentos

3.6.1- Recuperação dos Vermes Adultos de *S. mansoni* e Análise dos órgãos

Após 15 dias do tratamento (Figura 11), os camundongos foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático de acordo com PELLEGRINO & SIQUEIRA, (1956). Os vermes recuperados foram colocados em placa de Petri contendo solução salina NaCl 0,85%, estes foram quantificados e identificados segundo o sexo e vermes acasalados bem como a localização em que se encontravam. Em seguida, foi retirado um pequeno fragmento do fígado e fixado em formaldeído 10% para realização das análises histopatológicas. A outra porção do fígado, e dos demais órgãos, baço, pulmão e intestino, foram comprimidos entre duas placas de vidro, e posteriormente analisados, em estereomicroscópio, para pesquisa de vermes.

3.6.2- Oograma

Para avaliar do efeito do tratamento realizado com *B. trimera* sobre a distribuição de ovos de *S. mansoni* nos tecidos intestinais, um fragmento de 0,5 cm do intestino delgado foi retirado para realização do oograma, onde foram quantificados os ovos nos seus diferentes estágios de maturidade -1º ao 5º estágio e ovos mortos- (HERMETO et al., 1994). Para tanto foram analisados 10 campos aleatórios, em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. A classificação dos estágios de desenvolvimento está de acordo com o critério proposto por PELLEGRINO et al. (1962).

3.6.3- Exame de fezes

A análise do exame de fezes teve como objetivo quantificar os ovos eliminados pelos camundongos após 15 dias de tratamento. Para isto, foi

realizada a coleta das fezes dos camundongos antes da eutanásia, as quais foram examinadas pelo o método quantitativo de Kato- Katz (KATZ et al., 1972).

3.6.4- Análise Histopatológica

As análises dos tratamentos *in vivo* sobre os granulomas hepáticos foram realizadas por meio da histopatologia do fígado. Para análise foram escolhidos três fragmentos do fígado de cada tratamento, em períodos e concentrações diferentes. As peças fixadas em formaldeído 10% foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina. Esse experimento teve como objetivo quantificar, medir os diâmetros e avaliar o infiltrado celular inflamatório ao redor dos granulomas. Para tais avaliações utilizou-se a microscopia de campo claro seguida da captura de imagens e processamento destas, com auxílio do programa “Image Manager 50”.

Foram quantificados todos os granulomas presentes em 10 campos aleatórios de um corte histológico. Porém, somente foram medidos os diâmetros, maior e menor, dos granulomas que apresentavam um ovo de *S. mansoni* em seu núcleo. Para uma melhor delimitação da reação granulomatosa os cortes histológicos foram corados com Tricrômio de Masson.

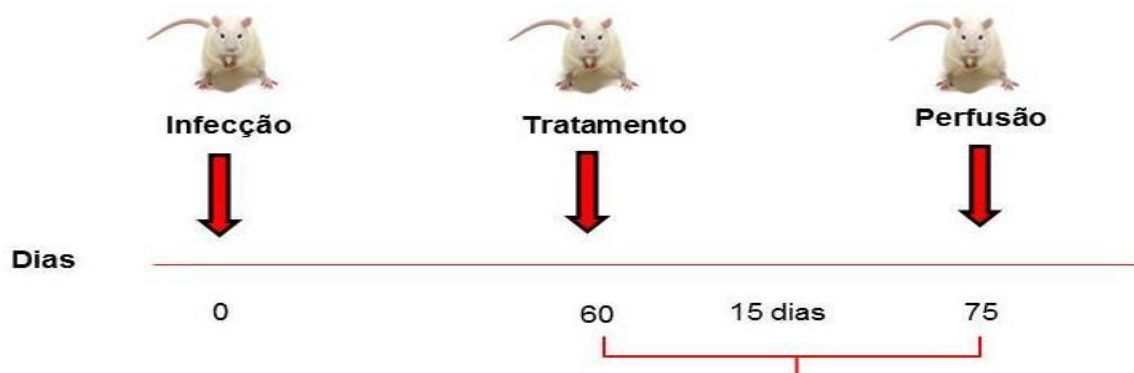


Figura 11: Esquema do processo de infecção, tratamento e perfusão dos camundongos para realização dos ensaios *in vivo*.

3. 7- Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software estatístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc, Carry, NC, EUA). Foi aplicada a Análise da Variância (ANOVA) e o Duncan's Multiple Range Test, utilizado para comparar as medianas das respostas entre os grupos tratados com as amostras de *B. trimera* e os grupos controles, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

3.8- Comitê de Ética

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais CEUA/Unicamp, por estar de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob protocolo nº 2170-1.

4. Resultados

4.1- Análises Fitoquímicas

4.2- Obtenção e Rendimento das Amostras de *B. trimera*

No fluxograma abaixo (Figura 12), estão apresentadas as etapas realizadas para a obtenção das amostras da *B. trimera* e seus respectivos rendimentos, (1) Óleo essencial - OE, (2) Extrato Diclorometânico - ED, (3) Fração Hexânica - FHE, (4) Fração Acetona/ Água, - FAA (5) Extrato Hidroalcoólico - EHA, (6) Fração Orgânica – FrO, (7) Fração Aquosa - FrA, (8) Fração 2 - Fr2, (9) Fração 3 - Fr3, (10) Fração 4 - Fr4, submetidas aos ensaios de atividade biológica, *in vitro* contra *S. mansoni* linhagem BH. Foram utilizados diferentes métodos fitoquímicos para obtenção de cada amostra, como descrito no item (3.1), os rendimentos finais apresentaram valores variados e foram calculados de acordo com as massas iniciais de cada amostra.

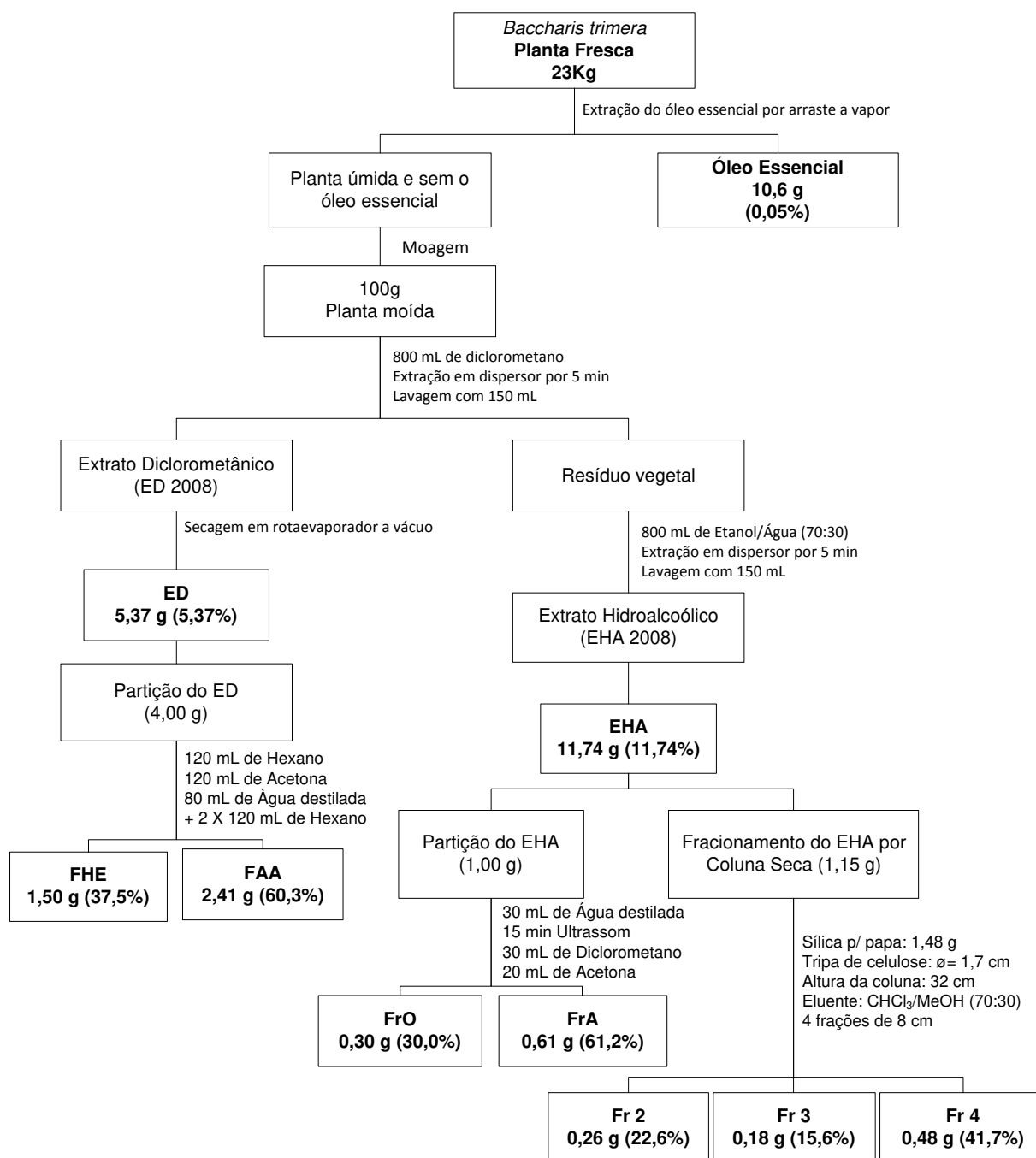


Figura 12: Fluxograma de obtenção das amostras de *Baccharis trimera* e seus rendimentos para realização dos ensaios de atividade esquistossomílicas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

4.3- Análises Cromatográficas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todas as amostras de *B. trimera* submetidas aos ensaios de atividade esquistossomícida foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com o intuito de identificar os compostos presentes nas diferentes amostras (1) OE, (2) ED, (3) FHE, (4) FAA, (5) EHA, (6) FrO, (7) FrA, (8) Fr2, (9) Fr3, e (10) Fr4, para isto, foram utilizados diferentes eluentes. Na figura 13 estão representados os perfis cromatográficos das amostras de *B. trimera* citadas acima.

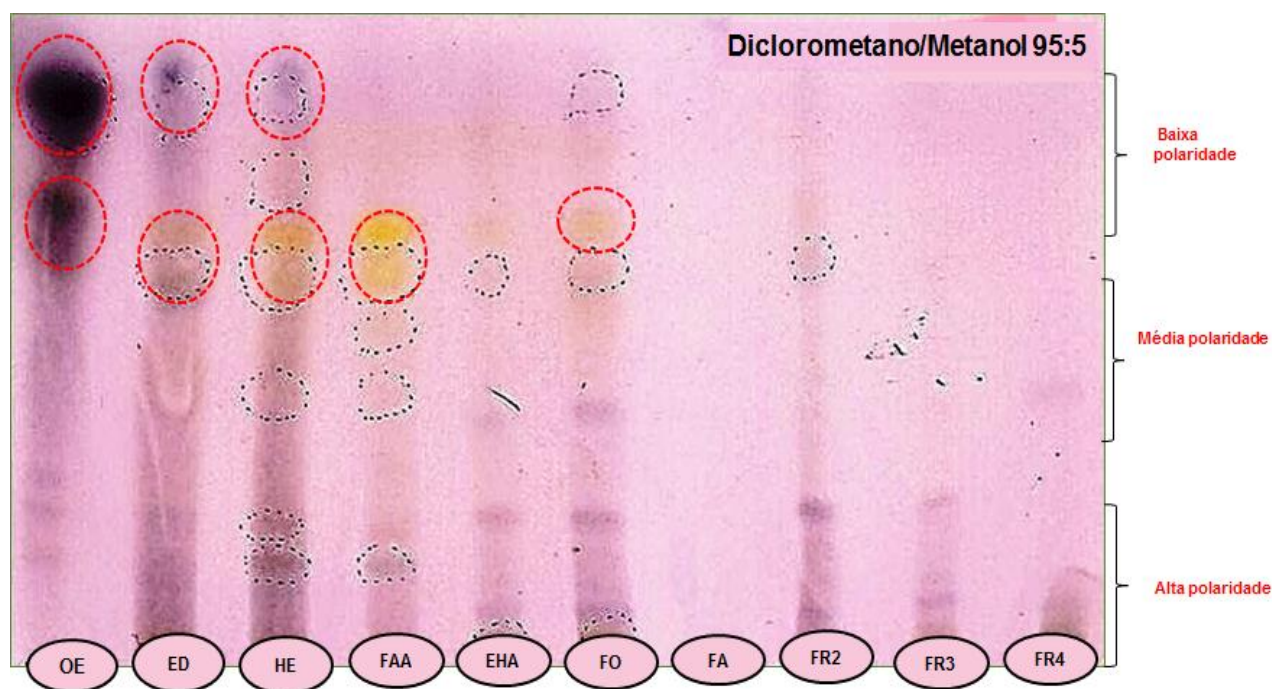


Figura 13: CCD de todas as amostras de *B. trimera* utilizadas para os testes de atividade esquistossomícida contra *S. mansoni*, linhagem BH. Eluente: CHCl₃ ; MeOH (97:3 v/v) e revelador anisaldeído.

4.4- Análise por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

O óleo essencial de *B. trimera* foi analisado por CG-EM e seu cromatograma pode ser visualizado na Figura 14, destacando as regiões características de mono e sesquiterpenos.

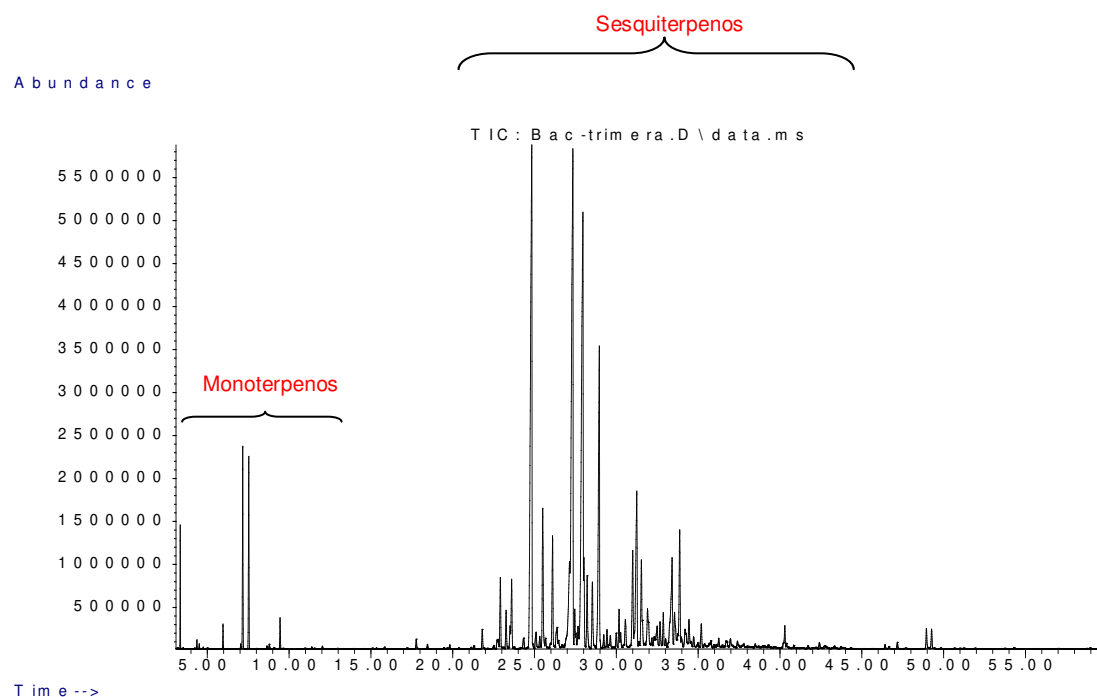


Figura14: Cromatograma do óleo essencial das folhas de *B. trimera* (Less) DC, obtidos por CG-EM.

Os compostos identificados no OE e suas porcentagens relativas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Compostos do óleo essencial de *B. trimera* (Less) DC. identificados por CG-EM, Índices de Retenção calculados e teóricos e porcentagens relativas de cada composto.

t_R (min)	Compostos	Formula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	IR _{cal}	IR _{lit}	% Relativa
7,17	β -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136,13	978	979	2,25
7,54	β -Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	136,13	991	990	2,11
Monoterpenos						4,36
22,91	α -Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1375	1376	1,18
23,60	β -Elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1392	1390	1,20
24,83	Trans-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1421	1419	14,77
25,51	α -Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1438	1439	2,55
26,10	α -Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1453	1454	2,05
27,14	γ -Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1478	1479	2,95
27,34	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1483	1485	15,31
27,95	Biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1498	1500	14,67
28,02	α -Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1500	1500	1,25
28,22	δ -Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1505	1509	1,40
28,54	γ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1513	1513	1,37
28,96	δ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204,19	1524	1523	6,83
31,00	Espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220,18	1577	1578	2,04
31,25	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,20	1584	1590	4,19
31,53	Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₄	222,20	1591	1592	2,00
31,91	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,20	1601	1602	1,30
33,41	τ -Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,20	1642	1642	3,00
33,87	α -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222,20	1654	1652	2,34
Sesquiterpenos						80,40

tR: tempo de retenção, IR_{cal}: índice de retenção calculado; IR_{lit}: índice de retenção obtido com dados na literatura (ADAMS, 2007).

4.2- Análises Biológicas: Ensaaios *in vitro*

4.2.1- Efeito de *B. trimera* sobre a Motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*

Nesse experimento foram avaliadas as seguintes interações: efeito do tratamento em relação à concentração testada, efeito do tratamento em relação ao período de incubação dos vermes e o efeito do tratamento sobre os vermes, machos e fêmeas. Foi possível observar uma redução significativa na motilidade para todos os tratamentos realizados com as diferentes amostras de *B. trimera*. Além disso, observou-se que mesmo para as concentrações que não produziram um efeito letal nos vermes, estas, ocasionaram a separação dos casais para todas as amostras avaliadas (Tabela 4). Outro fato observado durante os ensaios *in vitro* está relacionado à contração dos vermes machos, mais notadamente para as amostras, óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água e extrato hidroalcoólico antes da ação esquistossomicida.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), todas as interações avaliadas nesse experimento foram consideradas significativas ($p < 0,0001$).

Os grupos tratados com óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração 2 e praziquantel, não apresentaram diferenças estatísticas entre as medianas de acordo com o teste Duncan, quando avaliadas para interação do efeito do tratamento em relação à concentração. No entanto, as demais amostras, fração acetona/água, fração orgânica, extrato hidroalcoólico, fração 3, fração aquosa e fração 4, apresentaram diferenças entre as medianas quando avaliadas para essa mesma interação. A concentração (C1)130 µg/mL apresentou maior diferença significativa em relação às demais concentrações quando comparadas com o grupo controle negativo mantidos apenas em RPMI- 1640.

A avaliação da motilidade em relação ao período de incubação apresentou significância estatística para todas as amostras de *B. trimera* no período de 48 e 72 horas, onde se observou ausência total da atividade motora dos vermes. Esses resultados coincidem com o controle positivo tratado com praziquantel. A análise do tratamento em relação à motilidade dos vermes, machos e fêmeas, evidenciou

uma redução significativa na motilidade dos dois sexos. Nas primeiras seis horas de exposição ao extrato diclorometânico, observou-se ausência de motilidade dos vermes machos. No entanto, a ausência de motilidade dos vermes, machos e fêmeas, apresentou maior significância nos períodos de 48 e 72 horas de incubação demonstrando um efeito dose- resposta quando comparados com o grupo controle negativo, mantidos apenas em RPMI- 1640, no qual os vermes permaneceram com motilidade intensa até o final de todos os experimentos, ou seja, 72 horas. Na tabela 4 podem ser observadas as escalas de movimentação dos vermes, machos e fêmeas, após a exposição das amostras de *B. trimera* em diferentes concentrações por 72 horas de incubação.

Tabela 4: Motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* e número de vermes separados após a exposição à *B. trimera*.

Amostras Avaliadas	Concentração (µg/mL)	Período de observação (horas)	Nº de Casais de Vermes separados	Escala de Movimentação dos vermes			
				0	1	2	3
Óleo essencial	24	0-6	3			2	
	48	24	5	0			
	91	48	5	0			
	130	72	5	0			
Ext.Diclorometânico	24	0-6	2				3
	48	24	5			2	
	91	48	5	0	1		
	130	72	5				
Fração Hexânica	24	0-6	4			2	
	48	24	5		1		
	91	48	5	0			
	130	72	5	0			
Fração Acetona/água	24	0-6	5			2	
	48	24	5	0			
	91	48	5	0			
	130	72	5	0			
Ext. Hidroalcoólico	24	0-6	4				3
	48	24	5			2	
	91	48	5		1		
	130	72	5	0			
Fração Aquosa	24	0-6	1				3
	48	24	2				3
	91	48	4			2	
	130	72	5	0			
Fração Orgânica	24	0-6	1			2	
	48	24	2		1		
	91	48	4	0			
	130	72	5	0			
Fração 2	24	0-6	3			2	
	48	24	5		1		
	91	48	5	0			
	130	72	5	0			
Fração 3	24	0-6	0				3
	48	24	2			2	
	91	48	4			2	
	130	72	4	0			
Fração 4	24	0-6	1				3
	48	24	3				3
	91	48	4		1	2	
	130	72	4	0			
Praziquantel	24	0-6	1			2	
	48	24	3		1		
	91	48	3	0			
	130	72	5	0			
RPMI-1640	0	72	2				3

Escala de Movimentação dos vermes adultos de *S. mansoni*: 0- ausência de motilidade; 1 – motilidade baixa; 2- motilidade moderada; 3- motilidade intensa.

Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

4.2.2- Efeito de *B. trimera* sobre a oviposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni*.

A avaliação da oviposição do *S. mansoni*, teve como principal objetivo observar a capacidade reprodutiva destes parasitas após a exposição das amostras de *B. trimera*. A contagem de ovos eliminados pelas fêmeas de *S. mansoni* foi realizada diariamente e comparada com o grupo controle negativo. A inibição dos ovos eliminados a partir das avaliações foi considerada significativa ($p < 0,0001$) de acordo com as análises estatísticas.

Foi possível observar uma redução de 100 % na produção de ovos quando os parasitas foram expostos ao óleo essencial, extrato diclorometânico, extrato hidroalcoólico, fração aquosa e fração² (Figuras 16, 17, 20, 21 e 23), respectivamente, quando comparadas com o grupo controle negativo. O grupo tratado com praziquantel, também apresentou uma redução de 100% na produção de ovos, como mostrado na figura 15. No entanto, para as demais amostras de *B. trimera*, fração hexânica, fração acetona/água, fração orgânica, fração 3, e fração 4, também foi possível observar uma taxa significativa na redução de ovos (96 %, 94,4 %, 99%, 53,7%, e 88,5 %,) respectivamente (Figuras: 18, 19, 22, 24 e 25).

Durante as observações, foi possível notar a inviabilidade dos ovos eliminados, resultado da má formação do miracídio, esse fato comprova o efeito biológico da *B. trimera* sobre o desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni*. Também foi possível observar que mesmo para as concentrações que não produziram um efeito letal até 72 horas de exposição, quando o parâmetro analisado foi à mortalidade, as amostras avaliadas provocaram a separação dos casais de vermes, além de reduzir significativamente a quantidade de ovos eliminados. Desta forma, de acordo com os resultados apresentados, é possível notar que a *B. trimera* alterou a capacidade reprodutiva dos vermes fêmeas de *S. mansoni*.

