

CLAUDINEIDE NASCIMENTO FERNANDES DE OLIVEIRA

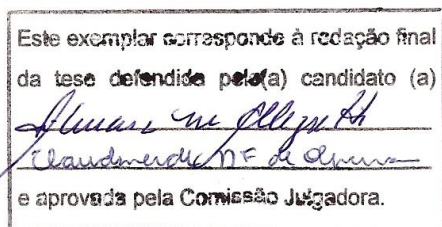
**Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade de frações e compostos isolados de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH**

Campinas, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CLAUDINEIDE NASCIMENTO FERNANDES DE OLIVEIRA

“Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade de frações e  
compostos isolados de *Phyllanthus amarus* contra o  
*Schistosoma mansoni* linhagem BH”



Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutora em Parasitologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti  
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vera Lucia Garcia Rehder

CAMPINAS, 2012

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

|      |   |
|------|---|
| OL4a | <p>Oliveira, Claudineide Nascimento Fernandes de, 1979-<br/>Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da atividade de frações e compostos isolados de <i>Phyllanthus amarus</i> contra o <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem BH / Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Silmara Marques Allegretti.<br/>Coorientador: Vera Lúcia Garcia Rehder.<br/>Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Schistosoma mansoni</i>. 2. <i>Phyllanthus amarus</i>.<br/>3. Extrato etanólico. 4. Lignanas. 5. Plantas medicinais – Uso terapêutico. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Rehder, Vera Lúcia Garcia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de</p> |
|------|---|

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Evaluation *in vitro* and *in vivo* activity of fractions and compounds isolated from *Phyllanthus amarus* against *Schistosoma mansoni* strain BH

**Palavras-chave em Inglês:**

*Schistosoma mansoni*

*Phyllanthus amarus*

Ethanollic extract

Lignans

Medicinal plants – Therapeutic use

**Área de concentração:** Parasitologia

**Titulação:** Doutora em Parasitologia

**Banca examinadora:**

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Mara Cristina Pinto

Marili Vila Nova Rodrigues

Lizandra Guidi Magalhães

Josué de Moraes

**Data da defesa:** 09-10-2012

**Programa de Pós Graduação:** Parasitologia


Campinas, 09 de outubro de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marili Vila Nova Rodrigues

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Mara Cristina Pinto

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Lizandra Guidi Magalhães

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Josué de Moraes

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marlene Tiduko Ueta

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Luiz Augusto Magalhães

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Carmen Lucia Queiroga

\_\_\_\_\_  
Assinatura



**Dedico:**

À Júlio, meu marido e grande incentivador de tudo. A você meu companheiro, meu amigo, meu amor quero dizer que foi a pessoa essencial para que esse sonho se tornasse realidade, pois sempre me motivou e me apoiou incondicionalmente, quem tem você como eu tenho, só pode viver em felicidade plena.

Ao meu pequeno Júlio Filho, que veio trazer ainda mais luz e felicidade a minha vida, hoje não consigo mais me imaginar sem esse anjinho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti por sua orientação ao longo do doutorado. Obrigada por sua disponibilidade, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos comigo. Obrigada por muitas vezes ter sido muita mais que uma orientadora e amiga, mas uma mãe mesmo, porque só uma mãe nos acolhe e compreende como você assim fez durante toda a minha caminhada aqui na Unicamp. Obrigada pelo crescimento que você me proporcionou!

À Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, o meu muito obrigado por toda amizade, confiança, pelo aprendizado e pela oportunidade que você me deu de conhecer esse mundo incrível que é o da pesquisa científica com plantas medicinais.

Aos membros da banca de defesa dessa tese, por suas importantes sugestões que ajudaram a aprimorar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pelas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Parasitologia, por todo esforço empenhado na formação dos alunos deste local, a quem se dedicam intensamente.

Ao meu marido Júlio César maior incentivador desta minha conquista, um exemplo de amor à ciência e incansável busca da disseminação do saber. Obrigada marido pela sua paciência (e quanta paciência), companheirismo e incondicional apoio, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos meus pais (Claudionor e Lucineide) e meus irmãos (Fabrícia, Valéria e Claudionor Filho), pelo amor e admiração sempre demonstrados por mim. Vocês mesmo longe sempre me incentivaram a lutar pelos meus ideais. Obrigada pela família abençoada que tenho!

Ao meu cunhado Juliano (Juliné), por ter feito companhia ao meu marido durante as minhas ausências e por ser tão prestativo sempre que precisei.

À João Baptista Alves de Oliveira e Letícia Aparecida Duart Bastos, por me ajudarem sempre. Sem o apoio técnico e amizade de vocês, com certeza esse trabalho teria sido realizado com mais dificuldades.

À Cibele Silva Rodrigues, pela amizade e auxílio na obtenção das amostras de *P. amarus*.

À Adriana Silva Santos de Oliveira (CPQBA) pela amizade e apoio nas diluições das amostras.

À Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz (CPQBA) por sua prestatividade, apoio, paciência e imensa colaboração na avaliação de toxicidade das amostras.

À Rosimeire Nunes de Oliveira (amiga “Schisto”), minha amiga-irmã nordestina, que chegou a tão pouco tempo e com seu jeito extrovertido e carinhoso conquistou não só a mim, mas a minha família. À você o meu muito obrigada por estar sempre disposta a me ouvir, a me aconselhar, a enxugar as minhas lágrimas, a rir comigo, enfim a fazer parte da minha vida de forma tão presente e intensa. Valeu por tudo, saiba que você é muito importante para mim!

À Tarsila Ferraz Frezza (amiga “Schisto”), primeira pessoinha que conheci assim que cheguei na Unicamp e desde então a amizade só fez crescer e se fortalecer. Vivemos momentos inesquecíveis juntas, partilhamos conhecimentos e experiências que sempre estarão conosco nessa estrada da vida. Obrigada por tudo!

À Rosana Aparecida Trevisan Pereira (Ro), pela amizade e presteza na realização dos cortes histológicos, sua ajuda foi imensurável, sem você não teria terminado a tempo meu trabalho. Serei eternamente grata!

Às amigas Carmen, Mariana (Mari) e Alexandra (Alê) por todo companheirismo durante essa minha jornada, vocês e seus anjinhos fizeram essa etapa da vida ficar mais amena, alegre e muito mais divertida com nossas conversas durante nossos almoços. Amigas pra sempre!

À Profa. Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari (fotos histologia) e ao aluno de pós-doc Fernando por toda atenção e por ter disponibilizado o microscópio para a complementação dos meus estudos histológicos.

À André Arnosti, por atendido ao pedido de uma colega e prontamente ter se mobilizado a encontrar um microscópio onde eu pudesse tirar minhas fotos da histologia.

Ao amigo Nilson Branco (Nêrson), por sempre se fazer prestativo quando precisei e pela amizade.

Às amigas Michelle (Mi), Maria Isabel (Bel), Júlia (Moli), Luciana (Lúcia), Maria Francisca (Kika), Eliana Camargo, Paula (Paulete), Lincoln, Ana Karollina (Karol), Cíntia e Camila (pelas massagens durante dias de stress), amigos do Laboratório de Helminologia, por todos os bons momentos que vivemos juntos e que levarei comigo para sempre.

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 Fapesp, pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que fazem parte do Departamento de Biologia Animal (Parasitologia) da Unicamp, que de uma forma ou outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigada a todos!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e  
nunca se arrepende”.