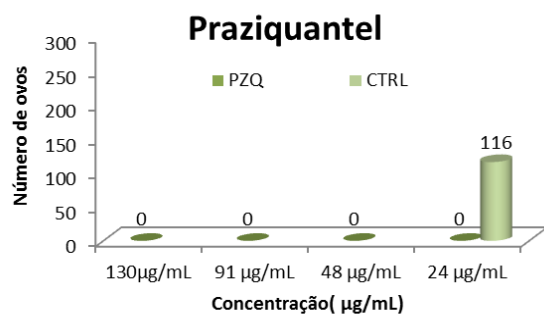


Figura 15: Efeito *in vitro* do praziquantel sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

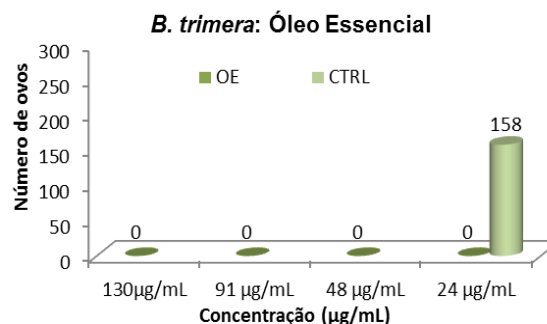


Figura 16: Efeito *in vitro* do Óleo essencial sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

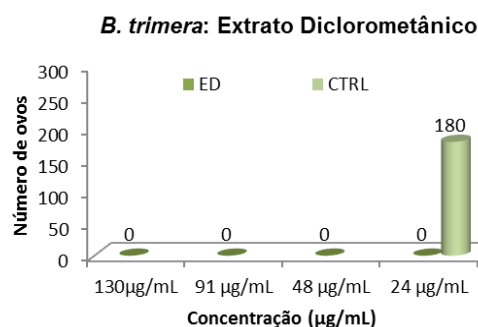


Figura 17: Efeito *in vitro* do Extrato Diclorometânico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

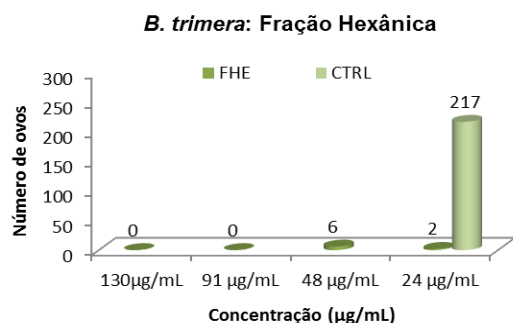


Figura 18: Efeito *in vitro* da Fração Hexânica, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

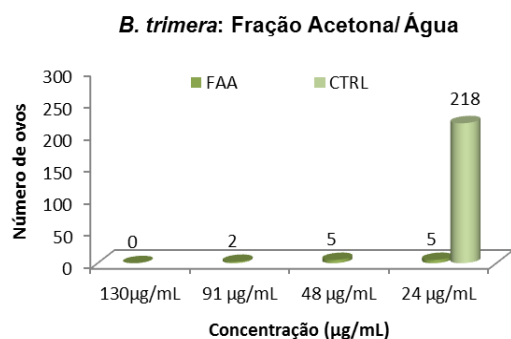


Figura 19: Efeito *in vitro* da Fração Acetona/Água, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

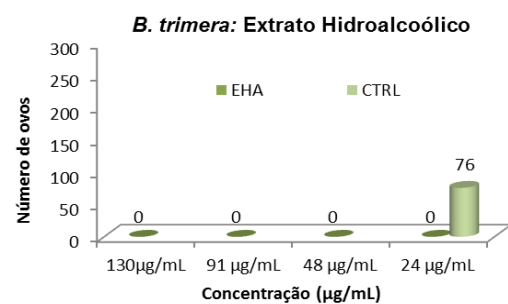


Figura 20: Efeito *in vitro* do Extrato Hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

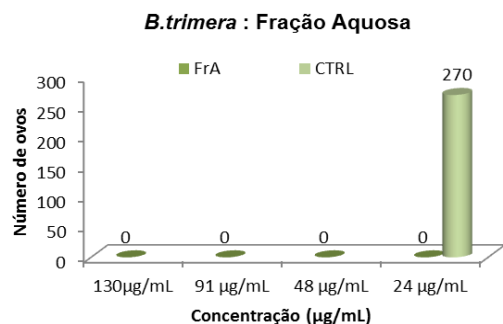


Figura 21: Efeito *in vitro* da Fração Aquosa, obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

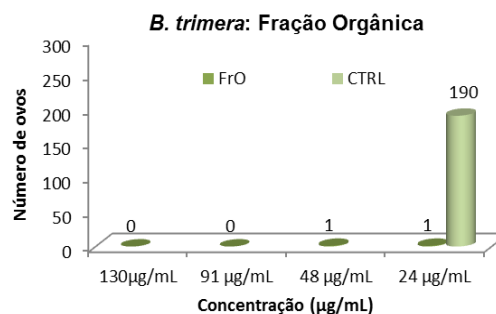


Figura 22: Efeito *in vitro* da Fração Orgânica obtida a partir do extrato hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

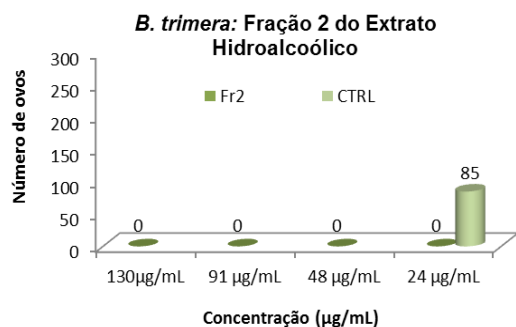


Figura 23: Efeito *in vitro* da Fração 2 obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

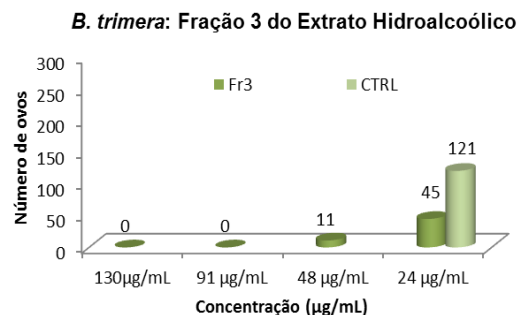


Figura 24: Efeito *in vitro* da Fração 3 obtida a partir do extrato hidroalcoólico, sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

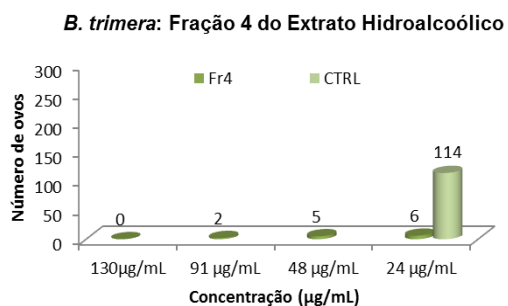


Figura 25: Efeito *in vitro* da Fração 4 obtida a partir do extrato hidroalcoólico sobre a produção de ovos das fêmeas adultas de *S. mansoni* em diferentes concentrações por um período de incubação de 72 horas.

4.2.3- Efeito da *B. trimera* sobre a Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*

Para avaliar a mortalidade do *S. mansoni*, expostos às diferentes concentrações e amostras de *B. trimera*, avaliaram-se as seguintes interações: efeito de *B. trimera* em relação às concentrações avaliadas; efeito de *B. trimera* em relação ao período de exposição aos vermes; efeito das concentrações em relação ao período de incubação dos vermes e o efeito de *B. trimera* em relação à mortalidade dos vermes adultos, machos e fêmeas. A avaliação desses parâmetros permitiu fazer comparações entre o controle positivo tratado com PZQ e com o controle negativo mantidos em RPMI- 1640 sem adição de extratos ou fármacos. Além disso, orientou na escolha do melhor extrato/fração para a realização dos ensaios *in vivo*.

A análise de variância (ANOVA) mostrou-se significativa para todas as interações avaliadas nesse ensaio ($p < 0,0001$). De acordo com as análises do teste Duncan, o efeito da *B. trimera* em relação às concentrações avaliadas, apresentou um nível de significância entre as medianas, para os tratamentos realizados com, óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água e fração 2 (Figuras: 26, 27, 28, 29 e 33), sendo que a melhor concentração para as respectivas amostras foram a (C1) 130 $\mu\text{g/mL}$ e (C2) 91 $\mu\text{g/mL}$, quando comparados com o PZQ (Figura 36) e com o grupo controle mantido em RPMI-1640.

O efeito da *B. trimera* em relação ao período de exposição aos vermes apresentou um maior nível de significância entre as medianas, para os tratamentos realizados com o extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água, fração 2 e com o óleo essencial, após 24, 30 e 48 horas de exposição (Figuras: 27, 28, 29, 33 e 26).

Na comparação do efeito da *B. trimera* em relação à mortalidade dos vermes machos e fêmeas do *S. mansoni*, observamos que os tratamentos realizados com o óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água e fração 2, nas concentrações (C1) 130 $\mu\text{g/mL}$ e (C2) 91 $\mu\text{g/mL}$,

ocasionaram a mortalidade de 100% dos vermes machos e fêmeas em um intervalo de 30 - 48 horas após a exposição, sendo que para o extrato diclorometânico, 60% dos vermes machos morreram nas primeiras seis horas de incubação (Figura 27). O mesmo pôde ser observado no grupo controle positivo, tratado com praziquantel (Figura 36). As demais concentrações (C3) 48 µg/mL e (C4) 24 µg/mL, também ocasionaram uma mortalidade significativa dos vermes machos e fêmeas até 72 horas de incubação.

Os tratamentos realizados com o extrato hidroalcoólico, fração orgânica, fração aquosa, fração 3 e 4, apresentaram diferenças estatísticas entre as medianas quando comparados com o grupo anterior e com o grupo tratado com praziquantel (Figuras: 30, 31, 32, 34, 35 e 36). Em contraste, no controle negativo mantido apenas em meio RPMI- 1640 todos os vermes, machos e fêmeas, permaneceram vivos até o final do experimento, ou seja, 72 horas de incubação. Desta forma observou-se, então, que a morte dos vermes foi diretamente dependente da concentração avaliada. Nos gráficos abaixo podem ser observadas as taxas de mortalidade dos vermes, em relação aos tratamentos, concentrações e período de incubação.

B. trimera: Óleo Essencial

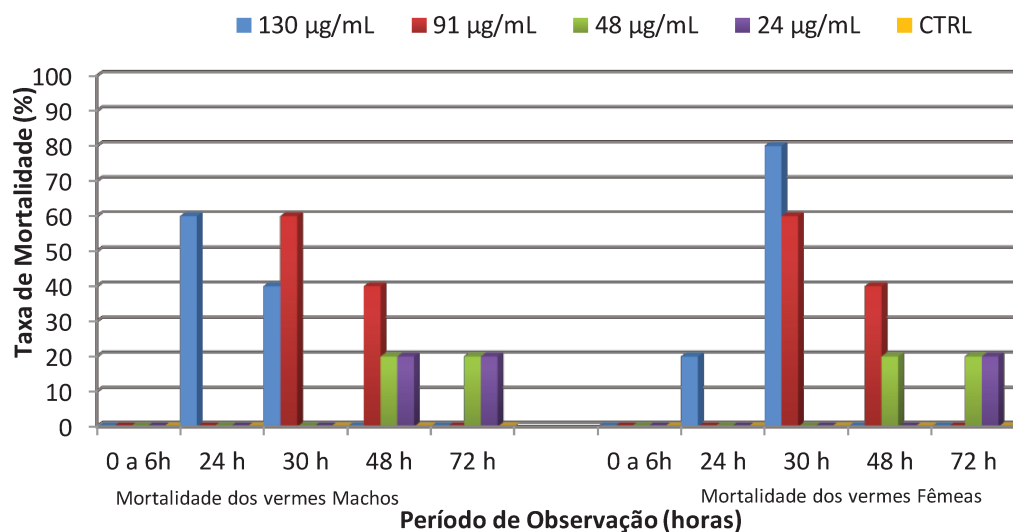


Figura 26: Efeito do óleo essencial de *B. trimera* sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Extrato Diclorometânico

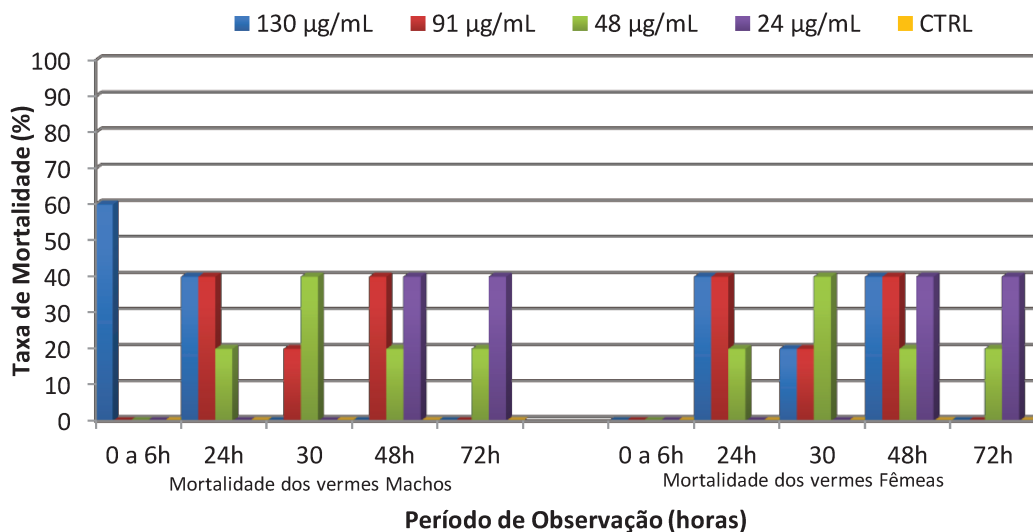


Figura 27: Efeito do Extrato bruto Diclorometânico sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração Hexânica

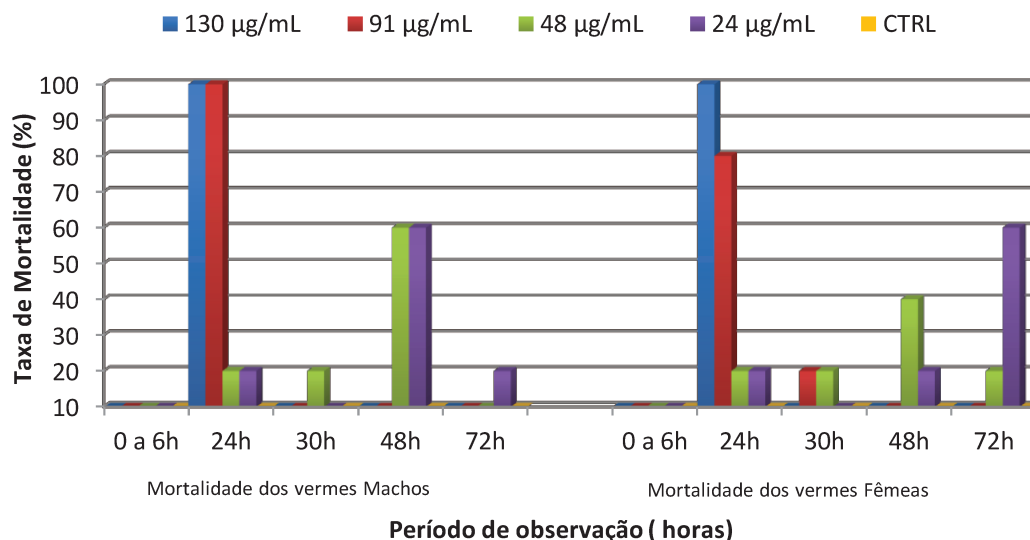


Figura 28: Efeito da fração Hexânica, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração Acetona/Água

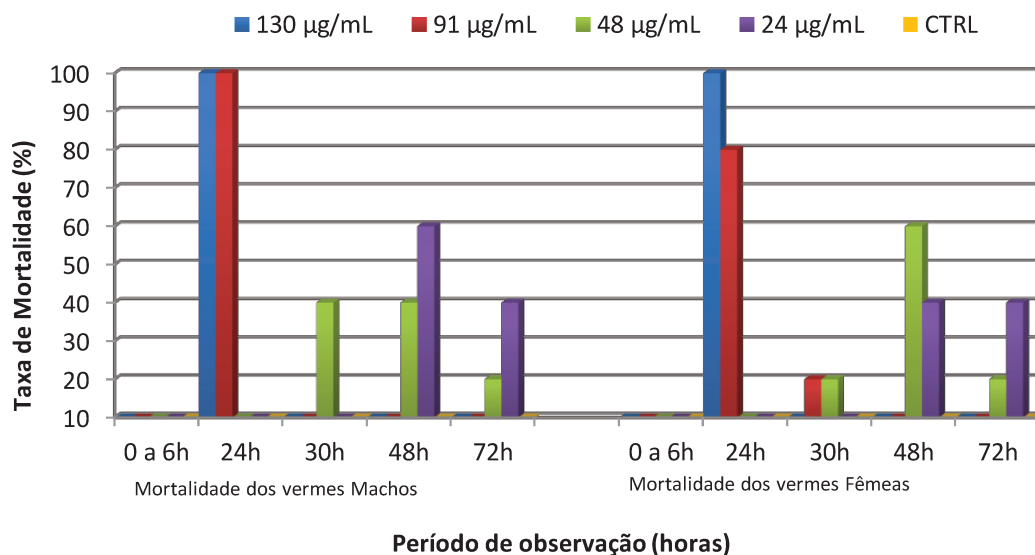


Figura 29: Efeito da fração Água/Acetona, obtida a partir do extrato diclorometânico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Extrato Hidroalcoólico

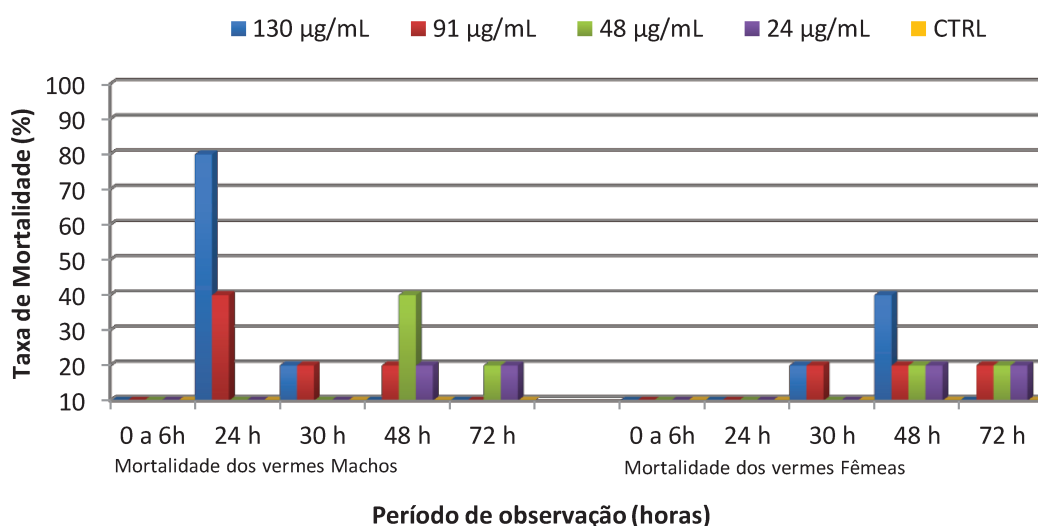


Figura 30: Efeito do Extrato bruto Hidroalcoólico sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração Orgânica

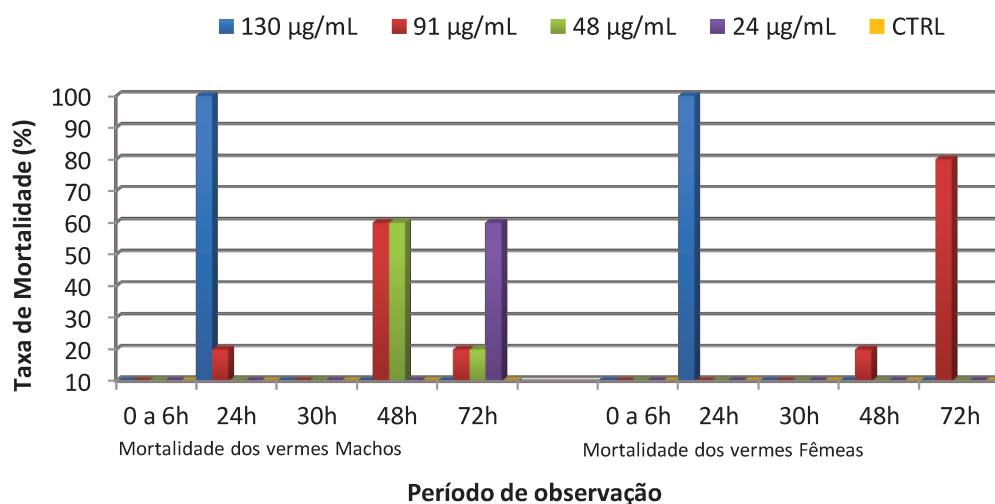


Figura 31: Efeito da Fração Orgânica, obtida do extrato bruto hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B.trimera: Fração Aquosa

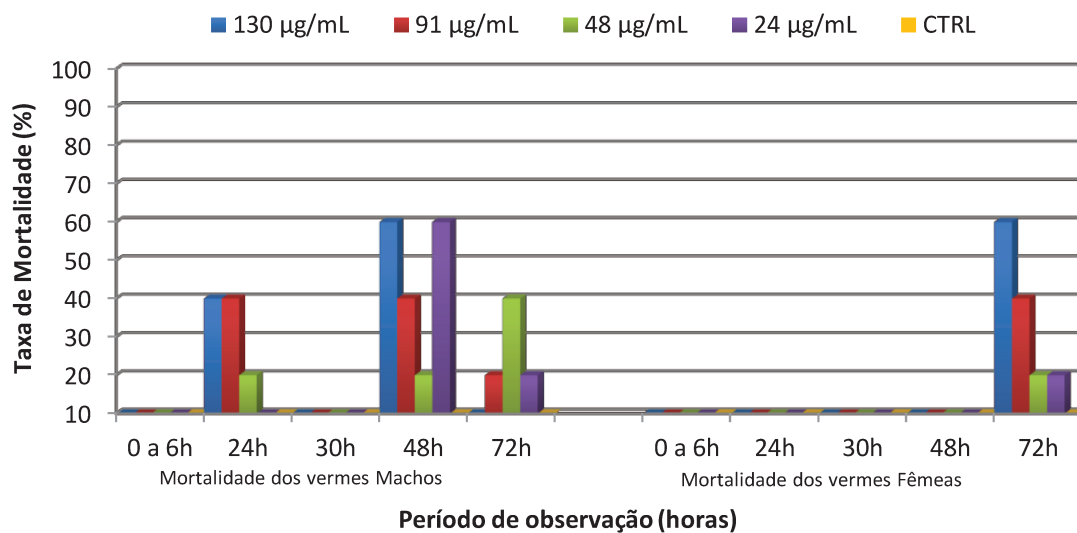


Figura 32: Efeito da Fração Aquosa, obtida do extrato bruto hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração 2