*Leonardo da Vinci*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>2</b>  |
| 1.1 Esquistossomose: Uma doença negligenciada .....   | <b>2</b>  |
| 1.2 <i>Schistosoma mansoni</i> e o ciclo evolutivo .....  | <b>4</b>  |
| 1.3 Manifestações clínicas da esquistossomose mansônica .....                                     | <b>9</b>  |
| 1.4 A Quimioterapia esquistossomicida .....   | <b>13</b> |
| 1.5 O aparecimento da resistência aos fármacos esquistossomicidas .....                           | <b>15</b> |
| 1.6 Plantas medicinais: um novo caminho no combate a esquistossomose mansônica .....              | <b>17</b> |
| 1.7 <i>Phyllanthus amarus</i> .....   | <b>21</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>26</b> |
| 2.1. Objetivo geral.....  | <b>26</b> |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | <b>26</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>28</b> |
| 3.1 Obtenção do material vegetal .....  | <b>28</b> |
| 3.2 Preparação do extrato etanólico bruto de <i>Phyllanthus amarus</i> .....                      | <b>28</b> |
| 3.3 Fracionamento do EEB por coluna seca.....   | <b>29</b> |
| 3.4 Fracionamento líquido-líquido ou partição do EEB.....   | <b>29</b> |
| 3.5 Fracionamento das frações butanólica e hexânica por coluna seca.....                          | <b>30</b> |
| 3.6 Purificação de lignanas.....  | <b>31</b> |
| 3.7 Métodos cromatográficos para análise do extrato etanólico, frações e compostos isolados ..... | <b>31</b> |
| 3.7.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....   | <b>31</b> |
| 3.7.2 Cromatografia a gás com detecção para espectrometria de massas (CG/EM) .....                | <b>32</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.8 Manutenção do ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                  | 33        |
| 3.8.1 Linhagem do <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | 33        |
| 3.8.2 Hospedeiro intermediário e infecção .....  | 33        |
| 3.8.3 Hospedeiro definitivo e infecção .....   | 34        |
| 3.9 Testes <i>in vitro</i> .....   | 34        |
| 3.9.1 Preparo do meio de cultura.....  | 34        |
| 3.9.2 Preparo das amostras.....  | 34        |
| 3.9.3 Obtenção dos vermes para realização dos testes <i>in vitro</i> .....                             | 35        |
| 3.9.4 Avaliação do efeito do EEB, frações e substâncias isoladas na cultura de <i>S. mansoni</i> ..... | 35        |
| 3.10 Testes <i>in vivo</i> .....   | 36        |
| 3.10.1 Tratamento dos camundongos .....  | 36        |
| 3.10.2 Análises realizadas após o tratamento .....   | 38        |
| 3.11 Ensaaios de citotoxicidade.....   | 105       |
| 3.12 Análises estatísticas .....   | 41        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....   | <b>44</b> |
| 4.1 Estudos fitoquímicos.....  | 44        |
| 4.1.1 Análise do EEB .....   | 45        |
| 4.1.2 Análise do fracionamento do EEB por coluna seca .....  | 50        |
| 4.1.3 Fracionamento líquido-líquido ou partição do EEB .....   | 54        |
| 4.1.4 Fracionamento das frações hexânica (FHEX) e butanólica (FBuOH) por coluna seca .....             | 57        |
| 4.2. Testes <i>in vitro</i> .....  | 61        |
| 4.2.1 Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> durante os testes <i>in vitro</i> .....      | 62        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.2 Cálculo da DL <sub>50</sub> .....   | 71         |
| 4.2.3 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados na separação dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> durante os testes <i>in vitro</i> .....  | 72         |
| 4.2.4 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados na oviposição dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> durante os testes <i>in vitro</i> ..... | 74         |
| 4.2.5 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados no tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> durante os testes <i>in vitro</i> .....   | 76         |
| 4.3 Testes <i>in vivo</i> .....   | 80         |
| 4.3.1 Escolha das amostras para realização dos testes <i>in vivo</i> .....  | 80         |
| 4.3.2 Ação da F2BuOH e lignanas sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> ..   | 80         |
| 4.3.3 Ação da F2BuOH e lignanas sobre a oviposição dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....  | 86         |
| 4.3.4 Ação da F2BuOH e lignanas sobre os granulomas hepáticos .....   | 90         |
| 4.3.5 Ação da F2BuOH e lignanas sobre o tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após os ensaios <i>in vivo</i> .....                                       | 94         |
| 4.3.6 Síntese dos tratamentos realizados <i>in vivo</i> .....   | 103        |
| 4.4 Ensaios de citotoxicidade.....  | 105        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>110</b> |
| 5.1 Estudos fitoquímicos.....   | 110        |
| 5.2 Ensaios <i>in vitro</i> .....   | 112        |
| 5.3 Ensaios <i>in vivo</i> .....  | 117        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....  | <b>130</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>134</b> |



## Lista de Tabelas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Plantas medicinais que já foram investigadas quanto à atividade esquistossomicida mansônica.....  | <b>20</b> |
| <b>Tabela 2:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM no extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> .....   | <b>47</b> |
| <b>Tabela 3:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 do EEB de <i>P. amarus</i> .....   | <b>53</b> |
| <b>Tabela 4:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 3 do EEB de <i>P. amarus</i> .....   | <b>54</b> |
| <b>Tabela 5:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração hexânica da partição do EEB de <i>P. amarus</i> .....  | <b>55</b> |
| <b>Tabela 6:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração butanólica da partição do EEB de <i>P. amarus</i> .....  | <b>56</b> |
| <b>Tabela 7:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 hexânica obtida da coluna seca da FHEX do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                      | <b>59</b> |
| <b>Tabela 8:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 3 hexânica obtida da coluna seca da FHEX do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                      | <b>60</b> |
| <b>Tabela 9:</b> Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 butanólica obtida da coluna seca da FBuOH do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                   | <b>61</b> |
| <b>Tabela 10:</b> Taxa de mortalidade total dos vermes de <i>S. mansoni</i> quando expostos as amostras obtidas do fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> após 72 horas de observação..... | <b>69</b> |
| <b>Tabela 11:</b> Amostras derivadas de <i>P. amarus</i> que apresentaram ação esquistossomicida para 100% dos vermes em relação ao tempo.....   | <b>70</b> |
| <b>Tabela 12:</b> Valores das DL <sub>50</sub> das amostras de <i>P. amarus</i> testadas <i>in vitro</i> .....   | <b>71</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabela 13:</b> Efeito das amostras obtidas do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> sobre a separação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após 72 horas de observação.....                    | <b>73</b>  |
| <b>Tabela 14:</b> Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> após exposição às amostras de <i>P. amarus</i> em período de incubação de 72 horas.....   | <b>77</b>  |
| <b>Tabela 15:</b> Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperados do sistema porta-hepático. Tratamento aos 45 dias de infecção.....                  | <b>83</b>  |
| <b>Tabela 16:</b> Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperados do sistema porta-hepático. Tratamento aos 60 dias de infecção.....                  | <b>83</b>  |
| <b>Tabela 17:</b> Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de ovos eliminados nas fezes de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> . Tratamento aos 45 e 60 dias de infecção.....              | <b>88</b>  |
| <b>Tabela 18:</b> Ação da F2BuOH e lignanas no tamanho dos granulomas hepáticos.....   | <b>91</b>  |
| <b>Tabela 19:</b> Avaliação das taxas de redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas em relação ao controle negativo (PBS), dos tratamentos efetuados no 45° dia de infecção..... | <b>104</b> |
| <b>Tabela 20:</b> Avaliação das taxas de redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas em relação ao controle negativo (PBS), dos tratamentos efetuados no 60° dia de infecção..... | <b>104</b> |
| <b>Tabela 21:</b> Valores do <i>Total Growth Inhibition</i> (TGI) ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o EEB e as lignanas filantina e nirantina em cada linhagem testada.....  | <b>108</b> |