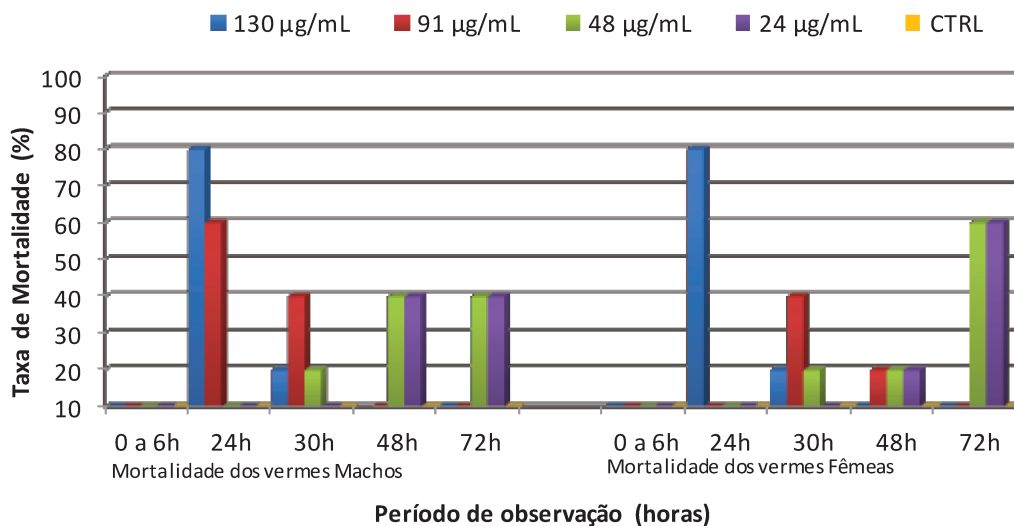


Figura 33: Efeito da Fração 2, obtida do extrato bruto hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração 3

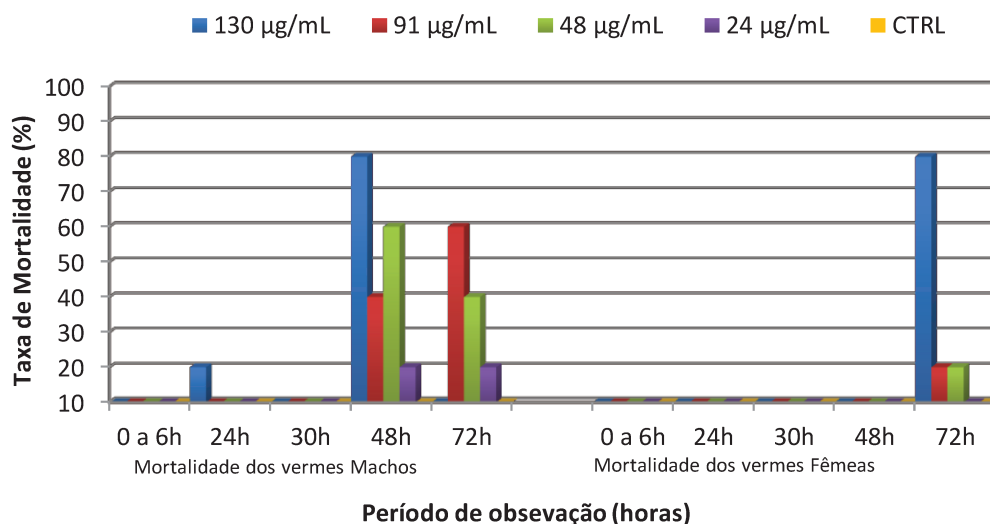


Figura 34: Efeito da Fração 3, obtida do extrato bruto hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

B. trimera: Fração 4

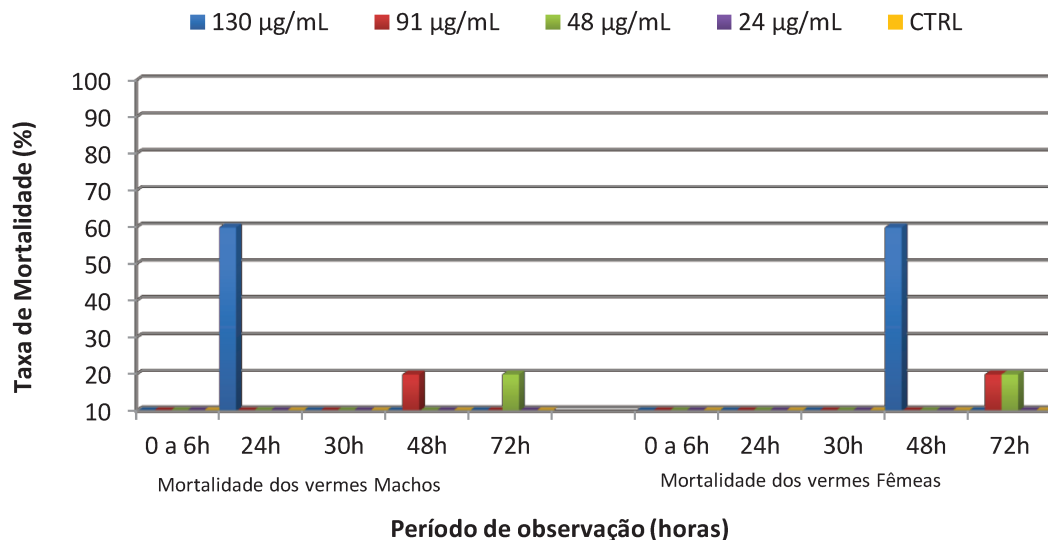


Figura 35: Efeito da Fração 4, obtida do extrato bruto hidroalcoólico, sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

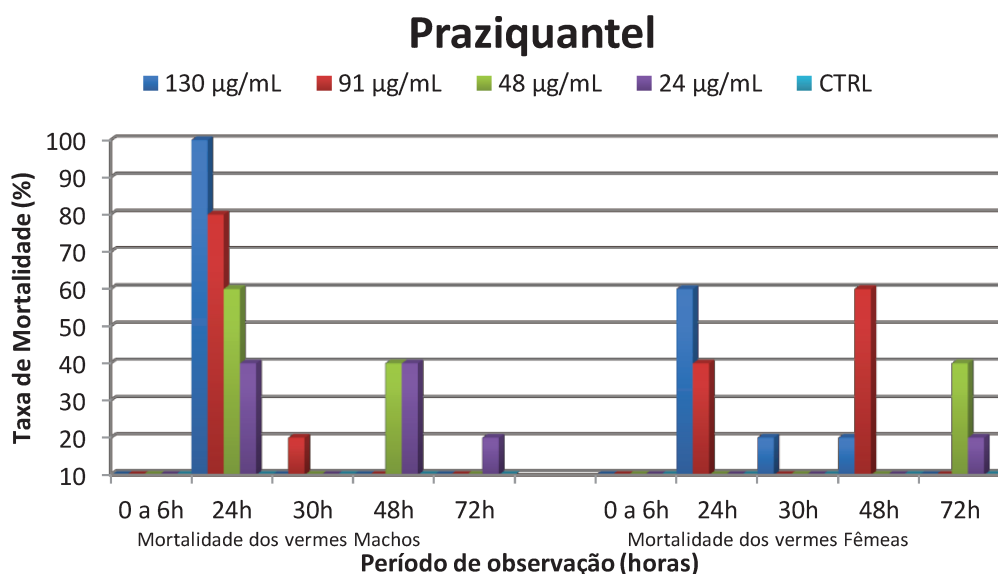


Figura 36: Efeito do praziquantel sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em relação à concentração avaliada e o período de incubação de 72 horas.

4.2.4 – Mortalidade total dos vermes adultos, machos e fêmeas de *S. mansoni* submetidos a diferentes concentrações de *B. trimera* após 72 horas de incubação.

Durante a avaliação da taxa de mortalidade total dos vermes adultos de *S. mansoni*, submetidos aos ensaios *in vitro*, observou-se que o extrato bruto diclorometânico (ED) suas respectivas frações, hexânica (FHE) e acetona/água (FAA) e a Fração2 (Fr2), apresentaram um efeito letal de 100% dos vermes para as concentrações (130, 91 e 48 µg/mL), após 72 horas de exposição. As demais amostras de *B. trimera* também apresentaram uma mortalidade expressiva dos vermes, machos e fêmeas, após as 72 horas de incubação, quando comparadas com o grupo controle mantido em meio RPMI- 1640. Após a análise dos dados foi possível calcular a DL₅₀ para cada amostra avaliada. Os resultados desse ensaio e as respectivas DL₅₀ podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Mortalidade total dos vermes adultos, machos e fêmeas de *S. mansoni* em relação às concentrações avaliadas de cada amostras *B. trimera* após 72 horas de incubação e suas correspondentes DL50.

Mortalidade total dos vermes (%)					
Amostras de <i>B. trimera</i>	C1 13 µg/mL	C2 91 µg/mL	C3 48 µg/mL	C4 24 µg/mL	DL 50 µg/mL
Óleo Essencial	100 %	100 %	40%	40%	38,76
Extrato Diclorometânico	100%	100%	100%	80%	< 24
Fração Hexânica	100%	100%	100%	100%	< 24
Fração Acetona/Água	100%	100%	100%	90%	< 24
Extrato Hidroalcoólico	70%	70%	50%	40%	49,35
Fração Orgânica	100%	100%	40%	-	48,59
Fração Aquosa	80 %	70 %	50 %	50 %	30,90
Fração 2	100%	100%	100%	80%	<24
Fração 3	90 %	60%	60%	20%	48,08
Fração 4	60%	20%	20%	-	185,9
Praziquantel	100%	100%	70%	60%	19,53
Controle - RPMI	-	-	-	-	-

4.2.5- Efeito da *B. trimera* sobre a Morfologia dos vermes adultos de *S. mansoni*

As análises morfológicas dos vermes adultos de *S. mansoni*, por meio da microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram alterações na morfologia dos vermes, machos e fêmeas, expostos a concentração de 130 µg/mL, do óleo essencial, extrato diclorometânico, extrato hidroalcoólico, fração hexânica, fração acetona/água e praziquantel após um período de incubação de 24 horas. Observaram-se alterações morfológicas semelhantes tanto nos vermes machos, quanto nos vermes fêmeas, para os tratamentos realizados com, óleo essencial, fração hexânica e fração acetona/água (Figuras 37, 38, 39).

Nos vermes machos, esses tratamentos causaram alterações na ventosa oral (VO), (Figuras 37-D e 38 -D), além de uma extensa descamação tegumentar e destruição dos tubérculos (TB) e espinhos (E), (Figura 39-D), demonstrando o encurtamento e o desarranjo dos mesmos, em diversas regiões ao longo da superfície corporal. Em relação aos vermes fêmeas, também se observou o enrugamento de uma extensão do tegumento, resultando na diminuição do tamanho do verme (Figura 39-B). Além disso, observou-se uma descamação no tegumento da região dorsal, ocasionando a destruição dos espinhos (E) e das papilas sensoriais (PS), (Figuras 37-B e 38 -B).

O tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico provocou um edema na região dorsal dos vermes, machos e fêmeas, além da destruição dos tubérculos e espinhos dos vermes machos e do tegumento das fêmeas (Figura 40 -B e D). Em relação aos tratamentos realizados com o extrato diclorometânico e com praziquantel, estes, apresentaram similaridades em relação às alterações referentes aos vermes machos (Figuras 41 e 42). Foi possível observar uma contração da musculatura dos vermes e a formação de inúmeras vesículas ao redor das áreas de destruição dos tubérculos e espinhos (Figuras 41- D e 42- D). Quanto aos vermes fêmeas, observou-se a destruição da ventosa oral e acetabular (Figura 41-B).

Os vermes do grupo controle, mantido em meio RPMI-1640, não apresentaram nenhuma alteração nas estruturas do corpo e no tegumento. Os machos apresentaram uma uniformidade no tamanho e na distribuição dos tubérculos e espinhos em toda extensão corporal (Figuras 39-C, 40-C, 41-C, 42-C). Quanto às fêmeas, nenhuma alteração morfológica foi notada, houve conservação da ventosa oral e acetabular e da superfície tegumentar, onde os espinhos e as papilas sensoriais mantiveram-se conservados (Figuras 37-A, 38-A, 39-A, 41-A).

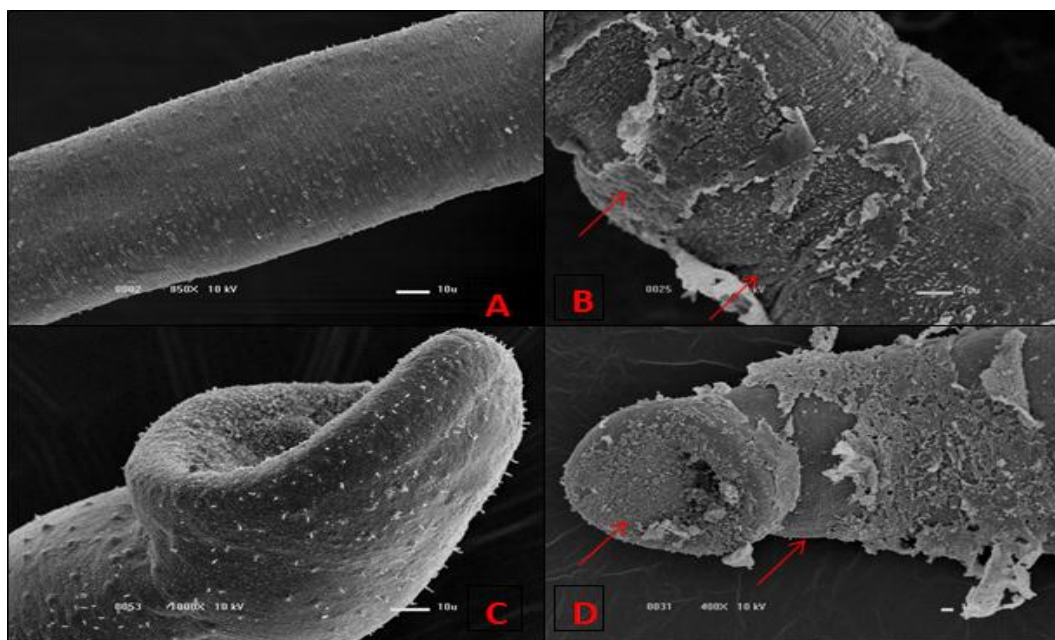


Figura 37: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição do óleo essencial de *B.trimera* na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea- Controle; (B) Verme fêmea, extensa descamação da superfície tegumentar na região ventral; (C) Verme macho- Controle; (D) Verme macho, alterações na ventosa oral e descamação na superfície tegumentar.

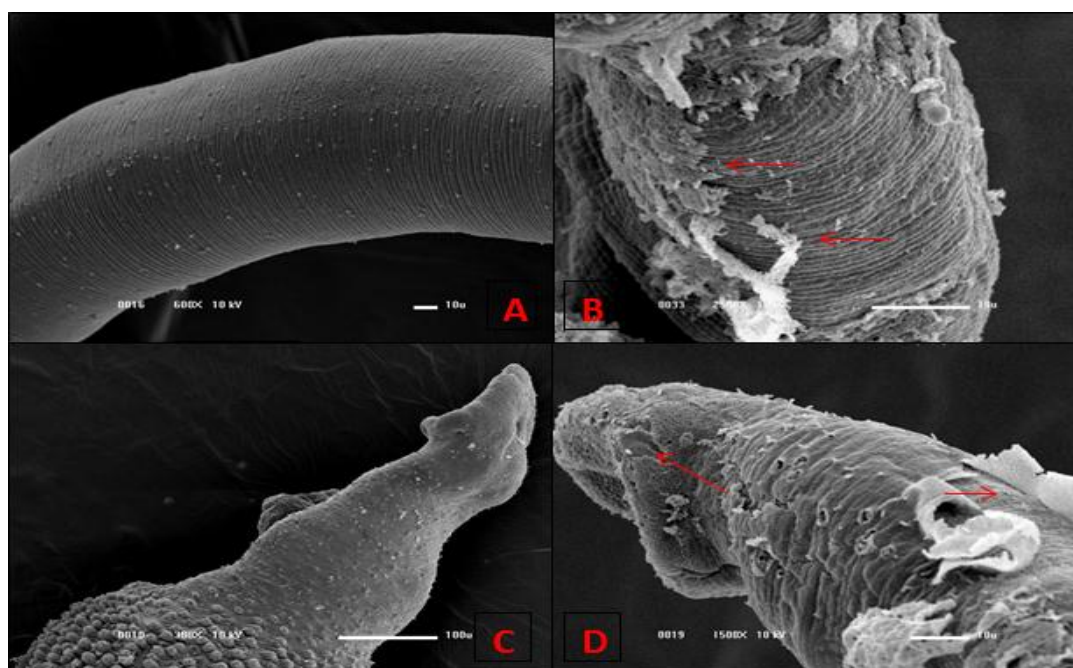


Figura 38: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição da fração hexânica, obtida a partir do extrato bruto diclorometânico, na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea- Controle; (B) Verme fêmea, extensa descamação tegumentar na superfície dorsal; (C) Verme macho-Controle; (D) Verme macho, descamação da superfície tegumentar na região dorsal próxima a ventosa oral.

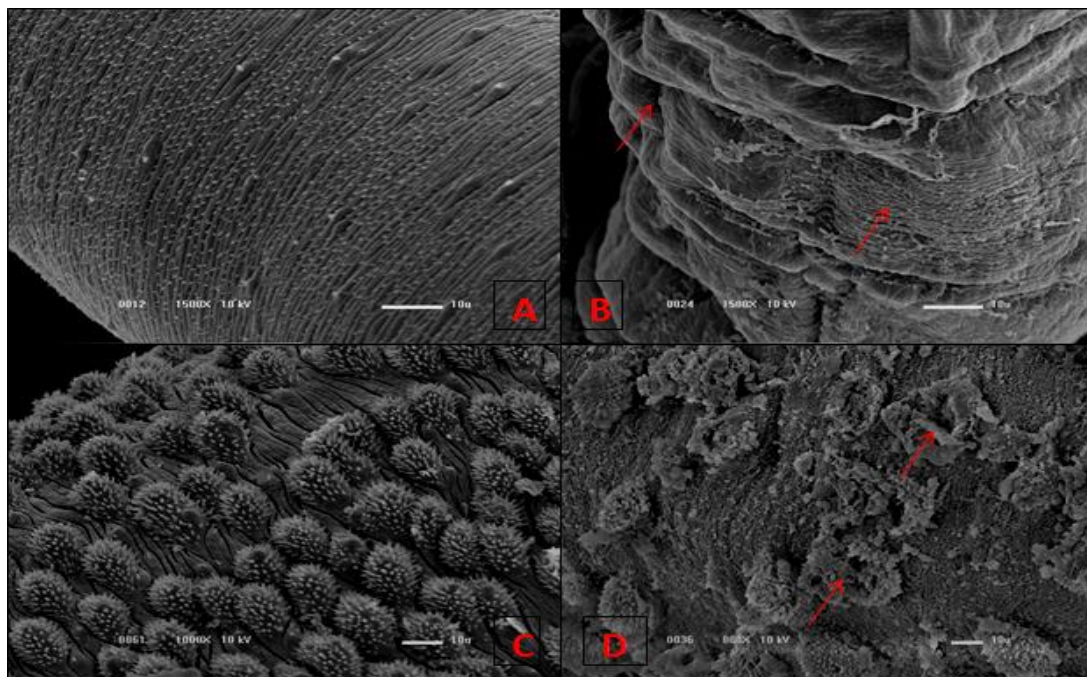


Figura 39: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição da fração acetona/água, obtida a partir do extrato bruto diclorometânico, na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea- Controle; (B) Verme fêmea, contração tegumentar e descamação tegumentar na superfície dorsal; (C) Verme macho-Controle; (D) Verme macho, descamação da superfície tegumentar na região dorsal e destruição dos tubérculos e espinhos resultando em uma superfície lisa.

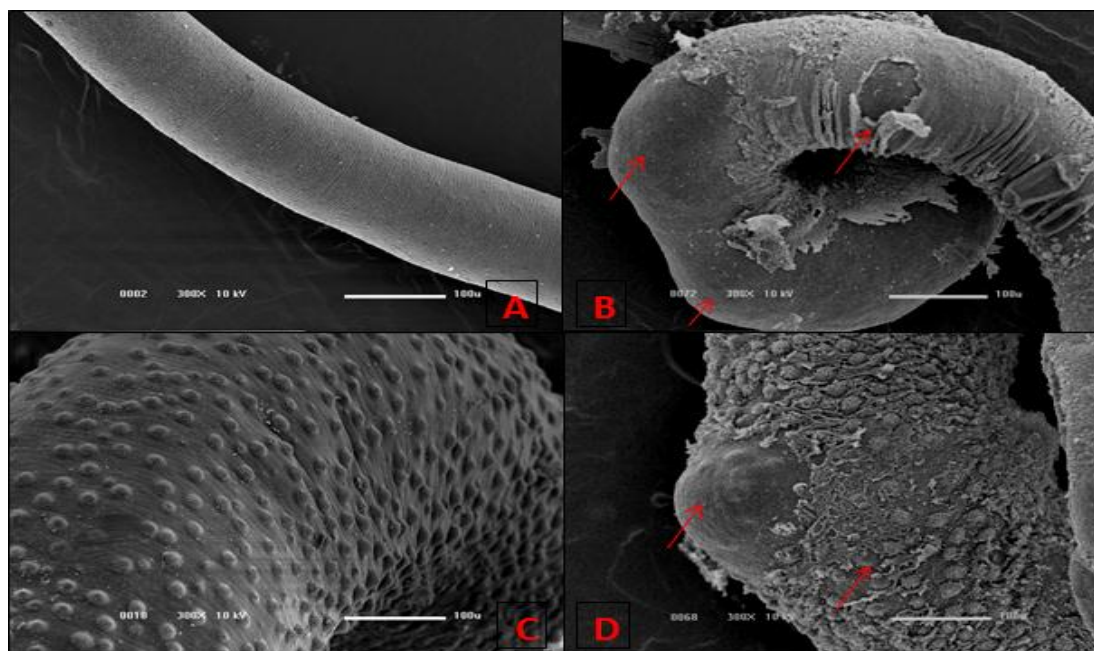


Figura 40: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após a exposição do Extrato hidroalcoólico na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea- Controle; (B) Verme na fêmea, mostrando vesiculação, descamação e erosão na porção anterior da superfície dorsal; (C) Verme macho-Controle; (D) Verme macho, destruição dos tubérculos e espinhos e vesiculação da superfície dorsal.