## Lista de Figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Distribuição mundial da esquistossomose.....   | <b>3</b>  |
| <b>Figura 2:</b> Distribuição da esquistossomose mansônica nos estados brasileiros.....   | <b>6</b>  |
| <b>Figura 3:</b> Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .....  | <b>9</b>  |
| <b>Figura 4:</b> Estrutura química do Praziquantel.....   | <b>14</b> |
| <b>Figura 5:</b> A. <i>Phyllanthus amarus</i> cultivada no Campo Experimental do Centro de Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) - UNICAMP, 2011. B. Imagem ampliada de <i>P. amarus</i> ..... | <b>23</b> |
| <b>Figura 6:</b> Mudanças de <i>P. amarus</i> cultivada em Casa de Vegetação do CPQBA – UNICAMP e imagem ampliada de uma muda de <i>P. amarus</i> .....   | <b>28</b> |
| <b>Figura 7:</b> Organização da placa de meio de cultura para realização dos testes <i>in vitro</i> .....   | <b>36</b> |
| <b>Figura 8:</b> Tratamentos realizados no 45º dia de infecção.....   | <b>37</b> |
| <b>Figura 9:</b> Tratamentos realizados no 60º dia de infecção.....   | <b>38</b> |
| <b>Figura 10:</b> Fluxograma da obtenção das amostras de <i>P. amarus</i> e seus rendimentos.....   | <b>44</b> |
| <b>Figura 11:</b> Extração e filtração a vácuo do extrato etanólico bruto.....  | <b>45</b> |
| <b>Figura 12:</b> Cromatografia em Camada Delgada do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> .....  | <b>46</b> |
| <b>Figura 13:</b> Análise do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> por CG/EM.....   | <b>46</b> |
| <b>Figura 14:</b> Espectro de massas da substância filantina de $t_R$ 25,45 minutos.....  | <b>48</b> |
| <b>Figura 15:</b> Espectro de massas da substância filantalina de $t_R$ 25,56 minutos.....  | <b>48</b> |
| <b>Figura 16:</b> Espectro de massas da substância hipofilantina de $t_R$ 26,60 minutos.....  | <b>49</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 17:</b> Espectro de massas da substância nirtetralina de $t_R$ 26,04 minutos.....   | <b>49</b> |
| <b>Figura 18:</b> Espectro de massas da substância nirantina de $t_R$ 26,65 minutos.....  | <b>50</b> |
| <b>Figura 19:</b> Fracionamento do extrato etanólico bruto por coluna seca.....   | <b>50</b> |
| <b>Figura 20:</b> Análise por CCD do extrato etanólico bruto e frações 1, 2, 3, 4 e 5 de <i>P. amarus</i> obtidas por coluna seca.....                | <b>51</b> |
| <b>Figura 21:</b> Análise por CG/EM da fração 1 do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> .....  | <b>52</b> |
| <b>Figura 22:</b> Análise por CG/EM da fração 2 do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> .....  | <b>52</b> |
| <b>Figura 23:</b> Análise por CG/EM da fração 3 do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> .....  | <b>53</b> |
| <b>Figura 24:</b> Análise por CG/EM da fração hexânica da partição líquido-líquido do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                   | <b>55</b> |
| <b>Figura 25:</b> Análise por CG/EM da fração butanólica da partição líquido-líquido do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                 | <b>56</b> |
| <b>Figura 26:</b> CCD das frações 1, 2 e 3 hexânicas da coluna seca da fração hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> .....                               | <b>57</b> |
| <b>Figura 27:</b> Análise por CG/EM da fração 1 hexânica da coluna seca da fração hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> .....                           | <b>58</b> |
| <b>Figura 28:</b> Análise por CG/EM da fração 2 hexânica da coluna seca da fração hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> .....                           | <b>58</b> |
| <b>Figura 29:</b> Análise por CG/EM da fração 3 hexânica da coluna seca da fração hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> .....                           | <b>59</b> |
| <b>Figura 30:</b> Análise por CCD da fração butanólica e frações 1, 2 e 3 butanólicas obtidas do EEB de <i>P. amarus</i> .....                        | <b>60</b> |
| <b>Figura 31:</b> Análise por CG/EM da fração 2 butanólica da coluna seca da FBUOH do EEB de <i>P. amarus</i> .....                                   | <b>61</b> |
| <b>Figura 32:</b> Efeito do extrato etanólico bruto de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> ..... | <b>63</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 33:</b> Efeito da fração 1 do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....            | <b>63</b> |
| <b>Figura 34:</b> Efeito da fração 2 do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....            | <b>63</b> |
| <b>Figura 35:</b> Efeito da fração 3 do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....            | <b>64</b> |
| <b>Figura 36:</b> Efeito da fração 4 do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....            | <b>64</b> |
| <b>Figura 37:</b> Efeito da fração aquosa do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....       | <b>64</b> |
| <b>Figura 38:</b> Efeito da fração hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....     | <b>65</b> |
| <b>Figura 39:</b> Efeito da fração butanólica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | <b>65</b> |
| <b>Figura 40:</b> Efeito da fração 1 hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | <b>65</b> |
| <b>Figura 41:</b> Efeito da fração 2 hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | <b>66</b> |