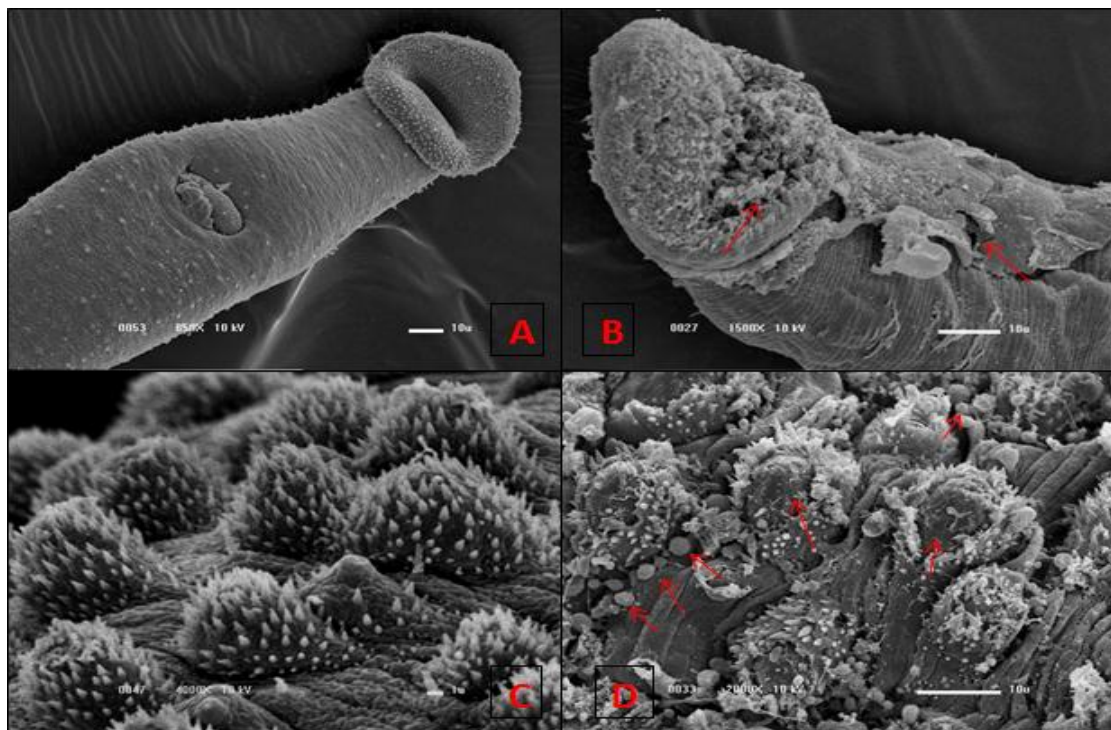


Figura 41: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição do extrato bruto diclorometânico na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Verme fêmea-Controle; (B) Verme fêmea, destruição da ventosa oral e descamação tegumentar; (C) Verme macho- Controle; (D) Verme macho, mostrando a presença de bolhas ao redor das áreas de destruição de tubérculos e espinhos.

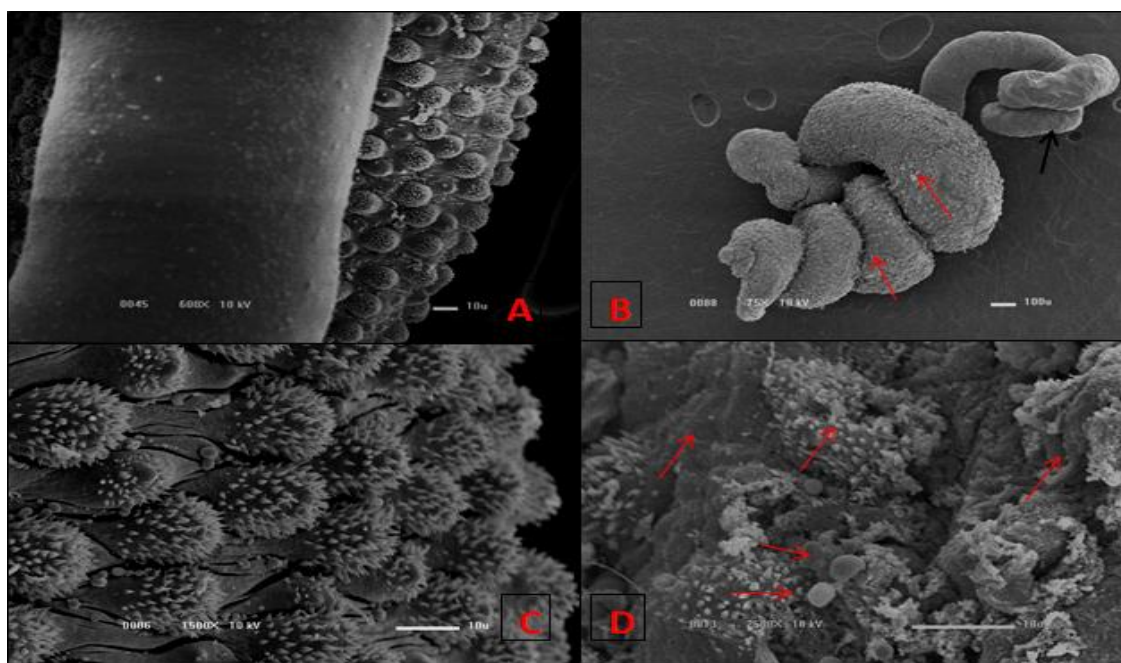


Figura 42: Microscopia eletrônica de Varredura dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após exposição do praziquantel na concentração de 130 µg/mL por um período de 24 horas de incubação. (A) Casal de vermes - Controle; (B) casal de vermes, mostrando a contração da musculatura e descamação da superfície tegumentar; (C) Verme macho- Controle; (D) Verme macho, mostrando a presença de bolhas ao redor das áreas de destruição de tubérculos e espinhos.

4.3- Ensaaios *In vivo*

4.3.1- Efeito de *B. trimera* sobre a carga parasitária dos animais tratados após 60 dias de infecção por *S. mansoni*

A avaliação do efeito da *B. trimera* sobre a carga parasitária de *S. mansoni* teve como objetivo analisar a eficácia terapêutica dos tratamentos *in vivo* realizados com óleo essencial, extrato diclorometânico, fração acetona/água, e com praziquantel - controle positivo.

Nesse estudo, observou-se que o total de vermes recuperados no sistema porta hepático, nas veias mesentéricas e nos órgãos, foi alterado de acordo com o tratamento e a concentração avaliada. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre todos os grupos avaliados em relação ao grupo controle, infectado e não tratado, óleo essencial ($p < 0,0001$); extrato diclorometânico ($p < 0,0001$); fração acetona/água ($p < 0,0001$); praziquantel ($p < 0,0015$). Não houve significância estatística entre os tratamentos, quanto ao número de vermes encontrados nos órgãos e em relação à hepatoesplenomegalia dos animais avaliados.

Os resultados evidenciaram uma diferença na proporção entre machos e fêmeas, recuperados após a perfusão dos animais tratados. Contudo, foi possível observar que os vermes fêmeas foram mais suscetíveis aos tratamentos realizados com as amostras de *B. trimera*, quando comparados com o grupo tratado com praziquantel (Figuras, 43 e 44).

O grupo tratado com a fração acetona/água, na concentração de 40 mg/kg, apresentou um menor número de vermes fêmeas ($\bar{X}$ 1,8) em relação aos vermes machos ($\bar{X}$ 2,6). Os grupos tratados com o óleo essencial e com o extrato diclorometânico, na concentração de 100 mg/kg, também mostram que as fêmeas foram mais suscetíveis aos tratamentos do que os vermes machos quando comparadas com o grupo controle negativo ($\bar{X}$ 2,2); ($\bar{X}$ 4,5); ($\bar{X}$ 1,7); ($\bar{X}$ 4,4); ($\bar{X}$ 7,9); ($\bar{X}$ 9,6) respectivamente. Em relação à concentração de 200 mg/kg, observamos que os grupos tratados com o óleo essencial mantiveram uma redução de vermes fêmeas superior aos vermes machos, ($\bar{X}$ 2,0); ($\bar{X}$ 4,5). Além

disso, a fração acetona/ água e o extrato diclorometânico também apresentaram diferenças entre as proporções de fêmeas e machos recuperadas após o tratamento ($\bar{X}$ 1,8); ($\bar{X}$ 4,4); ($\bar{X}$ 2,2); ($\bar{X}$ 4,5), respectivamente.

Em relação aos grupos tratados com praziquantel apenas aqueles que receberam a concentração de 40 mg/kg apresentaram uma redução significativa dos vermes fêmeas em relação as demais amostras de *B. trimera* ($\bar{X}$ 2,3); ($\bar{X}$ 3,6), respectivamente. Desta forma, podemos observar que a diferença em relação à proporção de vermes, machos e fêmeas, recuperados após os tratamentos com a *B. trimera*, dependeu da amostra e da concentração avaliada, quando comparados com o grupo controle negativo, infectado e não tratado, o qual apresentou uma média de ($\bar{X}$ 9,6), de vermes machos e ($\bar{X}$ 7,9) de vermes fêmeas, após a perfusão.

Em relação ao percentual de redução total de vermes (RV) dos grupos tratados em comparação ao grupo controle, infectado e não tratado, foi possível observar que os tratamentos realizados com a fração acetona/água com praziquantel e com o óleo essencial, na concentração de 40 mg/kg, apresentaram maiores reduções de vermes (69,4%); (60,4%) e (53,3%) respectivamente. Em relação à concentração de 100 mg/kg as amostras também diferiram quanto ao percentual de redução de vermes, o extrato diclorometânico (71,6%) e óleo essencial (60%) apresentaram maiores percentuais de redução quando comparados com o praziquantel (34,9%). Contudo, na concentração de 200 mg/kg, foi possível observar que essas mesmas amostras (ED) e (OE), apresentaram o maior percentual de redução de verme, (59,2 %) e (58%), respectivamente. Como pôde ser observada, apenas a concentração de 40 mg/kg apresentou uma maior redução do número de vermes para o tratamento realizado com o controle positivo, tratado com praziquantel. O percentual de redução dos vermes pode ser observado na Figura 45.

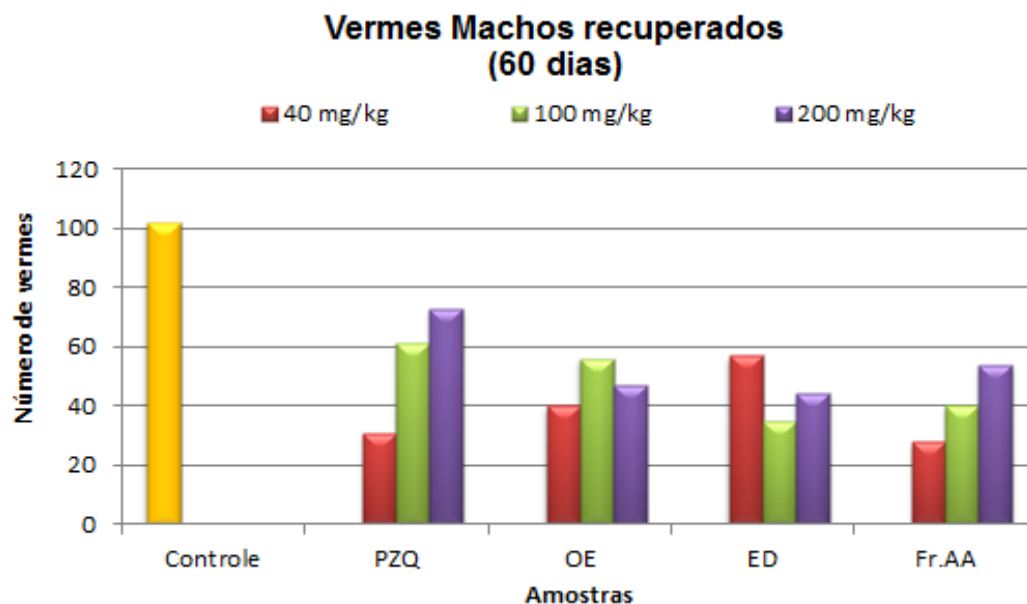


Figura 43: Quantidade de vermes Machos de *S. mansoni* recuperados após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água.

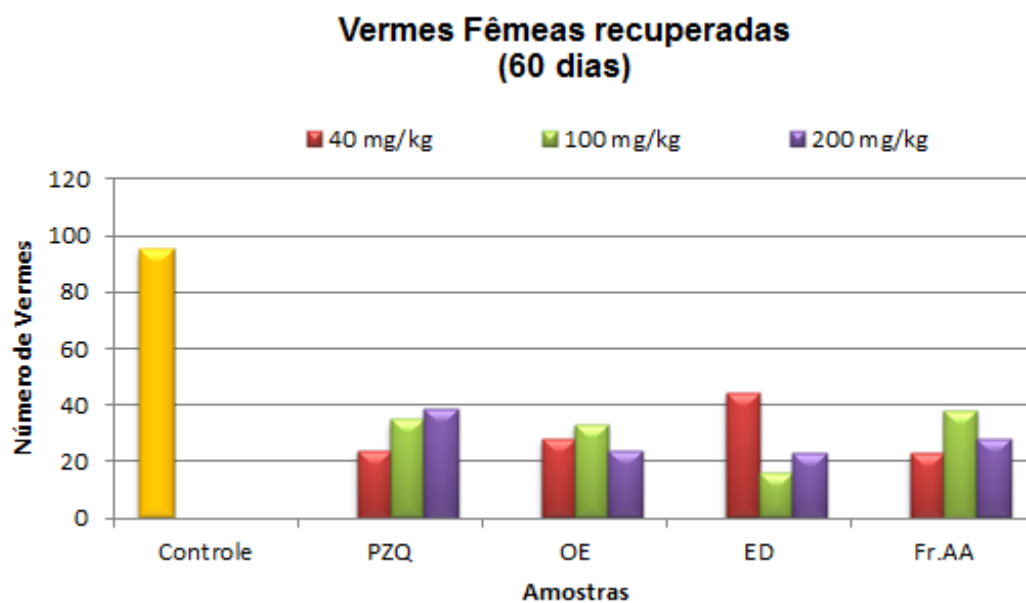


Figura 44: Quantidade de vermes Fêmeas de *S. mansoni* recuperados após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água.

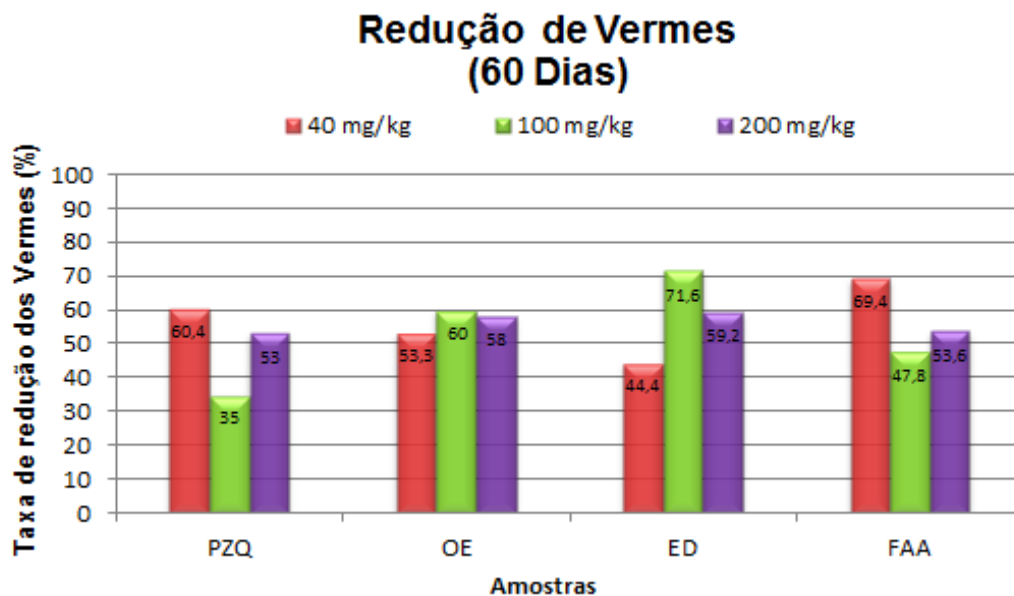


Figura 45: Redução do número total de vermes recuperados após a perfusão do Sistema porta hepático e das veias mesentéricas, após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água.

4.3.2- Efeito de *B. trimera* sobre a distribuição de ovos de *S. mansoni* no intestino

A distribuição e os estágios de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* no tecido intestinal, apresentaram variações de acordo com cada amostra de *B. trimera* e concentração avaliada quando comparadas com o praziquantel e com grupo controle negativo, infectado e não tratado (Figura 46).

A análise de variância mostrou significativa a interação, entre o tratamento e a concentração testada, na distribuição e desenvolvimento dos estágios dos ovos, imaturos, maduros e mortos ($p < 0,0001$).

Nesse estudo foi possível observar que o grupo tratado com as amostras, óleo essencial e extrato diclorometânico e nas concentrações de 200mg/Kg e 100 mg/kg, respectivamente, apresentaram menores quantidades de ovos imaturos distribuídos no fragmento intestinal ($p < 0,0001$), em relação aos demais

tratamentos, e ao seu respectivo grupo controle negativo, o qual apresentou uma percentagem de ovos viáveis maior do que a de ovos inviáveis, indicando uma predominância das formas imaturas e maduras, capazes de manter a evolução parasitária (Figura 46).

Em relação à distribuição dos ovos maduros, os tratamentos evidenciaram uma homogeneidade em todas as concentrações testadas, exceto para o óleo essencial, mais precisamente na concentração de 200 mg/kg e para o tratamento realizado com o praziquantel, na concentração de 40 mg/kg.

Os tratamentos realizados com o Óleo essencial nas concentrações de 100 e 200mg/kg e com o extrato diclorometânico, na concentração de 200 mg/kg, apresentaram um maior número de ovos mortos quando comparados com os outros tratamentos e com o grupo controle infectado e não tratado. Desta forma, podemos afirmar que o óleo essencial e o extrato diclorometânico apresentaram o melhor efeito dose- resposta sobre o estágio de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* distribuídos nos tecidos intestinais.

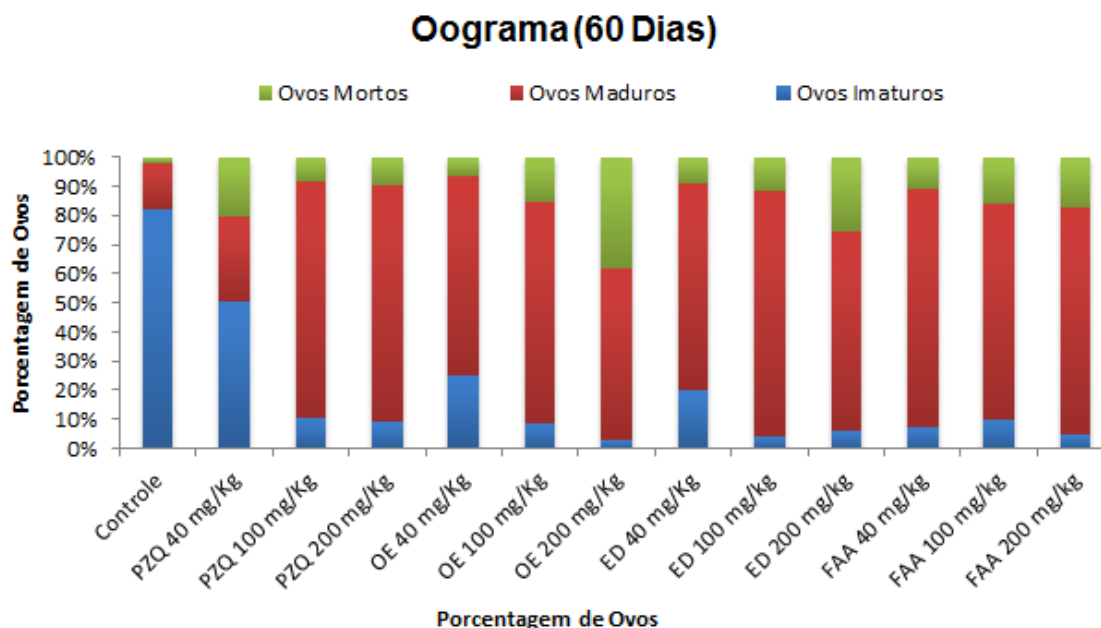


Figura 46: Oograma- Porcentagem de ovos encontrados- **Ovos Imaturos** (do primeiro ao quarto estágio de desenvolvimento); **Ovos Maduros** (quinto estágio de desenvolvimento) e **Ovos mortos**. Referente ao tratamento e a concentração avaliada dos grupos tratados com praziquantel, óleo essencial, extrato diclorometânico e fração acetona/água após 60 dias de infecção. Controle- PBS+TW.

4.3.4 - Efeito de *B. trimera* sobre o número de Ovos de *S. mansoni* eliminados nas Fezes

As análises estatísticas (ANOVA), mostraram significativa ($p < 0,0001$), a interação entre o tratamento e a dose administrada sobre o número de ovos eliminados nas fezes dos animais avaliados, quando comparados com os animais do grupo controle. O percentual de redução de ovos (RO) também foi significativo para todas as amostras e concentrações avaliadas (Figura 48), quando comparados com o controle positivo, tratado com praziquantel.

Conforme mostrado na Figura 47, os tratamentos realizados com o óleo essencial e com o extrato diclorometânico apresentaram um menor número de ovos eliminado nas fezes dos camundongos analisados. Além disso, essas amostras apresentaram um percentual de redução de ovos (RO= 81,3 % e 90,9%), respectivamente, na concentração de 200 mg/kg.

A fração acetona/água, também apresentou um percentual de redução de ovos significativo, superando o grupo tratado com praziquantel, mais precisamente nas concentrações de 40 e 200 mg/kg, RO= 59,8%, RO=75,5%, respectivamente (Figura 48).

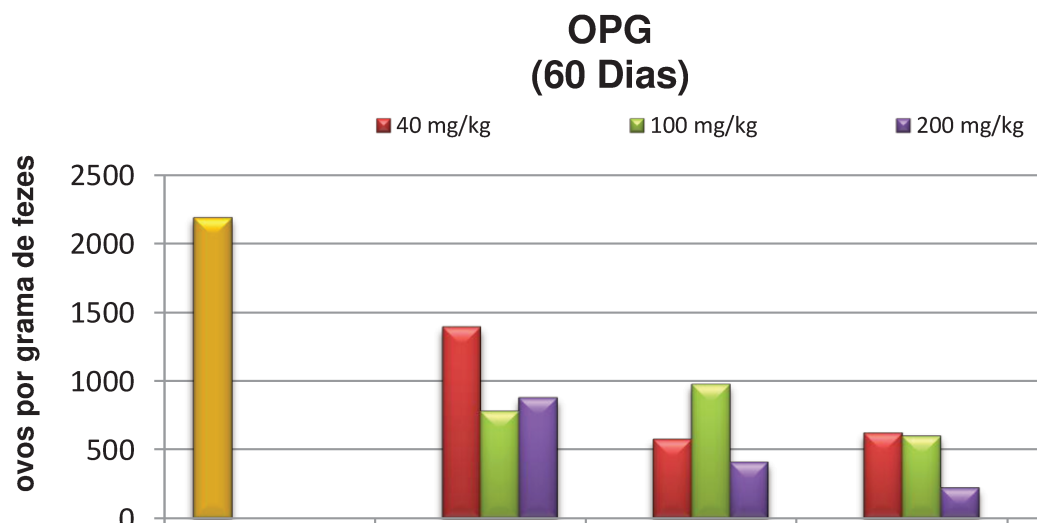


Figura 47: Quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) após 15 dias do tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FrAA**- Fração acetona/água.