| <b>Figura 42:</b> Efeito da fração 3 hexânica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....   | <b>66</b> |
| <b>Figura 43:</b> Efeito da fração 2 butanólica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> ..... | <b>66</b> |
| <b>Figura 44:</b> Efeito da fração 3 butanólica do EEB de <i>P. amarus</i> na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> ..... | <b>67</b> |
| <b>Figura 45:</b> Efeito da lignana nirantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                              | <b>67</b> |
| <b>Figura 46:</b> Efeito da lignana filantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                              | <b>67</b> |
| <b>Figura 47:</b> Efeito da lignana hipofilantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                          | <b>68</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 48:</b> Efeito da composição de lignanas filantina + filtetralina + nirtetralina na sobrevivência dos vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....  | <b>68</b> |
| <b>Figura 49:</b> Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto, frações 1, 2, 3, 4 na postura de ovos de vermes de <i>Schistosoma mansoni in vitro</i> .....   | <b>75</b> |
| <b>Figura 50:</b> Efeito de diferentes concentrações das partições aquosa, hexânica, butanólica e respectivas frações na postura de ovos de vermes de <i>Schistosoma mansoni in vitro</i> .....   | <b>75</b> |
| <b>Figura 51:</b> Efeito de diferentes concentrações das lignanas: filantina, hipofilantina, nirantina e filantina + filtetralina + nirtetralina na postura de ovos de vermes de <i>Schistosoma mansoni in vitro</i> .....                    | <b>75</b> |
| <b>Figura 52:</b> Vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> . A) Fêmea do grupo controle negativo (sem adição de substâncias). B e C) Vermes fêmeas expostas à lignana nirantina.....  | <b>78</b> |
| <b>Figura 53:</b> Taxa de redução do número de vermes fêmeas recuperadas do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.....  | <b>84</b> |
| <b>Figura 54:</b> Taxa de redução do número de vermes fêmeas recuperadas do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.....  | <b>84</b> |
| <b>Figura 55:</b> Taxa de redução do número total de vermes recuperados do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.....   | <b>85</b> |
| <b>Figura 56:</b> Taxa de redução do número total de vermes recuperados do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.....   | <b>85</b> |
| <b>Figura 57:</b> Taxa de redução do número de ovos em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.....  | <b>89</b> |
| <b>Figura 58:</b> Taxa de redução do número de ovos em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.....  | <b>89</b> |
| <b>Figura 59:</b> Avaliação da ação da F2BuOH e lignanas sobre a viabilidade dos ovos de <i>S. mansoni</i> , comparadas com a do grupo controle negativo (não tratado) e com o praziquantel. Tratamento realizado no 45° dia de infecção..... | <b>90</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 60:</b> Avaliação da ação da F2BuOH e lignanas sobre a viabilidade dos ovos de <i>S. mansoni</i> , comparadas com a do grupo controle negativo (não tratado) e com o Praziquantel. Tratamento realizado no 60° dia de infecção.....   | <b>90</b>  |
| <b>Figura 61:</b> Granulomas hepáticos dos tratamentos realizados no 45° dia de infecção com as amostras da F2BuOH 100 mg/kg, F2BuOH 200 mg/Kg, F2BuOH 100 mg/kg/3 dias consecutivos, F+F+N 100 mg/Kg, F+N 100 mg/Kg, nirantina 100 mg/Kg e os grupos controle negativo (PBS) e positivo tratado com PZQ..... | <b>92</b>  |
| <b>Figura 62:</b> Granulomas hepáticos dos tratamentos realizados no 60° dia de infecção com as amostras da F2BuOH 100 mg/kg, F+F+N 100 mg/kg, F+N 100 mg/kg, nirantina 100 mg/kg e os grupos controle negativo (PBS) e positivo tratado com PZQ.....   | <b>93</b>  |
| <b>Figura 63:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle negativo não tratado.....   | <b>96</b>  |
| <b>Figura 64:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com F2BuOH 100mg/kg no 45° dia de infecção.....  | <b>97</b>  |
| <b>Figura 65:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com F2BuOH 200 mg/kg no 45° dia de infecção.....   | <b>98</b>  |
| <b>Figura 66:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com F2BuOH 100 mg/kg/ 3 dias consecutivos no 45° dia de infecção.....  | <b>99</b>  |
| <b>Figura 67:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos grupos tratados com filantina+nirantina 100 mg/kg e filantina + filtetralina + nirtetralina 100mg/kg no 45° dia de infecção.....  | <b>100</b> |
| <b>Figura 68:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com nirantina 100 mg/kg no 45° dia de infecção.....  | <b>101</b> |
| <b>Figura 69:</b> Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle positivo tratado com PZQ 40 mg/kg no 45° dia de infecção.....   | <b>102</b> |
| <b>Figura 70:</b> Porcentagem do crescimento celular para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto.....  | <b>106</b> |
| <b>Figura 71:</b> Porcentagem do crescimento celular para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto.....  | <b>107</b> |
| <b>Figura 72:</b> Porcentagem do crescimento celular para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto.....  | <b>107</b> |