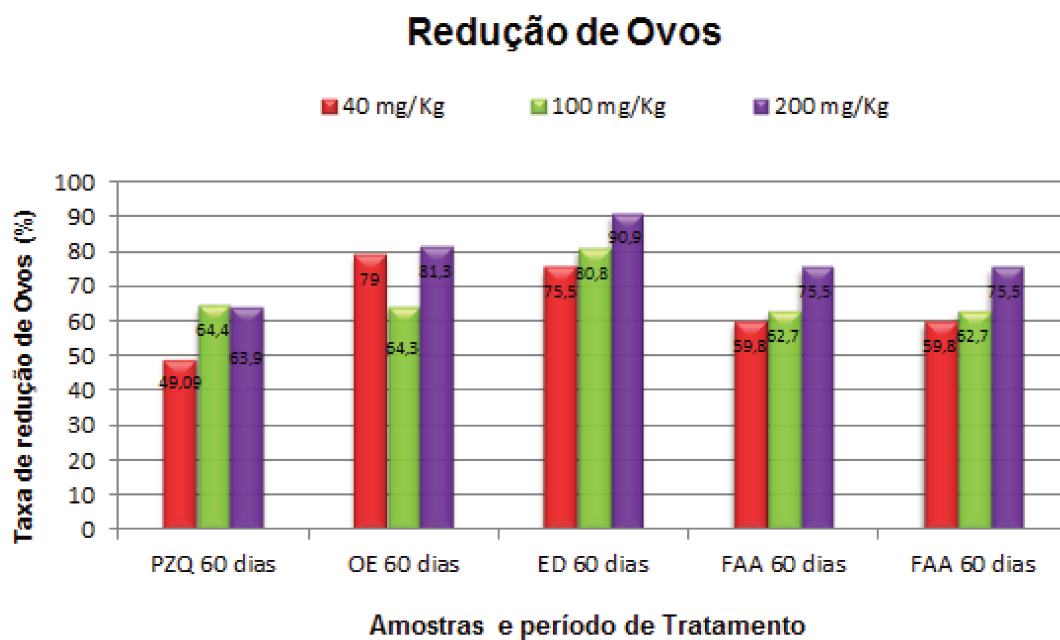


Figura 48: Redução do número total de ovos por gramas de fezes (OPG) após 15 dias de tratamento dos animais com 60 dias de infecção. **PZQ**- praziquantel, **OE**- Óleo essencial; **ED**- Extrato diclorometânico; **FAA**- Fração acetona/ água.

4.3.5- Efeito de *B. trimera* sobre os granulomas hepáticos

Nesse estudo foram avaliadas três amostras de *B. trimera* que demonstraram eficácia nos ensaios *in vitro* - óleo essencial, extrato diclorometânico e fração acetona/água, além do praziquantel. O grupo controle infectado recebeu solução tamponada (PBS + Tw80). Para cada amostra foram analisadas três concentrações - 40 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg. A esquematização dos tratamentos pode ser visualizada na Figura 10.

Observou-se que as amostras diferiam em relação ao número de granulomas periovulares, formados em torno dos ovos de *S. mansoni* degenerados ou de resto de cascas, e em relação ao diâmetro destes, quando comparados com o grupo controle infectado e não tratado (Figura 49). Além disso, observou-se redução da reação inflamatória em torno dos granulomas examinados dos grupos tratados, em relação ao grupo controle não tratado (Figuras 49 a 53).

A análise de variância e o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan consideraram significativo, o diâmetro maior ($p < 0,0053$) e diâmetro menor ($p < 0,0001$) dos granulomas, em virtude do tratamento realizado e da concentração avaliada.

Os tratamentos realizados com o óleo essencial nas concentrações de 100 mg/kg e 200 mg/kg, demonstraram uma redução significativa entre as medianas dos granulomas, além de apresentarem diferenças entre os diâmetros, maior e menor ($p < 0,0011$), quando comparados com o PZQ e com o grupo controle, infectado e não tratado.

Os resultados referentes ao tratamento com a fração acetona/água, na concentração de 100 mg/kg, revelou a presença do verme macho no fígado (Figura 52-C). Esse fato também ocorreu para o grupo tratado com o PZQ na concentração de 200 mg/kg (Figura 53- D).

Os tratamentos realizados com o extrato diclorometânico (Figura 51), apresentaram diferenças estatísticas apenas para as medianas dos diâmetros dos granulomas ($p < 0,0011$). As concentrações avaliadas nesse tratamento não

apresentaram níveis de significância entre as demais amostras e entre o grupo controle. Contudo, o grupo controle infectado e não tratado, apresentou um número maior de granulomas periovulares sendo estes, caracterizados pela presença do infiltrado inflamatório e, às vezes, formando granulomas conjugados com a presença de ovos degenerados Figura 49. Na tabela 6 estão descritos os resultados desse experimento e os dados das análises estatísticas.

Tabela 6: Efeito dos tratamentos realizados com as amostras de *B. trimera* e com praziquantel sobre os granulomas hepáticos dos camundongos tratados após 60 dias de infecção por *S. mansoni*.

Granulomas Hepático				
Concentração	Amostras	Nº de Granulomas	Médias dos Diâmetros (µm)	
			Maior	Menor
40 mg/kg	OE	51 ^{bc}	274,5	232,4 ^{bc}
	ED	61	283,7	243,3
	FAA	50 ^{bc}	210 ^{bc}	183,3 ^{bc}
	PZQ	66	280,5	241,4
100 mg/kg	OE	33 ^{c*}	222,9 ^{c*}	190,2 ^{c*}
	ED	56	245 ^{ab}	238 ^{ab}
	FAA	53 ^{bc}	237,4 ^{bc}	212,5 ^{bc}
	PZQ	65	263,5	221
200 mg/kg	OE	31 ^{c*}	187 ^{c*}	164 ^{c*}
	ED	45 ^b	229 ^b	204,7 ^b
	FAA	51 ^{bc}	268,4 ^{bc}	239,1 ^{bc}
	PZQ	60	289	245,8
PBS+Tw 80	CTRL	129 ^a	291,1 ^a	247,4 ^a

OE- óleo essencial; ED- extrato diclorometânico; FAA- fração acetona/água; PZQ- praziquantel; CTRL- controle infectado e não tratado. (c*) diferença estatística em relação ao grupo controle (p <0,0001).

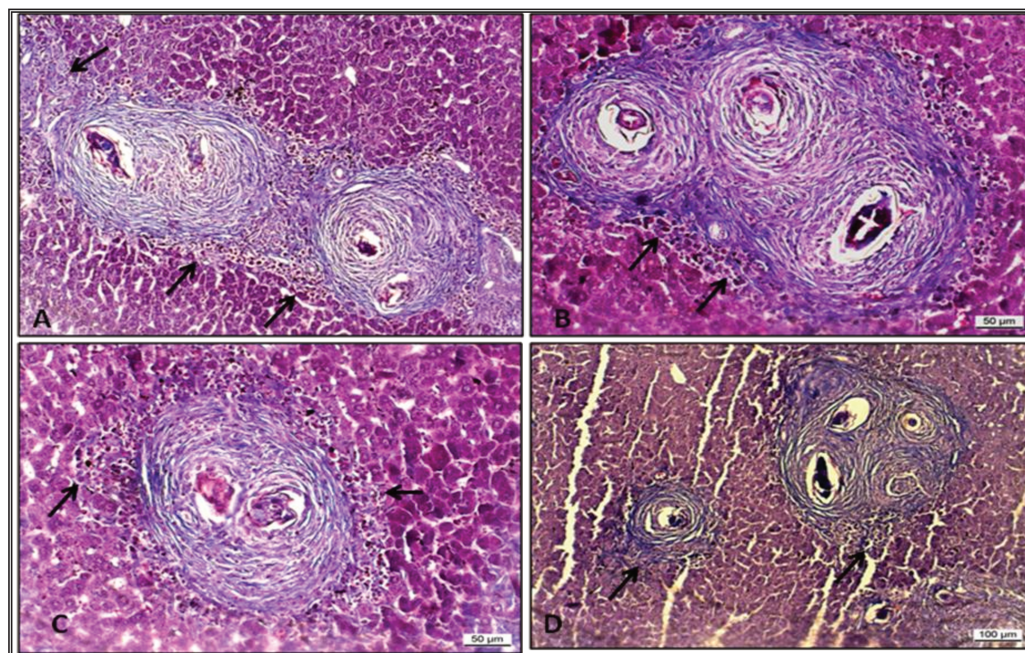


Figura 49: Granulomas hepáticos (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo Controle de camundongos infectados e não tratados. As setas indicam a presença do infiltrado inflamatório e o aglomerado de granulomas ao redor dos ovos de *S. mansoni*. É possível observar a presença do miracídio no interior dos ovos.

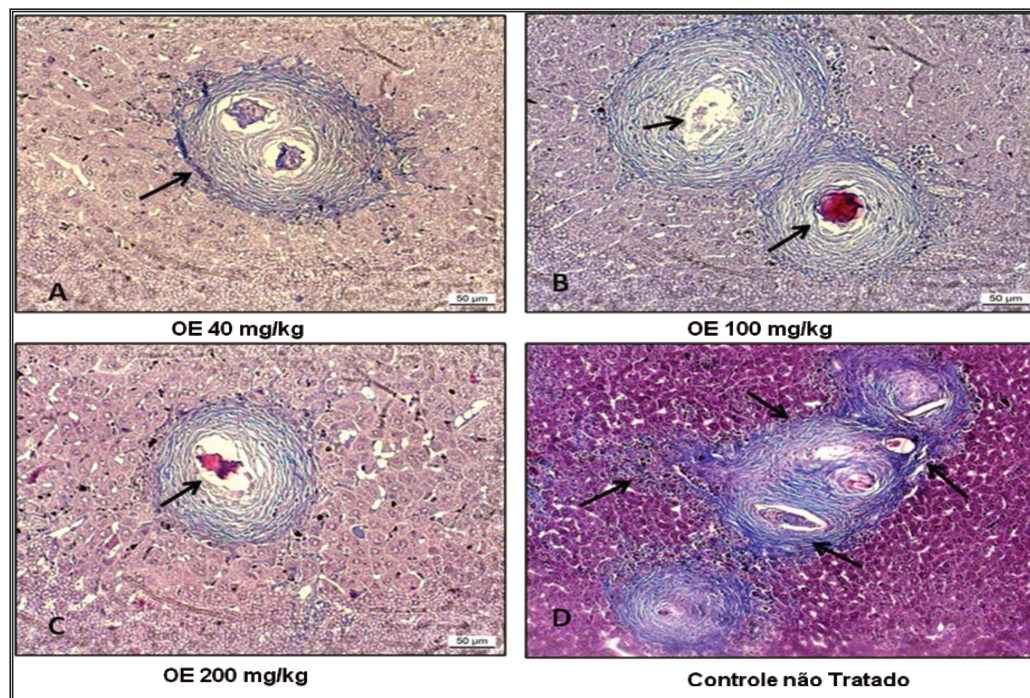


Figura 50 Granulomas hepáticos (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com o óleo essencial. (A)- 40 mg/kg, (B) 100 mg/kg, (C) 200mg/kg e (D) Controle não tratado. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados com a presença do miracídio em seu interior.

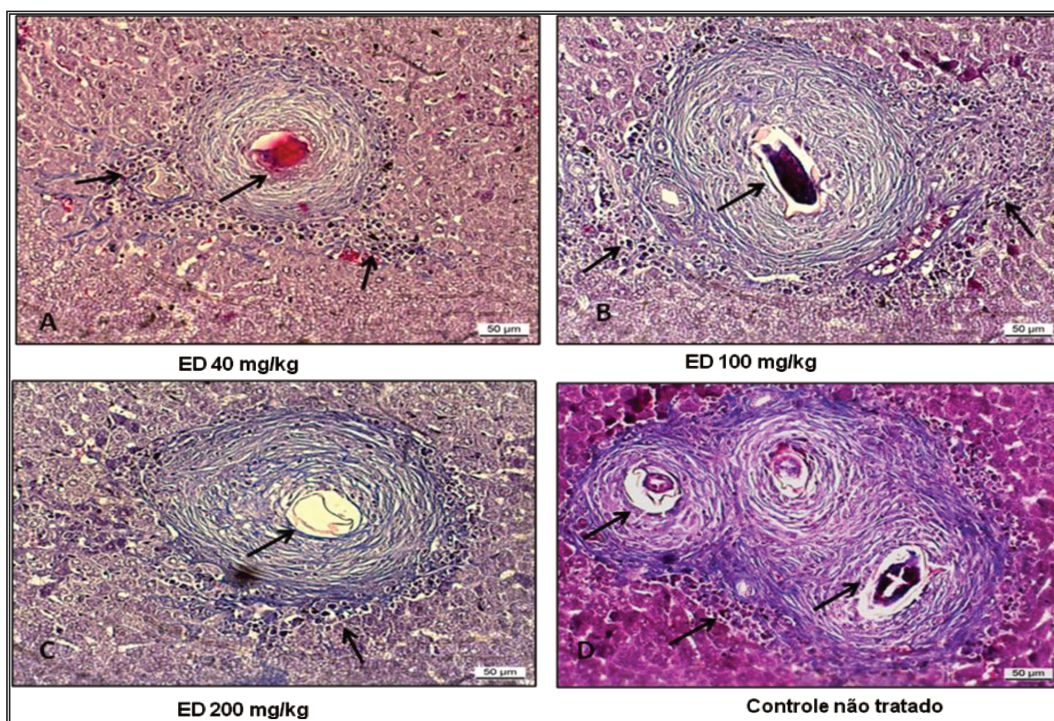


Figura 51: Granulomas hepáticos (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com o Extrato diclorometânico. (A)- 40 mg/kg, (B) 100 mg/kg, (C) 200mg/kg e (D) Controle não tratado. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório.

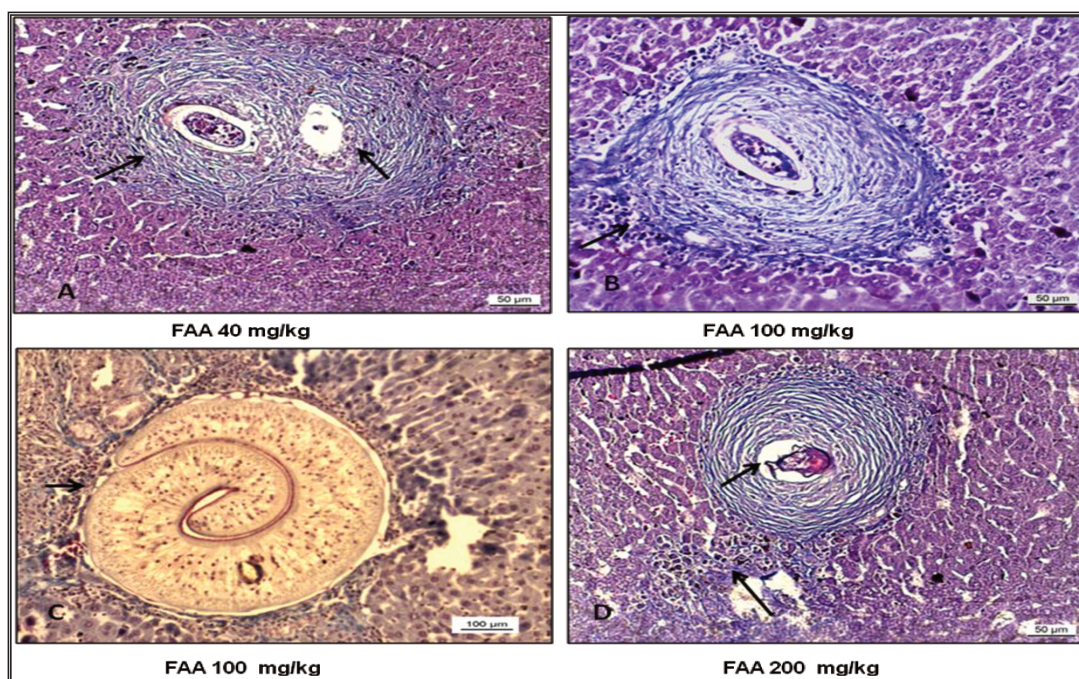


Figura 52: Granulomas hepáticos (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com a Fração acetona/água. (A)- 40 mg/kg, (B) 100 mg/kg, (C) 100mg/kg e (D) 200 mg/kg. As setas indicam a presença dos ovos de *S. mansoni* degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório e a presença do verme macho no fígado.

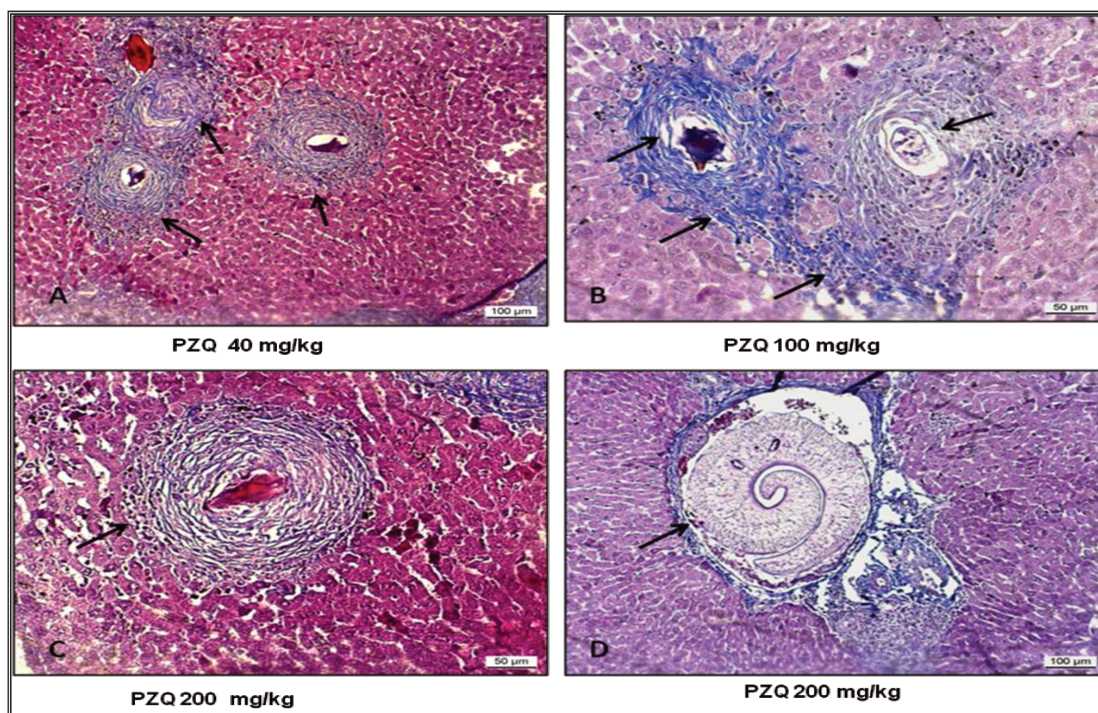


Figura 53: Granulomas hepáticos (A, B, C, D) em corte histológico corado com Tricrômio de Masson. Grupo de camundongos infectados e tratados com praziquantel. **(A)**- 40 mg/kg, **(B)** 100 mg/kg, **(C)** 100mg/kg e **(D)** 200 mg/kg. As setas indicam a presença dos ovos degenerados no centro dos granulomas e a presença do infiltrado inflamatório e a presença do verme macho no fígado.

5. DISCUSSÃO

5- Discussão

A esquistossomose mansônica é uma doença crônica e está incluída na lista das Doenças Negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A quimioterapia representa hoje o único recurso imediato para minimizar a prevalência e incidência desta doença no mundo (HOTEZ et al., 2007).

Apesar da existência de um fármaco que apresenta eficácia terapêutica contra todas as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, nesse caso, o praziquantel, a falta de novos princípios ativos que possam controlar os efeitos mórbidos da infecção ou mesmo de uma vacina que possa atuar na profilaxia da infecção faz com que o grande avanço no combate e controle desta parasitose, nas principais zonas endêmicas, não seja suficiente para minimizar a transmissão e as suas consequências (HAGAN et al., 2004).

Para avaliar o efeito esquistossomicida de um fármaco é importante o conhecimento da biologia do parasita. Assim, parâmetros como, motilidade, oviposição, alterações morfológicas e mortalidade, são indicadores para tal efeito (KATZ, 2008). Desta forma, compostos com atividade esquistossomicida podem apresentar eficácia (1) profilática - ocasionando a morte dos esquistossômulos; (2) supressora - inibindo a oviposição e (3) curativa - ocasionando a morte do verme adulto (MORAES et al, 2010).

O presente estudo revelou a atividade esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC popularmente chamada de “Carqueja” contra vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni* linhagem BH. Observamos que os melhores resultados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foram obtidos para os tratamentos realizados com o óleo essencial, com o extrato bruto diclorometânico e suas respectivas frações, hexânica e acetona/água. Acreditamos que a eficácia dessas amostras sobre *S. mansoni*, esteve relacionada à quantidade de substâncias de diferentes composições e polaridades, identificadas por meio de métodos cromatográficos.

5.1- Análises Fitoquímicas

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica muito usada para avaliar o perfil químico das substâncias presentes em extratos vegetais, óleos essenciais, dentre outros tipos de amostras e demonstrou ser uma ferramenta eficiente, rápida e de baixo custo para avaliação preliminar do perfil químico das amostras de *B. trimera*.

Nesse estudo, as análises por CCD foram qualitativamente diferentes apresentando bandas de coloração e intensidades características para cada classe de compostos quando observada sob a irradiação UV (λ 254 e 366 nm) e utilizando solução de anisaldeído (WAGNER & BLAD, 1996). Além disso, foram observados compostos de diferentes polaridades.

A análise do óleo essencial por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), possibilitou identificar os compostos através da análise dos espectros de massas (fragmentogramas) de cada sinal (pico cromatográfico) observado no cromatograma, comparação desses com dados da biblioteca espectral do equipamento (NIST-05), co-injeção de padrões de hidrocarbonetos para calcular os índices de retenção (IR's) e análise dos dados obtidos de acordo com as condições descritas por Adams (2007). Desta forma pôde-se identificar quimicamente cerca de 85% dos compostos (Tabela 3) e determinar as suas porcentagens relativas que foram expressas como porcentagens obtidas por normalização das áreas dos picos.

A partir desta análise podemos verificar que o OE da *B. trimera* apresenta-se enriquecido em sesquiterpenos, com 80,40% e somente 4,36% de monoterpenos. Os compostos majoritários são: trans-cariofileno, germacreno-D e biciclogermacreno, totalizando cerca de 45% da composição do OE.

Gené et al. (1996) & Akihisa et al. (1996), atribuíram aos terpenos os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória desta planta. Esse fato pode ser correlacionado com os resultados obtidos neste estudo, quando

Discussão

analisamos o efeito do óleo essencial sobre os granulomas hepáticos dos animais tratados, onde observamos uma redução da reação inflamatória, além da diminuição dos diâmetros e dos granulomas avaliados.

Desta forma, a detecção de substâncias/compostos, com características e polaridades diferentes, abre perspectivas para futuros trabalhos de isolamento, elucidação e avaliação de potenciais atividades biológicas contra *S. mansoni* linhagem BH.

5.2- Ensaios *in vitro*

A cultura de vermes *in vitro* para a triagem de fármacos, extratos naturais ou compostos isolados, tem sua aplicação quando se quer observar alguns fenômenos morfológicos e fisiológicos do parasita, que podem ser importantes na interpretação dos mecanismos de ação do fármaco avaliado (KATZ, 2008).

Esse estudo seguiu alguns parâmetros durante as observações dos ensaios *in vitro* – (1) motilidade dos vermes, machos e fêmeas, (2) oviposição, (3) alterações morfológicas e principalmente, a (4) susceptibilidade dos parasitas, para avaliar o efeito das diferentes amostras de *B. trimera* em diferentes concentrações adicionadas às culturas dos vermes.

A literatura relata que vermes adultos do *S. mansoni* apresentam uma variedade de movimentos, entre os quais podemos destacar os movimentos ondulatórios e peristálticos propagados ao longo da sua extensão corporal. Tais movimentos são observados quando vermes machos adultos são expostos a solução salina (PESSÔA et al., 2005). Estudos posteriores revelaram que esses movimentos estão associados a importantes neurotransmissores ou neuromoduladores como, serotonina, dopamina, acetilcolina, adrenalina, neuropeptídeos e glutamato (SANGSTER et al., 2005; NOEL et al., 2008; MARKS & MAULE, 2010; TAMAN & RIBEIRO, 2011).

No presente estudo, observou-se que os vermes machos apresentaram uma redução significativa desta função quando expostos aos tratamentos com todas as amostras de *B. trimera* avaliadas nos ensaios *in vitro*, em um menor período de incubação, em relação aos vermes fêmeas. Acredita-se que alguns compostos que apresentam atividade esquistossomicida como, por exemplo, a oxamniquina provoca alterações na motilidade dos vermes por atuarem nos receptores desse parasita, nesse caso, a acetilcolina (DUBOIS et al., 2009; NEVES et al., 2010).

Desta forma, é possível que a redução da motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, expostos ao tratamento com *B. trimera*, mais precisamente os tratamentos realizados com o óleo essencial, extrato diclorometânico, fração

hexânica, fração acetona/água e fração², esteja associada às alterações no sistema neuromodulador ou neurotransmissor do parasita.

Em relação à oviposição, a pesquisa mostrou uma redução de 100% na eliminação de ovos do *S. mansoni* quando estes foram expostos *in vitro* aos tratamentos com óleo essencial, extrato diclorometânico, extrato hidroalcoólico, e fração² de *B. trimera*, monitorados por 72 horas.

Fêmeas adultas de *S. mansoni* excretam cerca de 350 ovos por dia. Esse número equivale à eliminação de um ovo para cada minuto (CHEEVER et al., 1994). Segundo Ashton et al. (2001), os ovos recém produzidos pelo *S. mansoni* levam cerca de uma semana para completar seu estágio de maturação. Nesse período, as células vitelínicas fornecem nutrientes para o desenvolvimento do miracídio que também obtém nutrientes do hospedeiro.

De acordo com Barth et al. (1996), vermes adultos de *S. mansoni* quando cultivados *in vitro*, apresentam três fases na cinética de oviposição – pequena produção inicial, máxima produção e redução progressiva, durante as fases finais do cultivo. Desta forma, esses mesmos autores acreditam que a redução da produção de ovos está relacionada com alterações no sistema reprodutor dos vermes machos e/ou fêmeas.

A redução na produção de ovos das fêmeas de *S. mansoni*, em ensaios *in vitro*, também foi relatada por Veras et al. (2012) que avaliaram a epiisopoloturina, composto isolado de *Pilocarpus microphyllus*, e observaram que a concentração de 100 µg/mL inibiu completamente a eliminação de ovos durante um período de incubação de 120 horas. Moraes et al. (2010) avaliaram a pipartina, composto isolado da *Piper tuberculatum*, e observaram uma redução de 100% na oviposição na concentração de 95 µM. Magalhães et al. (2009) demonstraram o efeito da curcumina, composto isolado das raízes de *Curcuma longa*, a qual reduziu 50% da eliminação de ovos, nas concentrações de 5 e 10 µM.

A avaliação de novos fármacos ou compostos sobre a redução ou ausência de oviposição em ensaios *in vitro* é de suma importância, considerando que o principal patógeno da esquistossomose mansônica está associada à presença

dos ovos do parasita, principalmente no fígado do hospedeiro. Além disso, a ausência de ovos contribui para interrupção do ciclo biológico do parasita (GRYSEELS et al., 2006; WILSON et al., 2007; KATZ, 2008).

Em relação às alterações morfológicas, o estudo revelou que a *B. trimera* ocasionou lesões tegumentares significativas tanto nos vermes machos, quanto nos vermes fêmeas de *S. mansoni*, quando submetidos ao tratamento *in vitro* com óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água e praziquantel, na concentração de 130 µg/mL, após 24 horas de incubação.

O tegumento do *Schistosoma* é o principal alvo de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (XIAO et al., 2000; DOENHOFF et al., 2008). Esta estrutura desempenha um papel fundamental de proteção, além da capacidade de absorver nutrientes, moléculas e sintetizar algumas proteínas (SKELLY & WILSON, 2006; JAAP J.VAN HELLEMOND et al., 2006).

As principais alterações observadas nos vermes machos estão relacionadas à descamação do tegumento, resultando na destruição dos tubérculos e espinhos. Observaram-se também alterações nas ventosas, oral e acetabular. Quanto às modificações observadas nos vermes fêmeas, estas estão relacionadas à contração tegumentar, descamação do tegumento, resultando na perda dos espinhos e das papilas sensoriais ao longo da extensão corporal do verme. A alteração da ventosa oral também ficou evidenciada.

Esses resultados apresentam similaridade com as alterações induzidas pelo arteméter, relatado por Xiao et al. (1995). Outro estudo realizado por esses mesmos autores Xiao et al. (2000), utilizando praziquantel no tratamento *in vivo*, resultou em alterações semelhantes. Nossos resultados também apresentaram semelhança com as modificações tegumentares induzidas pela mefloquina como pode ser observado no trabalho descrito por MANNECK et al. (2010). Somados a esses estudos, também podemos citar os trabalhos realizados por Lima, et al. (2011), que avaliaram a ultraestrutura dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos a alicina – princípio ativo presente no *Allium sativum* – em experimentos *in vivo*. Eissa et al. (2011) estudaram o efeito esquistossomicida da miltefosina –

antiparasitário usado no tratamento de leishmaniose - sobre vermes adultos de *S. mansoni* e observaram danos na superfície tegumentar e nas ventosas, oral e acetabular. Mostafa et al. (2011) avaliaram o extrato aquoso da ginger (*Zingiber officinale*) sobre vermes adultos de *S. mansoni*, *in vivo* e observaram alterações morfológicas semelhantes.

O dano tegumentar é fator primordial para ocasionar a morte do *S. mansoni*. Quando isso ocorre, o parasita perde a capacidade de “burlar” o sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que a renovação do tegumento do *S. mansoni* ocorre a cada seis horas (SHAW & ERASMUS, 1998). No entanto, a destruição tegumentar induzida por um fármaco ou composto com atividade esquistossomicida, em vermes jovens ou adultos, pode ser reparada de forma eficaz em um período de 7 a 14 dias após a interrupção do tratamento. No caso de lesões tegumentares graves, a resposta imunológica do hospedeiro pode afetar o processo de reparação (XIAO et al., 2000).

Sendo o praziquantel o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose mansônica, têm sido observado que este provoca grandes danos no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*, ocasionando vacuolização do tegumento, contração muscular, além de danos estruturais, principalmente nos vermes machos logo após a exposição do fármaco. Em relação aos vermes fêmeas, o praziquantel também provoca a vacuolização no tegumento e subtegumento, porém, em menor intensidade (FALLON et al., 1995; SHUHUA et al., 2000).

Considerando essas informações, acreditamos que a destruição tegumentar induzida pelo tratamento realizado com *B. trimera*, provavelmente não sofra processo de reparação, uma vez que as lesões provocaram uma descamação intensa do tegumento, além da destruição dos tubérculos e espinhos, resultando em áreas lisas da superfície corporal. A *B. trimera* também ocasionou a destruição da superfície tegumentar dos vermes fêmeas, além de graves alterações nas ventosas, oral e acetabular, demonstrando sua atividade esquistossomicida sobre vermes adultos de *S. mansoni* linhagem BH.

Quanto à susceptibilidade do *S. mansoni* observou-se uma mortalidade significativa dos vermes adultos expostos a todas as amostras de *B. trimera* avaliadas no estudo. Os tratamentos realizados com o óleo essencial, extrato diclorometânico, fração hexânica, fração acetona/água e fração 2, evidenciaram que os vermes machos foram mais suscetíveis, produzindo um efeito dose-dependente em relação ao período de exposição, quando comparados com os vermes fêmeas.

Nossos resultados corroboram com as observações realizadas por Sanderson et al. (2002) que avaliou o extrato bruto de gengibre (*Zinziber officinale*) e observaram ação esquistossomicida preferencialmente sobre os vermes machos, quando expostos a concentração de 100 mg/kg.

Segundo Mostafa & Soliman, (2002) isso pode ser explicado pelo fato de que as fêmeas ficam acasaladas no canal ginecóforo dos vermes machos, tornando-se menos expostas aos fármacos avaliados no microambiente.

A susceptibilidade de machos e fêmeas de *S. mansoni* tem sido observada por meio de ensaios *in vitro*, utilizando óleos essenciais, extratos e compostos bioativos de plantas medicinais, como fonte de pesquisas de novos agentes esquistossomicidas. Por exemplo, óleos essenciais de *Piper cubeba* L. (Piperaceae) (MAGALHÃES et al., 2011); *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) (MELO et al., 2011); *Plectranthus neochilus* (CAIXETA et al., 2011); *Baccharis dracunculifolia* (PARREIRA et al., 2010); *Nigella sativa* (MOSTAFA et al., 2010); os extratos bruto de *Zanthoxylum Naranjillo* (BRAGUINE et al., 2009), *Piper tuberculatum* (MORAES et al., 2010); e os compostos isolados, Piplartina (MORAES et al., 2010) e Epiisopiloturina (VERAS, et al., 2012) entre outros.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* deste estudo nos permitem explicar, de maneira indireta, os mecanismos de ação e as atividades farmacológicas do óleo essencial, extrato/fração de *B. trimera* quanto à susceptibilidade dos vermes machos e fêmeas de *S. mansoni*. Contudo, embora esse fenômeno ainda não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que a

susceptibilidade deste parasita está associada a fatores como, por exemplo, sexo, hospedeiro e linhagem avaliada (LIANG et al., 2010).

5.3- Ensaios *In vivo*

Para triagem de fármacos *in vivo*, é indispensável o uso do modelo animal (KATZ, 2008). Para execução desta etapa, nesse trabalho, utilizamos a linhagem de camundongo Balb/C. Embora na maioria das vezes as respostas aos tratamentos *in vivo*, não correspondem aos tratamentos *in vitro*, esse estudo evidenciou resultados promissores quanto aos dois ensaios utilizados, *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com Pellegrino & Katz (1968) entre os diversos métodos e critérios propostos para a triagem *in vivo* de substâncias que apresentam propriedades esquistossomicidas estão: avaliação da carga parasitária (sobrevida dos vermes) dos animais tratados, avaliação quantitativa dos ovos distribuídos no tecido intestinal (oograma); quantificação dos ovos eliminados pelas fezes e contagem dos granulomas no fígado.

Segundo Katz, (2008) a distribuição dos vermes no sistema porta hepático de camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni*, após 45 dias, quando a quase totalidade de vermes já atingiram a maturidade sexual e iniciaram a postura de ovos, varia entre 60-70% nos vasos mesentéricos, de 20-30% na veia porta e de 0- 20% nas veias intra-hepáticas.

Sabe-se que o encontro de vermes fora do sistema porta-hepático, ou seja, nos órgãos como, fígado, baço e pulmão, é um sinal de resposta à ação do fármaco avaliado. Considerando essa informação, a pesquisa evidenciou o encontro de vermes nesses órgãos, em todos os tratamentos avaliados. A análise histopatológica do fígado comprova esse fato, para os tratamentos realizados com a fração acetona/água e com praziquantel nas concentrações de 100 mg/kg e 200

mg/kg, respectivamente. Acreditamos que o deslocamento dos vermes para o fígado evidencia de certa forma, um efeito esquistossomicidas da *B. trimera*.

Estudos anteriores demonstram que fármacos que apresentam propriedades esquistossomicidas, afetam a distribuição de vermes no sistema porta hepático e nas veias mesentéricas, fazendo com que os mesmos se desprendam da parede dos vasos, sendo levados passivamente pela corrente sanguínea até o fígado ou outros órgãos, como o baço (KATZ, 2008). No caso do praziquantel, por exemplo, acredita-se que ele induz o deslocamento do parasito, do sistema porta hepático para o fígado, cinco minutos após sua administração (PELLEGRINO & KATZ, 1968). Esse fato é decorrente dos danos que o PZQ produz nas ventosas, oral e acetabular, inibindo a sucção, bem como as alterações tegumentares do parasita, induzindo a contração muscular. Esse fato foi comprovado por Shuhua et al. (2000), por meio de estudos *in vivo*, demonstrando a ação do praziquantel sobre o tegumento de *S. mansoni* de uma linhagem proveniente da Libéria, constatando grandes danos na ventosa oral, quatro horas após a administração de 300 mg/kg do fármaco.

As observações dos testes *in vitro* evidenciaram danos no tegumento e nas ventosas, oral e acetabular dos vermes, machos e fêmeas, quando expostos aos tratamentos com *B. trimera* e com o praziquantel; desta forma, acreditamos que nos ensaios *in vivo*, a *B. trimera* tenha apresentado ações similares nos vermes adultos de *S. mansoni*.

A redução de vermes recuperados, machos ou fêmeas, de camundongos tratados com fármacos esquistossomicidas, já foi relatada por diversos autores como uma forte evidência da eficácia do medicamento (UTZINGER et al., 2002; SULEIMAN et al., 2004). Segundo Harder et al. (2002), a morte dos vermes adultos, em virtude do tratamento realizando com fármacos anti *S. mansoni*, é atribuída a distúrbios metabólicos bem como a destruição mecânica e muscular dos vermes após a exposição a fármacos.

O presente estudo demonstrou que a proporção de vermes machos recuperados após o tratamento com *B. trimera*, nos animais infectados com

S. mansoni, foi maior do que a proporção de vermes fêmeas. Esse fato demonstra que as fêmeas de *S. mansoni* foram mais sensíveis aos tratamentos.

Resultados semelhantes foram relatados por Mostafa et al. (2011), que observaram uma maior sensibilidade dos vermes fêmeas de *S. mansoni*, quando expostas ao extrato aquoso de ginger (*Zingiber officinale*). Nossos dados também corroboram os achados de Boissier & Moné (2001), que investigaram experimentalmente a relação entre a carga parasitária e a proporção do sexo, em quatro modelos de hospedeiros, camundongos, hamsters, ratos e macacos infectados por *S. mansoni*. Nour et al. (2006), avaliaram a eficácia do extrato metanólico da *Randia nilótica*, *in vivo*, e observaram que os vermes fêmeas são mais suscetíveis ao tratamento, apresentando uma taxa de redução de 99% dos vermes recuperados após a perfusão dos animais tratados.

Estudos anteriores por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que doses subcurativas do praziquantel são capazes de matar vermes adultos, machos e fêmeas de *S. mansoni* (GONNERT & ANDREWS, 1977; MELHORN et al., 1981). No entanto, outros autores relatam quem os vermes machos de *S. mansoni* são mais sensíveis ao praziquantel. Pica-Matoccia & Cioli (2004) utilizando a linhagem Porto Rico de *S. mansoni* demonstraram que nas infecções unissexuais em ensaios *in vitro*, os vermes fêmeas são mais sensíveis ao tratamento; porém, em ensaios *in vivo*, nas infecções bissexuais, quando o tratamento foi administrado em 5 dias consecutivos após 49 dias infecção, observaram que os vermes machos foram mais suscetíveis do que as fêmeas.

Delgado et al. (1992) utilizando a linhagem BH de *S. mansoni*, observaram em seus experimentos *in vivo* que a concentração de 250 mg/kg administrada 6 semanas após a infecção, atua preferencialmente sobre as fêmeas desse parasita. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato desses autores utilizarem linhagens distintas de *S. mansoni*. Estudos comparativos entre linhagens diferentes apresentaram diferenças quanto à suscetibilidade dos vermes aos tratamentos. Tais diferenças comportamentais entre linhagens de *S. mansoni*

são estabelecidas como manifestação da expressão genotípica do trematódeo (YOSHIOKA et al., 2002).

No presente estudo ficou evidenciado que apenas nos tratamentos realizados com praziquantel, na concentração de 40 mg/kg, as fêmeas de *S. mansoni* mostraram-se mais sensíveis. Em contraste, todos os grupos tratados com *B. trimera* evidenciaram a sensibilidade das fêmeas, após a exposição das amostras, em todas as concentrações avaliadas. É importante salientar, no entanto, que no presente estudo, as infecções dos camundongos foram bissexuais, no entanto, esse dado sustenta a hipótese de que a *B. trimera* apresenta atividade esquistossomicida principalmente sobre os vermes fêmeas de *S. mansoni*, linhagem BH.

Em relação à redução total do número de vermes recuperados após os tratamentos com a *B. trimera*, este estudo evidenciou que todas as amostras apresentaram um percentual de redução, superior aos tratamentos realizados com o praziquantel, em todas as concentrações avaliadas. Segundo Pellegrino & Katz, (1968), para avaliar a atividade do fármaco contra *S. mansoni*, informações sobre a redução do número de vermes (RV) dos grupos tratados, em relação ao controle positivo, é de fundamental importância.

Contudo, foi possível observar que todas as amostras diferiram em relação à redução total de vermes, sendo que a fração acetona /água e o extrato diclorometânico, apresentaram os maiores percentuais de redução 69,33% e 68%, respectivamente. É importante salientar que a redução dos vermes variou de acordo com as concentrações avaliadas, demonstrando um efeito dose-resposta durante os tratamentos.

Estes resultados estão de acordo com os dados observados por, Mohamed et al. (2011) que avaliaram o efeito bioquímico do *Allium cepa* e do *Allium sativum* sobre camundongos infectados por *S. mansoni*, além de avaliar a carga parasitária dos animais tratados, e observaram um percentual de redução de até 99,7 % dos vermes. Metwally, (2006) avaliou o efeito do óleo essencial do *Allium sativum* e *Allium cepa* e observou um percentual de redução de 67, 96% e 75,97%

na carga parasitária após o tratamento dos animais infectados por *S. mansoni*, linhagem egípcia. Gamal, (2009), avaliou a curcumina, um composto natural isolado dos rizomas da *Curcuma longa*, e observou uma redução na carga parasitária em animais tratados com 400mg/kg.

Diante do exposto, os resultados aqui apresentados demonstraram eficácia nos tratamentos realizados com *B. trimera*, nas diferentes concentrações, reduzindo consideravelmente a carga parasitária dos grupos tratados conforme mostrado na figura 45, além de evidenciar uma maior susceptibilidade dos vermes fêmeas de *S. mansoni*, expostas aos tratamentos após 60 dias de infecção.

De acordo com Delgado et al. (1992), a atividade esquistossomicida de um fármaco sobre os vermes fêmeas de *S. mansoni* é importante; uma vez que promove a diminuição da eliminação de ovos reduzindo, conseqüentemente, as reações granulomatosas nos órgãos mais afetados do hospedeiro, na maioria das vezes, o fígado.

Segundo KATZ (2008), o critério mais importante para avaliar o efeito de um fármaco que apresenta propriedade esquistossomicida, é analisar quantidade de ovos distribuídos no tecido intestinal. Portanto, o oograma é o método de maior fidedignidade que permite, através da análise morfológica, identificar os diferentes estágios de desenvolvimentos dos ovos de *S. mansoni*, que são classificados como viáveis e mortos após a realização dos tratamentos (CUNHA, 1992). Dentre os ovos viáveis, temos os imaturos (1º, 2º, 3º e 4º estágio), e os ovos maduros (5º estágio), o qual é caracterizado pela presença do miracídio totalmente desenvolvido no seu interior (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

Conforme Katz (2008), a ausência de qualquer um dos estágios de desenvolvimento dos ovos viáveis (1º ao 4º), após o tratamento dos animais infectados por *S. mansoni*, é indicação de que houve parada de postura e, portanto, o fármaco avaliado apresenta ação esquistossomicida.

Segundo Prata, (1957) & Pellegrino et al. (1962), os ovos de *S. mansoni* no intestino, levam de seis a sete dias para se desenvolver completamente, ou seja, passar do primeiro estágio para o quinto. No entanto, os ovos maduros

permanecem viáveis no intestino por cerca de doze dias (PRATA, 1957), portanto, se a oviposição cessar ou diminuir com administração do fármaco avaliado, o oograma deverá apresentar maior quantidade de ovos maduros – em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento - do que de ovos imaturos.

No presente estudo, a quantidade e o desenvolvimento dos ovos, no tecido intestinal dos animais analisados, após os tratamentos com *B. trimera*, apresentaram variações de acordo com cada amostra e concentração avaliada, quando, comparadas com o praziquantel e com grupo controle negativo, infectado e não tratado. Nossos dados mostram que o grupo tratado com o extrato diclorometânico e com o óleo essencial, na concentração de 200 mg/Kg apresentaram maior quantidade de ovos maduros distribuídos no fragmento intestinal, quando comparados com os demais tratamentos, e ao seu respectivo grupo controle negativo, o qual apresentou uma percentagem de ovos viáveis, maior do que a de ovos inviáveis, indicando uma predominância das formas imaturas e maduras, capazes de manter a evolução parasitária. Essas amostras também apresentaram maior percentual de ovos mortos encontrados, fato que comprova a eficácia da *B. trimera* sobre a oviposição do *S. mansoni*, expostos aos tratamentos após 60 dias de infecção.

Estudos anteriores realizados por Araújo et al. (2008) relataram por meio de ensaios *in vivo*, que os animais submetidos ao tratamento com praziquantel, oxamniquina e lovastatina, apresentaram alterações no oograma, evidenciando uma redução de 54,5%, 75% e 44,4 % respectivamente, de ovos viáveis de *S. mansoni*. Nossos resultados se assemelham com os dados obtidos por Bahgat et al. (2010) que avaliaram a eficácia do extrato metanólico da *Pulicaria crispera*, e observaram a ausência dos estágios imaturos dos ovos de *S. mansoni* após os tratamentos dos animais infectados.