## Lista de abreviaturas

**EEB** – extrato etanólico bruto

**Fr 1** – fração 1 obtida da coluna seca do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**Fr 2** – fração 2 obtida da coluna seca do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**Fr 3** – fração 3 obtida da coluna seca do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**Fr 4** – fração 4 obtida da coluna seca do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**FH<sub>2</sub>O** – fração aquosa obtida da partição do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**FHEX** – fração hexânica obtida da partição do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**FBuOH** – fração butanólica partição do extrato etanólico bruto de *P. amarus*

**F1HEX** – fração 1 hexânica obtida da coluna seca da fração hexânica

**F2HEX** - fração 2 hexânica obtida da coluna seca da fração hexânica

**F3HEX** - fração 3 hexânica obtida da coluna seca da fração hexânica

**F2BuOH** – fração 2 butanólica obtida da coluna seca da fração butanólica

**F3BuOH** – fração 3 butanólica obtida da coluna seca da fração butanólica

**F+F+N** – composição das lignanas filantina + firtetralina + nirtetralina

**F+N** – composição das lignanas filantina + nirantina

**CTRL** – controle negativo com PBS

**PZQ** – Praziquantel

**CG/EM** – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada



## RESUMO

OLIVEIRA, C. N. F. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade de frações e compostos isolados do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH.** 2012. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

A propagação da esquistossomose e a ameaça de tolerância e resistência ao fármaco de escolha, o praziquantel, têm intensificado as pesquisas utilizando plantas medicinais com o intuito de promover o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas. A planta *Phyllanthus amarus* (quebra-pedra) possui atividades anti-inflamatória e hepatoprotetora já comprovadas cientificamente, o que fez com que a mesma fosse selecionada para este estudo, uma vez que a principal patologia da esquistossomose é a formação de granulomas (processo inflamatório) no fígado. Esse trabalho teve como objetivo fazer um fracionamento biomonitorado do extrato etanólico de *P. amarus* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* com o intuito de verificar a ação esquistossomicida dessa planta contra o *S. mansoni* linhagem BH. Para a realização dos testes *in vitro*, os vermes adultos coletados foram incubados em placas contendo meio de cultura RPMI 1640, um casal de verme e amostras de extrato etanólico bruto, frações de diferentes polaridades ou lignanas isoladas nas concentrações 200, 100, 50 e 25 µg/mL. Os vermes foram observados por um período de 72 horas, sendo avaliados a taxa de mortalidade, a oviposição, o acasalamento e as alterações tegumentares. A melhor atividade *in vitro* foi observada com a fração 2 butanólica, pois foi letal para 100% dos vermes em 48 h de observação, sendo assim selecionada para os testes *in vivo*. A fração 2 butanólica é composta majoritariamente por lignanas, por isso algumas delas (nirantina, filantina + nirantina e filantina + filtetralina + nirtetralina), mesmo não sendo efetivas nos testes *in vitro*, foram selecionadas para avaliação *in vivo*. Nos testes *in vivo* camundongos Balb/c foram tratados oralmente, 45 ou 60 dias após a infecção. No 45º dia de infecção os animais foram tratados com 100 e 200 mg/kg da fração 2 butanólica, 100 mg/kg das lignanas nirantina, filantina + nirantina e filantina + filtetralina + nirtetralina em dose única e 100 mg/kg da fração 2 butanólica distribuídos em 3 dias consecutivos. Já no 60º dia de infecção o tratamento foi feito em dose única com a fração 2 butanólica, nirantina, filantina + nirantina e filantina + filtetralina + nirtetralina (100mg/kg). A atividade *in vivo* foi avaliada com base nos seguintes parâmetros: ação sobre os vermes adultos, ovos eliminados nas fezes, oograma, formação das reações granulomatosas, e ação sobre o tegumento (feita por microscopia eletrônica de varredura - MEV). Os tratamentos mais efetivos no 45º dia de infecção foram apresentados pelos grupos tratados com filantina + nirantina e nirantina (100mg/kg). A lignana nirantina apresentou taxa de redução do número de ovos de 90,3% e a associação da filantina + nirantina, 63,8%. Os resultados referentes aos demais parâmetros (redução do total de vermes, de vermes fêmeas e do

número de granulomas) foram semelhantes, apresentando taxas de redução em torno de 58%. Além dessas alterações, as imagens obtidas por MEV mostraram extensas lesões no tegumento dos vermes machos. No 60º dia de infecção, a associação de lignanas filantina + nirantina e a fração 2 butanólica (100mg/kg) apresentaram as taxas de redução mais significativas: 50,8% e 46,7% para o número total de vermes, 47,2% e 42,7% para o número de vermes fêmeas, 87,5% e 98,3% para o número de ovos e 44% e 18% para o número de granulomas, respectivamente. Assim sendo, de acordo com os parâmetros biológicos avaliados neste trabalho, a associação das lignanas filantina:nirantina na concentração de 100 mg/kg revelou um efeito esquistossomicida promissor, uma vez que foi efetiva nos dois períodos estudados.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; *Phyllanthus amarus*; extrato etanólico/lignanas; plantas medicinais; tratamento.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, C. N. F. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of fractions and isolated compounds of the ethanol extract of *Phyllanthus amarus* against *Schistosoma mansoni*, BH strain.** 2012. Thesis (Doctorate in Parasitology) – Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

The dissemination of schistosomiasis and the threat of its causing agents becoming resistant to the drug of choice, i.e., praziquantel, have intensified the research with medicinal plants to promote the development of new schistosomicidal drugs. *Phyllanthus amarus* (stone-breaker) is a plant whose anti-inflammatory and hepatoprotective activities have already been attested, which is the reason why it was chosen for this study, as the main pathology of schistosomiasis is the formation of granulomas (inflammatory process) in the liver. The aim of this work was to carry out a bioguided fractionation of the ethanol extract of *P. amarus* by means of *in vitro* and *in vivo* assays in order to verify the schistosomicidal potential of that plant against *S. mansoni*, BH strain. To carry out the *in vitro* assays, the collected adult worms were incubated in plates containing RPMI 1640 medium, a pair of mating worms, and samples of crude ethanol extract, fractions of different polarities or isolated lignans at the concentrations of 200, 100, 50 and 25 µg/mL. The worms were observed over a period of 72 hours, in which mortality rate, egg laying, mating, and tegumentary changes were evaluated. The best *in vitro* activity was provided by butanol fraction 2, as it proved lethal for 100% of the worms over 48 hours of observation, and so it was used in the *in vivo* assays. Butanol fraction 2 is mainly composed of lignans, and some of them (nirantin, filantin :nirantin, and filantin + filtetralin + nirtetralin), albeit not effective in the *in vitro* assays, were selected for *in vivo* evaluation. In the *in vivo* assays, Balb/c mice were treated orally 45 or 60 days following infection. On the 45<sup>th</sup> day following infection, the animals were treated with 100 and 200 mg/kg of butanol fraction 2, 100 mg/kg of filantina:nirantin and filantin + filtetralin + nirtetralin in a single dose, and 100 mg/kg of butanol fraction 2 distributed over 3 consecutive days. On the 60<sup>th</sup> day following infection, the treatment was carried out in a single dose with 100 mg/kg of butanol fraction 2, nirantin, filantina:nirantin, and filantin + filtetralin + nirtetralin. The *in vivo* activity was evaluated based on the following parameters: action on adult worms, eggs eliminated in the stool, egg counting, granulomatous reactions, and action on the tegument of the worms (using scanning electron microscopy (SEM)). The most effective treatments on the 45<sup>th</sup> day were those carried out with 100 mg/kg of filantina:nirantin, and nirantin. The association of filantina:nirantin provided a reduction of 63.8% in the number of eggs, whereas nirantin achieved a reduction rate of 90.3%. The results for the other parameters (reduction in the total number of worms, number of females, and number of granulomas) were similar with reduction rates around 58%. In addition to such changes, images obtained by SEM showed extensive lesions on the tegument of male worms. On the 60<sup>th</sup> day following infection, the filantin + nirantin association and butanol fraction 2 at 100 mg/kg achieved the most significant