Em relação à atividade terapêutica de um fármaco sobre a eliminação de ovos nas fezes, considerado outro parâmetro indispensável para a triagem *in vivo*, que também permite fazer comparações entre as diferentes concentrações avaliadas, possibilitando estudos mais exatos e conclusões mais precisas. Desta forma,

considerando o fato de que a administração de um agente esquistossomicida provoca uma temporária ou definitiva supressão da oviposição, a diminuição ou completa cessação da postura de ovos após o tratamento dos animais, tem sido utilizada para avaliar a atividade terapêutica de novos princípios ativos (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

Conforme descrito anteriormente, os tratamentos realizados com o óleo essencial e com o extrato diclorometânico apresentaram um maior número de ovos maduros e um maior percentual de ovos mortos, quando submetidos ao oograma. O mesmo pôde ser observado em relação ao número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos analisados. A redução da quantidade de ovos eliminados demonstrada no presente estudo, poder ser atribuída a redução da carga parasitária, principalmente dos vermes fêmeas. Acreditamos que os tratamentos realizados com as amostras de *B. trimera* alteraram a capacidade reprodutiva dos vermes, machos e fêmeas, afetando, conseqüentemente, a produção de ovos.

Resultados semelhantes, foram relatados por Metwally (2006), que avaliou o óleo essencial, extraído da *Allium cepa* e *Allium sativum*, em estudo *in vivo* e observou que a concentração de 5mg/kg, quando administrada após 24 horas em camundongos infectados por *S. mansoni* de uma cepa egípcia, apresentou uma redução de 82,15 % de ovos eliminados nas fezes. Além disso, também foi observada uma redução de 80% dos vermes, após a perfusão dos animais tratados.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com outros estudos, nos quais os autores utilizaram extratos vegetais, para investigar os efeitos sobre as infecções parasitárias por *S. mansoni* (GHAZANFARI et al., 2006; MOHAMED et al., 2005; HAMED & HETTA, 2005; MAHMOUD et al., 2002; MOSTAFA, 2001).

Em relação aos tratamentos realizados com o praziquantel, no presente estudo, observamos que a concentração de 100 mg/kg e 200 mg/kg apresentaram os maiores percentuais de redução de ovos eliminados nas fezes (64,4% e 63,9%), respectivamente. No entanto, essa redução de ovos não esteve associada

à redução de vermes, uma vez que o maior percentual de redução de vermes foi observado nos tratamentos realizados com a concentração de 40 mg/kg (60,4 %). Em contraste, estudos *in vivo* realizados por Delgado et al. (1992) evidenciaram que a redução de ovos eliminados nas fezes, esteve relacionada a redução da carga parasitária dos animais tratados com praziquantel na concentração de 250mg/kg, após 42 dias de infecção.

O estudo da atividade de um fármaco/composto sobre a reação granulomatosa que se forma ao redor dos ovos do *S. mansoni* é muito importante, uma vez que esta é responsável pela principal patologia da fase crônica grave da esquistossomose, caracterizada pela fibrose que se forma ao redor dos ovos, principalmente, no tecido hepático (LICHTENBERG, 1964).

Segundo Friedman (2008), o processo de formação de fibrose no tecido granular do fígado, induzida pela liberação de antígenos do ovo de *S. mansoni*, depende da ativação de um tipo especial de célula, denominado de Células estreladas parasinusoidales. Essa células são conhecidas como maior fonte de colágenos fibrilares .

Nesse estudo, a análise histológica dos fígados dos animais tratados com as amostras de *B. trimera*, mais precisamente, o óleo essencial e o extrato diclorometânico, na concentração de 200 mg/kg, evidenciaram melhores resultados quanto ao número de granulomas e ao tamanho da inflamação granulomatosa, além de apresentar diferenças em entre o diâmetro médio dos granulomas quando comparados com os grupos tratados com praziquantel e com o grupo controle negativo, infectado e não tratado.

Segundo Botros et al. (1984), esses efeitos podem estar relacionados a diminuição da capacidade das células T e da resposta imune humoral do hospedeiro. Isso pode ser causado por um envolvimento direto de linfócitos B ou pelo efeito do fármaco nas subpopulações de células T, que regulam a função dos linfócitos B.

No entanto, trabalhos clássicos como o de Doenhoff et al. (1986), relatam que existe uma significativa correlação numérica entre a diminuição do diâmetro

dos granulomas hepáticos e o número de ovos que são eliminados nas fezes, ambos, mediados por células específicas do hospedeiro. Sob esse aspecto, acreditamos ter confirmado as observações feitas por Doenhoff et al. (1986), de acordo com os resultados obtidos nesse estudo.

Conforme descrito anteriormente, além da reduzir o processo inflamatório e apresentar diferenças significativas em relação aos diâmetros dos granulomas hepáticos, o óleo essencial e o extrato diclorometânico de *B.trimera* também apresentaram uma redução significativa na eliminação de ovos nas fezes dos animais submetidos ao tratamento na concentração, 200 mg/kg (RO= 81,3 %, 90,9 %), respectivamente.

Resultados comparáveis foram obtidos por outros autores utilizando outros tratamentos com extratos, óleos essenciais e compostos isolados de plantas medicinais. Estudo realizado por Mostafa et al., (2011) avaliaram o extrato bruto de *Zingiber officinale*, administrados em dose única de 500 mg/kg, em camundongos C57 e observaram uma redução significativa no tamanho e na quantidade de granulomas dos animais tratados. Mohmoud et al. (2002) estudaram o efeito do óleo essencial de *Nigella sativa*, isolado e associado ao praziquantel, sobre vermes adultos de *S.mansoni* e obtiveram resultados semelhantes ao nosso estudo. Recentemente, Mohamed et al. (2011) realizaram um estudo com extratos de *Allium sativum* e *Allium cepa*, associados e não associado ao praziquantel, e observaram uma redução significativa no número de granulomas e o efeito curativo das reações granulomatosas dos camundongos, após a administração dos extratos estudados.

Nossos resultados assemelham-se aos obtidos por Bahgat et al., (2010) que avaliaram a eficácia do extrato metanólico da *Pulicaria crispa*, sobre as reações granulomatosas, em camundongos com 60 dias de infecção por *S.mansoni*. Gamal, (2009) avaliou a curcumina, um composto natural isolado dos rizomas da *Curcuma longa*, e observou uma imunomodulação da inflamação granulomatosa e uma redução de 79% do número de granulomas nos fígados dos animais tratados. Nesse contexto, Melo et al. (2011) avaliaram o efeito da Cramoll

1, 4, uma lectina extraída das sementes da *Cratylia mollis*, em camundongos infectados com *S. mansoni*, linhagem BH e observaram um percentual de redução de 73,5% dos granulomas nos fígados dos animais tratados com dose única, de 500mg/ kg, após 40 dias de infecção.

De acordo com a literatura, um dos efeitos biológicos da *B. trimera* está relacionado à atividade antiinflamatória. Contudo, acreditamos que a diminuição da quantidade dos granulomas hepáticos, bem como a redução da reação inflamatória destes, quando comparadas com o grupo controle negativo, pode está relacionadas à atividade antiinflamatória desta planta.

6- CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que a espécie *Baccharis trimera* (Less) DC. apresenta atividade esquistossomicida sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, linhagem BH, podendo destacar:

Nos ensaios *in vitro*:

- Redução da motilidade dos vermes, machos e fêmeas para todas as amostras avaliadas;
- Redução de 100 % na oviposição para as amostras OE, ED, EHA, FA e Fr2.
- Maior susceptibilidade dos vermes machos de *S. mansoni* após os tratamentos;
- As amostras OE, ED, FHE e FAA ocasionaram a mortalidade dos vermes em um menor período de exposição;
- As concentrações de 130 e 91 µg/mL foram mais efetivas para o OE, ED, FHE e FAA;
- Observou-se que o melhor tempo de mortalidade dos vermes, machos e fêmeas variou entre 24 e 48 horas de incubação;
- Todas as amostras avaliadas por meio da Microscopia eletrônica de varredura (MEV), ocasionaram alterações morfológicas nos vermes machos e fêmeas;

Nos Ensaios *in vivo*:

- O ED e FAA apresentaram maiores percentuais de redução da carga parasitária;
- Os tratamentos alteraram a proporção dos vermes, machos e fêmeas, evidenciando que as fêmeas foram mais sensíveis as amostras ED, OE e FAA, do que os vermes machos;
- Os tratamentos com OE e ED apresentaram maiores reduções de ovos eliminados por gramas de fezes;

Conclusões

- Os tratamentos realizados com OE e ED apresentaram maiores quantidades de ovos mortos, quando analisados pelo método do oograma;
- Os tratamentos com OE e ED apresentaram menores quantidades de granulomas hepáticos.

No presente estudo, observou-se que para cada parâmetro analisado, tanto nos ensaios *in vitro* quanto nos ensaios *in vivo*, houve uma variação de resultados de acordo com cada amostra avaliada e as concentrações testadas. Contudo, apesar dessa variação, podemos afirmar que a *B. trimera* apresenta atividade esquistossomicida sobre *S. mansoni*. Desta forma, devido aos bons resultados obtidos, nosso grupo de pesquisa dará continuidade ao estudo químico biomonitorando por meio dos ensaios de atividades biológicas, com o intuito de isolar e identificar frações/compostos, responsáveis pelas atividades esquistossomicidas, bem como identificar seu mecanismo de ação sobre *S. mansoni*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J., BERMEJO, P., GONZALES, E., IGLESIAS, I., IRURZUM, A., CARRASCO, L., Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **Comparative and General Pharmacology**, Vol.32, pp. 499-503, 1999.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation: **Illinois**, 4 th Ed. 804, 2007.

AKIHISA, T., YASUKAWA, K., UMA, H., KASAHARA, T., YAMANOUCHI, S., TAKIDO, M., KUMAKI, K., TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, Vol.43, pp.1255–1260, 1996.

ALONSO, J., DESMARCHELIER, C. *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina* – bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Buenos Aires: **Fitociencia**, pp. 663, 2006.

ALONSO, JR. Tratado de Fitomedicina - **Bases Clínicas y Farmacológicas**, ISIS Ediciones S. R. L., Buenos Aires, Argentina, pp. 350-354, 1998.

AMARAL, A. S., MOSSI, A. J., RADUNZ, L.L., TREICHEL, H., TEIXEIRA, A. J. LERIN, L. A., ARGENTA, G. A. Crop of *Baccharis trimera* in nutrient solution with different concentrations of nitrogen, phosphorus and potassium. **Perspective Erechim**, Vol. 34, pp. 25-34, 2010.

ANDRADE, Z. A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.35, pp.509-513, 2002.

ANDRADE, Z. A. A patologia da esquistossomose humana. In: CARVALHO, O. S. (Org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap. 18, pp. 549-568, 2008.

ARAÚJO, N., KOHN, A., & KATZ, N. Therapeutic evalution of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 32, pp. 7-12, 1999.

ARAÚJO, N., MATTOS, A.C.A., SARVEL, A.K., COELHO, P.M.Z., KATZ, N. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.103, pp. 450- 454, 2008.

Referências Bibliográficas

- ARENA, A., S. *Schistosoma mansoni*: atividade de oxamniquina e praziquantel em diferentes estágios de desenvolvimento das linhagens MAP e OuH *in vivo*. **[Dissertação de Mestrado]**. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1997.
- ASHTON, P.D., HARROP, R., SHAH, B., WILSON, R. A. The Schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, Vol.122, pp. 329–338, 2001.
- AVANCINI, C. A. M., WIEST, J. M. & MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less) DC. - Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Vol. 52, pp.230-234, 2000.
- BAHGAT, M. M., MAGHRABY, A. S., SHALABY, N., ABD-ALLA, H. I., AHMED, A. S., KHALED, H. M. Immunostimulatory effects of extract of *Pulicaria crispa* before and after *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Vol. 67, pp. 75-79, 2010.
- BAJPAI, A. K., SHUKLA, S. K., BHANU, S., KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, Vol. 33, pp.1088-1118, 2008.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDIOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 46, pp.446- 475, 2008.
- BARATA, C. H., NETO, H. V. S., CUNHA, I. C. L., RODRIGUES Jr., V., & PRATA, A. Novo foco de esquistossomose mansoni em sacramento, Alto do Parnaíba, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.33, pp. 379, 2000.
- BARBOSA- FILHO, J. M., TEREZA, H. C., VASCONCELOS, A. A. A., BATISTA, L. M., OLIVEIRA, R. A. G., GUEDES, D. N., FALÇÃO, H. S., MOURA, M. D., DINIZ, M. F. M. & FILHO, J. M. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Vol. 15, pp. 392-413, 2005.
- BARBOSA, C. S., FAVRE, T. C., AMARAL, R. S., PIERI, O. S. Epidemiologia e controle da Esquistossomose Mansonii. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose uma visão multidisciplinar**. 1ed. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ, pp. 965-1008, 2008.
- BARROSO, G. M. & BUENO, O. Compostas: subtribo Baccharidinae. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, pp.1065, 2002.

Referências Bibliográficas

BARROSO, G. M. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, Vol.28, pp.1- 273, 1976.

BARTH, L. R., FERNANDES, A. P., RODRIGUES, V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Vol. 38, pp. 423-426, 1996.

BASSILY, S., FARID, Z., DUNN, M., EL-MARSY, N. A., STEK, M. Jr. Praziquantel for treatment of Schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Vol.79, pp. 629- 634, 1985.

BERGE, S. T., KABATEREINE, N., GUNDERSEN, S. G., TAYLOR, M., KVALSIG, J. D., MKHIZE-KWITSHANA, Z., JINABHAI, C., KJETLAND, E. F. Generic praziquantel in South Africa: the necessity for policy change to provide cheap, safe and efficacious schistosomiasis drugs for the poor, rural population. **Southern African Journal of Epidemiology and Infection**, Vol. 26, pp.22-25, 2011.

BINA, J. C., PRATA, Regressão da hepatoesplenomegalia pelo tratamento específico da esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.16, pp. 213-218, 1983.

BOISSIER, J. & MONÉ, H. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. **International Journal for Parasitology**, Vol.31, pp. 1597-1599, 2001.

BONA, C. M., BIASI, L. A., ZANETTE, F. & NAKASHIMA, T. Propagation of three species of *Baccharis* by cuttings. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**, Vol. 35, pp. 223- 226, 2005.

BOROS, D. R., PELLE, R. P., WARREN, K. S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in *Schistosomiasis mansoni*. **The Journal Immunology**, Vol.114, pp.1437-1441, 1975.

BOTROS, S. S.; METWALLY, A. A.; KHAYYAL, M. T. The immunological aspects of praziquantel in unsensitized mice with experimentally induced schistosome pulmonary granuloma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.78, pp. 569-572, 1984.

BRAGUINE, C.G., EVELINE, S. C., LIZANDRA, G. M., VANDERLEI RODRIGUES, ADEMAR, A. DA SILVA FILHO, JAIRO, K.B., MÁRCIO, L.A.S., WILSON, R. C. ANA, H. J. PAULETTI, P. M. Shistosomicidal Evaluation of Zanthoxylum naranjillo and its Isolated Compounds against *Schistosoma mansoni* Adult worms, **Zeitschrift fur Naturforschung. C**, Vol. 64, pp. 793–797, 2009.

Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – Brasília, 2009.

BUDEL, J. M., DUARTE, M. R. Análise Morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC e *B. trimera* (Less) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 45, pp.75- 85, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 3, pp. 223-253, 2004.

CAFFREY, C. R. Chemotherapy of Schistosomiasis: presente and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, Vol.11, pp. 433-439, 2007.

CAIXETA, S. C. MAGALHÃES, L. G. MELO, N. I, WAKABAYASHI KAL, A. G. P. AGUIAR, D. P. MONTOVANI, A. L. L. MORAIS, J. A. OLIVEIRA, P. F. TAVARES, D. C. GROppo, M. RODRIGUES, V. CUNHA, W. R. VENEZIANI, R. C. S. SILVA FILHO, A. A, CROTTI, A. E. M. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in Brazil Southeast. **Chemistry & Biodiversity**, Vol. 8, pp. 2149–2157, 2011.

CALSAMIGLIA, S., M. BUSQUET, P. W. CARDOZO, L. CASTILLEJOS, L., FERRET, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Vol. 90, pp. 2580-2595, 2007.

CARVALHO, O. S., COELHO P. M. Z., LENZI H. L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Fiocruz**, Rio de Janeiro, 2008.

CHEEVER, A. W., WILLIAMS, M. E., WYNN, T. A, FINKELMAN, F. D., SEDER, R.A., COX, T. M, HIENY, S., CASPAR, P., SHER, A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **Journal Immunology**, Vol. 153, pp. 753-759, 1994.

CHRISTOPHERSON, J. B. The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **The Lancet**, Vol. 192, pp. 325-327,1918.

CINTO, P. O. Avaliação da absorção intestinal de praziquantel a partir de lipossomas de fosfatidilcolina de soja empregando o modelo do saco intestinal

Referências Bibliográficas

invertido **[Dissertação de Mestrado]**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Araraquara, pp. 69, 2005.

CIOLI, D & PICA- MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, Vol. 90, pp. S3-S9, 2003.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitology Today**, Vol. 14, pp. 418-422, 1998.

CIOLI, D. Praziquantel: Is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in Infectious Diseases**, Vol.13, pp. 659-663, 2000.

CIOLI, D., PICA- MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? **Pharmacology & Therapeutics**, Vol.68, pp.35-85, 1995.

CIOLI, D., PICA- MATTOCCIA, L., MORONI, R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistant is controlled by a single autosomal recessive gene. **Experimental Parasitology**, Vol. 75, pp. 425–432, 1992.

CLARK, T. E., APPLETON, C. C., KVALSVIG, J. D. Schistosomiasis and the use of indigenous plant molluscicides: a rural South Africa perspective. **Acta Tropica**, Vol. 66, pp 93- 107, 1997.

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**, Vol. 39, pp.101–106, 1997.

COOK, N. C., SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, Vol. 7, pp. 66- 76, 1996.

COURA, J. & AMARAL. R. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 99, pp. 13-19, 2004.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., MACHADO, M. I. L. Óleo essencial de lemongrass. In: **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**, Fortaleza: EUFC, pp.153, 1981.

CUNHA, A. S. Avaliação terapêutica da oxamniquine na esquistossomose mansonii humana pelo método do oograma por biópsia de mucosa retal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 24, pp. 88 -94,1982.

Referências Bibliográficas

DAVIS, A., & WEGNER, D. H. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol. 57, pp.767–771. 1979.

DELGADO, V. S., SUÁREZ, D. P. CESARI, I. M., HINCAM, R. N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. **Parasitology Research**, Vol. 78, pp.648-54, 1992.

DI STASI, L. D. Química de Produtos Naturais. In: Di Stasi, L. D. Plantas Medicinais. **Arte e Ciências- Um Guia de Estudo Multidisciplinar**: São Paulo. Universidade Paulista, pp. 109.127, 1996.

DIAS, L. C. S., PEDRO, R. J., REGO, E. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. **Revista de Saúde Pública**, Vol.72, pp.110, 1978.

DOENHOFF, M. J., CIOLI, D., UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, Resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Vol. 21, pp.659-667, 2008.

DOENHOFF, M. J., HAGAN, P., CIOLI, D., SOUTHGATE, V., PICA- MATTOCIA, L., BOTROS, S., COLES, G., TCHUEM- TCHUENTE, L. A., MBAYE, A. & ENGELS, D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, Vol. 136, pp. 1825-1835, 2009.

DOENHOFF, M. J., KUSEL, J.R., COLES, G. C., and CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 96, pp. 465-469, 2002.

DOENHOFF, M. J., HASSOUNAH, O., MURARE, H., BAIN, J., LUCAS, S. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 80 pp.503-514, 1986.

DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. Endogenous desensitization: Changing host granulomatous response to *Schistosome* eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Pathology**, Vol.52, pp. 369-379, 1969.

DUBOIS, F., CABY, S., OGER, F., COSSEAU, C., CAPRON, M., GRUNAU, C., DISSOUS, C., PIERCE, R. J. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Vol. 168, pp.7-15, 2009.

Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

EHRENBERG, J. P., AULT, K. S. Neglected diseases of neglected populations: Thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. **BMC Public Health**, Vol.5, pp. 1-13, 2005.

EISSA, M. M., MERVAT, Z., AZZOUNI, E. L., BADDOUR, N. B. Miltefosine, a promising novel agent for *Schistosomiasis mansoni*. **International Journal for Parasitology**, Vol. 41, pp. 235- 242, 2011.

EMERENCIANO, V. P., MILITÃO, J. S. L. T., CAMPOS, C.C., ROMOFE, P., KAPLAN, M. A. C., ZAMBON, M., BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Astetaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Vol. 29, pp. 947-957, 2001.

ENGELS, D., CHITSULO, L., MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, Vol. 82, pp.139-146, 2002.

FALLON, P. G. & 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**, Vol. 53, 1994.

FALLON, P. G., STURROCK, R. F., NIANG, A. C. & DOENHOFF, M. J. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 53, pp. 61-62, 1995.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: **Atheneu**, 1988-2003.

FAVRE, T.C., PIERI, O.S., ZANI, L.C., FERREIRA, J.M., DOMAS, G.G., BECK, L.H. Longitudinal Study on the Natural Infection of *Biomphalaria straminea* and *B. glabrata* by *Schistosoma mansoni* in an Endemic Area of Schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 97, pp.465-475, 2002.

FERRARI, M. L. A., COELHO, P. M. Z., ANTUNES, C. M. F., TAVARES, C. A. P., CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol. 81, pp. 190-196, 2003.

FOSTER, R. & CHEETHAM, B. L.. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK – 4271). I: activity in rodents and *in vitro*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 67, pp. 674-684, 1973.

Referências Bibliográficas

- FREZZA, T. F., MADI, R. R., BANIN, T. M., PINTO, M. C., SOUZA, A. L. R., GREMIÃO, M. P. D., ALLEGRETTI, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Vol. 28, pp. 209- 214, 2007.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. **Physiol Reviews**, Vol. 88, pp. 125-172, 2008.
- GAMAL, A. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis *mansoni*. **Immunobiology**, Vol. 214, pp. 712-727, 2009.
- GAMBERINI, M. T., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C., LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by awater extract from *Baccharis triptera* Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 86, pp,137–139, 1991.
- GENÉ, R. M., MARIN, E., ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the *genus Baccharis*. **Planta Medica**, Vol. 58, pp. 565–566, 1996.
- GHAZANFARI, T., HASSAN, Z.M., KHAMESIPOUR, A. Enhancement of peritoneal macrophages phagocytic activity against *Leshmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.103, pp. 333-337,2006.
- GITHORI, J. B., ATHANASIADU, S., THAMSBORG, S. M. Use of plants in novelapproaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. **Journal of Veterinary Parasitology**, Vol.139, pp. 308-320, 2006.
- GIULIANO, D. A. Classificación infragenérica de las species Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) **Darwiniana**, Vol.39, pp. 131-154, 2001.
- GONNERT, R. & ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.** Vol. 52, pp.129, 1977.
- GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human Schistosomiasis. **The Lancet**, Vol. 368, pp. 1106-1118, 2006.
- GUO, Y., WU, L. J. & XU, P. S. Safety of artesunate in a long term administration in rats. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, Vol.12, pp. 27-29, 2000.
- HAGAN, P., APPLETON, C.C., COLES, G.C. KUSEL, J.R. AND TCHUEM-TCHUENTE, L.A. “ Schistosomiasis control: Keep taking the tablets” **Trends Parasitology**, Vol. 20, pp.92-97, 2004.

HAMED, M.A. & HETTA, M. H. Efficacy of *Citrus reticulata* and Mirazid in treatment of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.100, pp. 771-778, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitology Research**, Vol.88, pp. 395–397, 2002.

HERMETO, M.V., BICALHO, R.S., DA SILVA, R.E., DE MELO, A.L. e PEREIRA, L.H. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 36, pp.99-104, 1994.

HERZ, W., PILOTTI, A. M., SODERHOLM, A.C., SHUHANAL, K., VICCHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpeneids from *Baccharis trimera*. **The Journal of Organic Chemistry**, Vol. 42, pp. 3913-3917, 1997.

HIATT, R. A., SOTOMAYOR, Z. R., SANCHEZ, G., ZAMBARA, M., KNIGHT, W. B. Factors in the pathogenesis of acute *schistosomiasis mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, Vol.139, pp. 659-666, 1979.

HOTEZ, P. J., MOLYNEUX, D. H., FENWICK, A., KUMARESAN, J., SACHS, S. E., SACHS, J.D., SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The new England Journal of Medicine**, Vol. 357, pp. 1018-27, 2007.

INYANG- ETOH, P.C., EJEZIE, G.C., USEH, M.F., INYANG-ETOH, E.C. Efficacy of a combination of praziquantel and artesunate in the treatment of urinary schistosomiasis in Nigeria. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.103, pp. 38-44, 2009.

ISHIZAKI, T., KAMO, E., BOEHME, K. Double-blind studies on tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol. 57, pp. 787–791, 1979.

ISMAIL, M., BOTROS, S. METWALLY, A. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.60, pp.932- 935, 1999.

JAAP J.VAN HELLEMOND, J. J., RETRA, K., BROUWERS, J. F.H.M., VAN BALKOM, B. W.M., YAZDANBAKHSH, M., SHOEMAKER, C.B., TIELENS, A.G. M. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, Vol. 36, pp. 691-699, 2006.

Referências Bibliográficas

JEZIORSKI, M. C & GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **International Journal of Parasitology**, Vol. 36, pp. 625-632, 2006.

JIRAUNGKOORSUL, W., SAMPHONG, S., SABHON, P., RIENGROJPITAK, S., KANGWANRANGSAN, N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. **Parasitology International**, Vol. 54, pp. 177- 183, 2005.

KATZ, N. & ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, Vol. 55, pp. 38 - 41, 2003.

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni, In: **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z. & LENZI, H. L. (eds), 825-870, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

KATZ, N., ROCHA, R., & CHAVES, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. **Bulletin of the World Health Organization**, Vol.57, pp.781-785, 1979.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 14, pp. 397- 400, 1972.

KING, C. H. Schistosomiasis: challenges and opportunities, Institute of Medicine, Board on Global Health, Forum on Microbial Threats. **Institute of Medicine**, 2010.

KISSMANN, K. G., GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2 ed. São Paulo: Basf, 1999.

KLAYMAN, D. L. *Artemisia annua*: from weed to respectable antimalarial plant, In: *Human Medicinal Agents from Plants*, KINGHORN, A. D. & BALANDRIN, M. F. (eds), **American Chemical Society**, Washington, United States., ISBN 0-8412-2705-5, pp. 242-255, 1993.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 54, pp.77-98, 2002.

LEITE, C. E., LUNARDELLI, A., CASTAMAN, T. A., PAUL, E. L. & OLIVEIRA, J. R. Extrato Aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o Dano Celular em Pleurisia induzida por Veneno de *Dirphia* sp.(Saturniidae). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Vol. 39, pp. 29-32, 2007.

Referências Bibliográficas

- LI, Y. S., CHEN, H. G., HE, H. B., HOU, X. Y., ELLIS, M., MCMANUS, D. P. A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China. **Acta Tropica**, Vol. 96, pp. 184-190, 2005.
- LIANG, Y. S., COLES, G., DOENHOFF, M. J. & VOUCHAN, R. S. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**, Vol. 31, pp. 1227-1235, 2001.
- LIANG, Y. S.; WANG, W.; DAI, J. R.; LI, H. J.; TAO, Y. H.; ZHANG, J. F.; LI, W.; ZHU, Y. C.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, Vol. 84, pp. 202-207, 2010.
- LICHTENBERG, F. V. Studies on granuloma formation III Antigen sequestration and destruction in the Schistosome pseudo tubercle. **The American Journal of Pathology**, Vol.45, pp.75- 93, 1964.
- LIMA, C. M. B. L., FREITAS, F. I. S., MORAIS, L.C. S. L., CAVALCANTI, M. G. S. SILVA, L. F. PADILHA, R. R., BARBOSA, C. G. S., SANTOS, F. A. B., ALVES, L. C. & DINIZ, M. F. F. M. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.44, pp 327- 330, 2011.
- LORENZI & MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, Instituto Plantarum, ISBN 8586714-18-6, **Nova Odessa**, Brazil. 2002.
- LUIZE, P. S., TIUMAN, T. S., MORELLO, L. G. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazoniensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Vol. 41, pp. 85-94, 2005.
- MACHADO, H., NAGEM, T. J., PETERS, V. M., FONSECA, C. S., OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora. Vol. 27, pp. 33-39, 2008.
- MACIEL, M. A., PINTO, A. C., VEIGA JR., GRYNBERG, N. F. & ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Vol.25, pp. 429-438, 2002.
- MAGALHÃES, L. G., MACHADO, C. B., MORAIS, E. R., MOREIRA, E. B. C., SOARES, C. S., SILVA, S. H., DA SILVA FILHO, A. A., RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, Vol. 104, pp. 1197-1201, 2009.

Referências Bibliográficas

- MAGALHÃES, L. G., SOUZA, JULIA M., KAMILA, A. L., WAKABAYASHI., LAURENTIZ, R. S., VINHÓLIS, A. H. C.; REZENDE, K. C. S., SIMARO, G. V., BASTOS, J. K., RODRIGUES, V., ESPERANDIM,V.R., FERREIRA, D. S., CROTTI, A. E. M., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, DOI 10.1007/s00436-011-2695-7, 2011.
- MALIZIA, R. A., CARDELL, D. A., MOLLI, J. S., GONZÁLEZ, S. B., GUERRA, P. E., GRAU, R. J. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II. *B. obovata* Hooker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et. Pav.) Persoon species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, Vol. 17, pp.194-197, 2005.
- MANNECK, T. HAGGENMULLER, Y.O., KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Vol.137, pp. 85–98, 2010.
- MARKS, N. J., MAULE, A. G. Neuropeptides in helminths: occurrence and distribution. **Advances Experimental Medicine Biology**, Vol. 692, pp.49-77, 2010.
- MARTINS JR., Davi Félix & BARRETO, L. Aspectos macro epidemiológicos da esquistossomose mansônica: análise da relação da irrigação no perfil espacial da endemia no Estado da Bahia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Vol.19, pp. 383-393, 2003.
- MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais. Projeto para pequenas comunidades, 4ª edition, EUFC, ISBN 8572820086, Fortaleza, Brazil, 1994.
- MEHLHORN, H., BECKER, B., ANDREWS, P., THOMAS, H., FRENKEL, J. K. In vivo and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Drug Research**, Vol. 31, pp.544–554, 1981.
- MELLO, J. C. P. de & PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Vol. 19, pp. 211-215, 2000.
- MELO, C. M. L., LIMA, A. L. R., BELTRÃO, E. I. C., CAVALCANTI, C. C. B., MELO-JR, M. R., MONTENEGRO, S. M. L., COELHO, L. C. B. B., CORREIA, M. T. S., CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Potential effects of Cramoll 1, 4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, Vol. 118, pp. 152-158, 2011.

Referências Bibliográficas

- MELO, N. I., MAGALHÃES, L. G., CARVALHO, C. E., WAKABAYASHI, K. A. L., AGUIAR, G. P., RAMOS, R. C., MANTOVANI, A. L. L., TURATTI, I. C. C., RODRIGUES, V., GROppo, M., CUNHA, W. R., VENEZIANI, R. M. A. E. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Molecules**, Vol. 16: 762-773, 2011.
- METWALLY, N. S. Potency of *Allium sativum* and *Allium cepa* Oils against *Schistosoma mansoni* Infection in Mice. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, Vol. 23, pp. 319- 332, 2006.
- MOHAMED- ALI, Q., DOEHRING- SCHWERDTFEGGER, E., ABDEL- RAHIM, I. M., SCHLAKE, J., KARDORFF, R., FRANKE, D., KAISER, C., ELSHEIKH, M., ABDALLA, M., SCHAFER, P. Ultrasonographic investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: reversibility of morbidity seven months after treatment with praziquantel. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 44, pp.444-45, 1991.
- MOHAMED, A. M., METWALLY, N. M., MOHMOUD, S. S. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 100, pp. 205-211, 2005.
- MOHAMED, M. M., ALI, H. F. & RIZK, M. Z. Therapeutic Effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* Experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol. 53, pp. 155- 163, 2011.
- MOHMOUD, M. R., EL- ABHAR, H.S., SALEH, S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Journal Ethnopharmacology**. Vol. 79: 1-11, 2002.
- MONDIN, C. A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. 1ed. **Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica**. Porto Alegre: Pallotti, 2006.
- MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. ; NAKANO, E. ; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J. & KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**. Vol.127, pp. 357-364, 2010.
- MOREIRA, F. P. M., COUTINHO, V., MONTANHER, A. B. P., CARO, M.S.B., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis eudotenuifolia* - Bioatividade sobre *Artemisia salina*. **Química Nova**. Vol.26, pp. 309-311, 2003.

Referências Bibliográficas

MOSTAFA, O. M. & SOLIMAN, M. I. Experimental use of black-seed oil against *Schistosoma mansoni* in albino mice: II. Surface topography of adult worms. **Egyptian Journal of Medical Laboratory Sciences**, Vol.11, pp. 79-85, 2002.

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

MOSTAFA, O. M. S., SOLIMAN, M. I. Ultrastruture alterations of adult male *Schistosoma mansoni* harbored in albino mice treated with Sidr honey and/or *Nigella sativa* oil. **Journal of King Saud University- Science**, Vol. 22, pp.111-121, 2010

MOSTAFA, O. M. S. Experimental use of black-seed oil against *Schistosoma mansoni* in albino mice. I. Some parasitological and biochemical parameters. **Egyptian Journal of Medical Laboratory Science**, Vol. 10, pp. 99–113, 2001.

MOURÃO, S. C. Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel [**Dissertação de Mestrado**]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Araraquara, pp. 124, 2001.

MOURÃO, S. C., COSTA, P. I., SALGADO, H. R. M., GREMIÃO, M. P. D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine- containing liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 295, pp. 157-162, 2005.

MS - Ministério da Saúde. Esquistossomose. In: Vigilância em Saúde: Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. 2ª ed. rev. Brasília: **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**, pp. 48-65, 2008.

MS- **Ministério da Saúde. In: Situação Epidemiológica da Esquistossomose Mansônica o Brasil.** Coordenação Geral de Doenças Negligenciadas Programa de vigilância e controle da Esquistossomose, Junho de 2011.

NAKASUGI, T., KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Flok Medicinal Plany Carqueja (*Baccharis trimera* Less.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 46, pp. 2560- 2564, 1998.

NDAMBA, J., NYAZEMA, N., MAKAZA, N. ANDERSON, C., KAONDERA, K.C. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 42, pp.125–132, 1994.

Referências Bibliográficas

NEVES, J. K., BOTELHO, S. P., DE MELO, C. M., PEREIRA, V. R., DE LIMA, M. D. O. C., PITTAIDA, R., ALBUQUERQUE, M. C., GALDINO, S. L. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Vol. 107, pp.531-538, 2010.

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: CARVALHO, O.S., COELHO, P. M. Z., LENZI, H. L. ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, pp.207-244, 2008.

NOUR- ABOUEL, M. F., LOTFY, M. ATTALLAH, A. M. DOUGHTY, B. L. *Schistosoma mansoni* major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti – pathology vaccine development, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 101, pp. 365-372, 2006.

NOVAES, M. R. C. G., SOUZA, J. P. & ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova**, Vol. 22, 1999.

OLIVEIRA, A.C.P., ENDRINGER, D. C., AMORIN, L.A.S., BRANDÃO, M.G.L., COELHO, M. M. Effect of the extract and fraction of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.102, pp.465-469, 2005.

OLIVIER, L., STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, Vol. 38, pp.19-23, 1952.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Preventive Chemotherapy and Transmission Control (PCT). Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). **World Health Organization**, 2006.

PÁDUA, B. C., SILVA, L. D., ROSSONI JR, J. V., HUMBERTO, J. L., CHAVES, M. M., SILVA, M. E., PEDROSA, M. L., COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 129, pp 381- 386, 2010.

PARISE FILHO, R., de SOUZA, T. M., ARAÚJO, M. B., FERNANDES, A. N., SILVEIRA, M. A. B. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas especialidades farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Vol.37, pp. 61-72, 2001.

Referências Bibliográficas

PARREIRA, N. A., MAGALHÃES, L. G., MORAIS, D. R., CAIXETA, S. C., DE SOUSA, J. P., BASTOS, J. K., CUNHA, W. R., SILVA, M. L., NANAYAKKARA, N. P., RODRIGUES, V. & DA SILVA FILHO, A. A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, Vol.7, pp. 993-1001, 2010.

PAUL, E. L., LUNARDELLI, A., CABERLON, E., OLIVEIRA, C. B., SANTOS, R. C., BIOLCHI, V., BASTOS, C. M., MOREIRA, K. B., NUNES, F. B., GOSMANN, G., OLIVEIRA, J. R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, Vol.32, pp.419–425, 2009.

PEARCE, E. J. & MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews – Immunology**, Vol. 2, pp. 499–511, 2002.

PEARCE, E. J., CASPAR, P., GRZYCH, J. M., LEWIS, F. A., SHER, A. Down regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The journal of Experimental Medicine**, Vol.173, pp. 159- 166, 1991.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. - Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni, **Advances in Parasitology**, Vol. 6, pp. 233-290, 1968.

PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Revista Brasileira Malariol**, Vol.8, pp. 589-97, 1956.

PELLEGRINO, J., OLIVEIRA, C.A., FARIA, J., CUNHA, A.S. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 11, pp. 201-15, 1962.

PESSÔA, R. F., CASTRO, N. G. & NOEL, F. Binding of [3H] MK-801 in subcellular fractions of *Schistosoma mansoni*: evidence for interaction with nicotinic receptors. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 69, pp. 1509-1516, 2005.

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

PICA- MATTOCCIA, L., CIOLI, D., ARCHER, S. Binding of oxam-niquine to the DNA of schistosomes. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.83, pp. 373-376, 1989.

Referências Bibliográficas

PICA-MATTOCCIA, L., NOVI, A & CIOLI, D. Enzymatic basis for the lack of oxamniquina activity in *Schistosoma haematobium* infections. **Parasitology Research**, Vol. 83, pp.167-175, 1997.

PORDEUS, L. C., AGUIAR, L. R., QUININO, L. R. M., BARBOSA, C. S. The Occurrence of Acute and Chronic Froms of the Schistossomiais Mansonic in Brazil from 1997 to 2006: A Revision of Literature. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, Vol. 17, pp,163, 2008.

PRATA, A. Tipos de ovos de *Schistosoma mansoni*. In: Biópsia retal na esquistossomose mansoni. Rio de Janeiro: **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. pp.15-60, 1957.

RAMOS, J. A. Ações da dexametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênico [**Dissertação de Mestrado**]. Faculdade de Farmácia, UFRJ, 2004.

RASO, P., & NEVES, J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansônica através de punções biopsias. **Anais da Faculdade de Medicina de Minas Gerais**, Vol.22, pp.147-165, 1965.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Vol. 39, pp. 603-613, 2001.

RIBEIRO- DOS- SANTOS, G., VERJOVSKI- ALMEIDA, S., LEITE, C.C. Schistosomiasis – A century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, Vol. 99, pp. 505-521, 2006.

SANDERSON, L., BARTLETT, A., WHITFIELD, P. J. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*). Extract towards adult shistosomes and their egg production. **Journal Helminthology**, Vol. 76, pp. 241-247, 2002.

SANGSTER, N.C., SONG, J., DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**, Vol. 131, pp. S179-S190, 2005.

SANTOS- FILHO, D., SARTI, S .J., VICHNEWSKI, W., BULHOES, M. S., LEITÃO FILHO, H. F. Atividade Moluscicida em *Biomphalaria Glabrata*, de uma Lactona Diterpênica e uma Flavona Isoladas de *Baccharis trimera* (Less) A.P. de Candole. **Fac.Farm.Odont. Ribeirão Preto**, Vol.17, pp.43-47, 1980.

SAS Institute Incorporation. 2002-2003. **Statistical analysis system. Release 9.1. (Software)**. Cary. USA.

Efeito Esquistossomicida da *Baccharis trimera* (Less) DC. *in vitro* e *in vivo* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICCK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M.O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 15, pp. 301-332, 2001.

SCRIMGEOUR, E. M., & GAJDUSEK, D. C. Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection: **A review. Behavioral and Brain Functions**, Vol. 108, pp. 1023-1038, 1985.

SHAOHONG, L., KUMAGAI, T., QINGHUA, Q., XIAOLAN, Y., OHMAE, H., YABU, Y., SIWEN, L., LIYONG, W., MARUYAMA, H. & OHTA, N. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitology International**, Vol. 55, pp. 63-68, 2006.

SHAW. M. K. & ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. **Experimental Parasitology**, Vol.65, pp.31-42, 1998.

SHUHUA, X. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Tropica**, Vol. 96, pp. 153-167, 2005.

SHUHUA, X., BINGGUI, S., CHOLLET, J., TANNER, M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. **Acta Tropica**, Vol. 76, pp. 107-117, 2000.

SILVA PENILDON: **Farmacologia**, Ed. Guanabara Koogan, 4ª ed; p.1226, 1227, 1994.

SILVA, A., SANTANA, L. B., JESUS, A. R., BURATITINI, M.N., CARVALHO, E. Aspectos clínicos de um surto de esquistossomose aguda no Estado de Sergipe, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol.33, pp.376, 2000.

SIMÕES- PIRES, C. A., QUEIROZ, F. HENRIQUES, A. T., HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochem Analysis**, Vol.16, pp. 307-314, 2005.

Referências Bibliográficas

- SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.D., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp. 387-415, 2000.
- SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: C. M. O. Simões, E. P., Schenkel, G., Gosmann, J. C. P., Mello, L. A., Mentz, P. R. & Petrovik (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Editora da UFSC, pp. 467-495, 2003.
- SKELLY, P. J. & WILSON, R. A. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, Vol. 63, pp.185–284, 2006.
- SMITHERS, S., R., & DOENHOFF, M., J. Schistosomiasis In: COHEN, S., WARREN, K., S. Immunology of parasitic infection. 2 ed. **Oxford, Blackwell Scientific publications**, 1976.
- SOICKE, H., PESCHLOW, A. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, Vol.52, n.1, pp. 37-39, 1986.
- SOUSA, M. P., MATOS, M. E., MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., CRAVEIRO, A. A. Carqueja. In: De Sousa, M. P., et al. (Eds.). **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras**, Ed. UFC, Fortaleza, pp. 223–228, 1991.
- SULEIMAN, M. I., A/KARIM, E. I., IBRAHIM, K. E. E., AHMED, B. M., SAEED, A. E. M., HAMID, A. E. M. E. Photo-thermal stability of praziquantel. **Saudi Pharmaceutocal Journal**, Vol. 12, pp. 157-162, 2004.
- TAMAN, A., RIBEIRO, P., Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Vol. 176, pp.42-50, 2011.
- TOLEDO, A. C. O., HIRATA, L. L., BUFFON, M. C. M., MINGUEL. M. D., MINGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta, Bragança paulista**, Vol. 21, pp. 7-13, 2003.
- TONUCI, L. R. S.; MELO, N. I.; DIAS, H. J.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G. P.; MONTOVANI, A. L. L.; RAMOS, R. C.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; WILSON, R. C.; Da SILVA FILHO, A. A.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M. *In vitro* schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Vol. 22, pp. 88-93, 2012.

Referências Bibliográficas

- TORRES, L. M., GAMBERINI, M. T., ROQUE, N.F., LIMA-LANDMAN, M.T., SOUCCAR, C., LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, Vol. 55, pp. 617–619, 2000.
- UCHEGBU, I., Introduction. In Polymers in drug delivery, Uchegbu, I., Schatzlein, A., Eds. **Taylor & Francis**: Boca Raton, 2006.
- UTZINGER, J., CHOLLET, J., TU, Z. W., XIAO, S. H. & TANNER, M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 96, pp. 318-323, 2002.
- UTZINGER, J., CHOLLET, J., YOU, J. Q., MEI, J. Y., TANNER, M., XIAO, S. H. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. **Acta Tropica**. Vol.9, pp.18, 2001.
- UTZINGER, J., KEISER, J., SHUHUA, X., TANNER, M., SINGER, B. H. Combination chemotherapy of Schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol.47, pp.1487-1495, 2003.
- VAN DER WERF, M. J., DE VLAS, S. J., BROOKER, S., LOOMAN, C. W., NAGELKERKE, N. J., HABBEMA, J. D. & ENGLES, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, Vol.86, pp. 125-139, 2003.
- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas Medicinais, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Vol. 27, pp 1- 7, 2006.
- VEIGA Jr., V. F. E., & PINTO, A. C. Plantas Medicinais: Cura segura? **Química Nova**, Vol.28, pp.519- 528, 2005.
- VERAS, L. M., GUIMARÃES M.A., CAMPELO Y.D., VIEIRA, M.M. NASCIMENTO3, C., LIMA, D. F., VASCONCELOS, L., NAKANO, E., KUCKELHAUS, S. S., BATISTA, M.C., LEITE, J.R., AND MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, Vol. 19, pp. 1- 8, 2012.
- VERDI, L. G., BRIGHENT, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, Vol. 28, pp. 85–94. 2005.
- WAGNER, H., BLADT, S. Plant Drug Analysis, Second Edition, ed. Springer, 1996

Referências Bibliográficas

WATANABE, T. M. Caracterização farmacognóstica de espécies de *Baccharis* comercializadas como carquejas. **Revista Racine**, Vol.15, pp. 90-95, 2005.

WILSON, M. S., MENTINICK-KANE, M. M., PESCE, J. T., RAMALINGAM, T. R., THOMPSON, R., WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology & Cell Biology**. Vol. 85, pp. 148-154, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO monograph on good agricultural and collection practice (GACP) of *Artemisia annua* L, **World Health Organization, Geneva, Switzerland**, 2006.

XAVIER, E. M., SILVA, N. L., WERKHAUSER, R. P., FRANCO, G. R., LIRA, R.A.A., SIMPSON, A. J. G., ABARH. F. G. C. The Tegumento do *Schistosoma mansoni*: Genes, Antigens and the Host- Parasite Relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.93, pp. 85-86, 1998.

XIAO, S. H. & CATTO, B. A., *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol.33, pp.1557- 62, 1989.

XIAO, S. H., HOTEZ, P. J. & TANNER, M. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its *in vivo* effect on the biochemical metabolism of the asian schistosome. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Vol. 31, pp. 724-732, 2000.

XIAO, S. H., YOU, J. Q., YANG, Y. Q. WANG, C. Z. Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, Vol. 26, pp.306- 318, 1995.

YASHIOKA, L., MAGALHÃES, E. M. Z. , MAGALHÃES, L. A. & LINHARES, A. X. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 35, pp. 203-207, 2002.