reduction rates: 50.8% and 46.7% in the total number of worms, respectively; 47.2% and 42.7% in the number of females, respectively; 87.5% and 98.3% in the number of eggs, respectively; and 44% and 18% in the number of granulomas, respectively. Therefore, according to the biological parameters evaluated in this work, the association of the lignans filantina:nirantin at 100 mg/kg has a promising schistosomicidal activity, as it was effective over two periods of treatment.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; *Phyllanthus amarus*; ethanol extract/ lignans; medicinal plants; treatment.

# 1. Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquistossomose: uma doença negligenciada

As doenças negligenciadas correspondem a um conjunto de doenças infecciosas causadas principalmente por parasitas e bactérias, que estão associadas a populações que vivem em situação de pobreza e precárias condições de vida. Essas doenças contribuem para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, em razão principalmente do impacto na saúde infantil, na redução da produtividade da população trabalhadora e na promoção do estigma social (HOTEZ et al., 2007; MINISTÉRIO da SAÚDE, 2010).

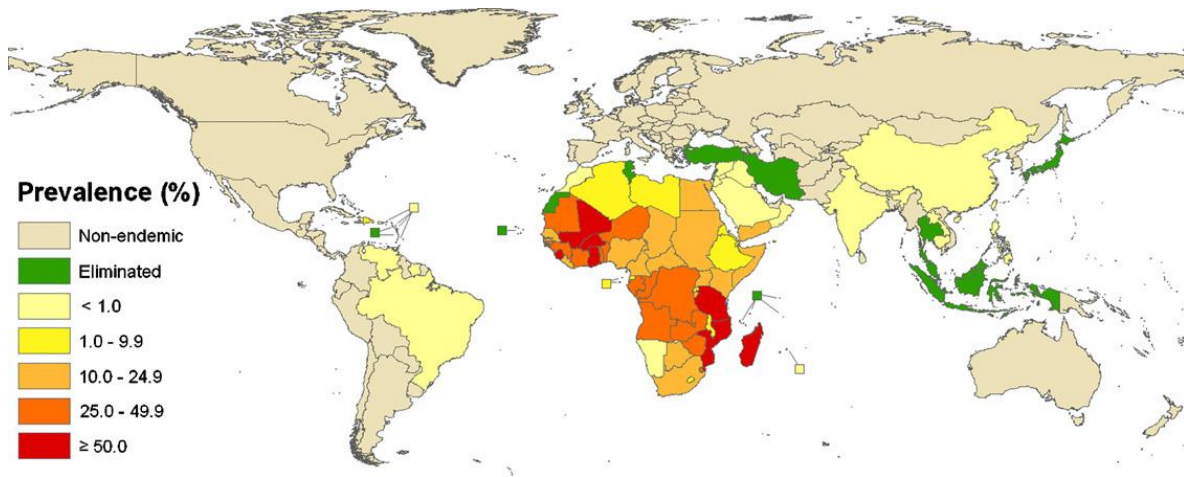
Essas doenças são assim denominadas porque apesar de serem responsáveis por quase metade da carga de doença nos países em desenvolvimento, os investimentos em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D), tradicionalmente, não revertem em desenvolvimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos, vacinas e outras tecnologias para sua prevenção e controle (WHO, 2006; MINISTÉRIO da SAÚDE, 2010).

O problema é particularmente grave em relação à disponibilidade de medicamentos, já que as atividades de pesquisa e desenvolvimento das indústrias farmacêuticas são principalmente orientadas pelo lucro, e o retorno financeiro exigido dificilmente seria alcançado no caso de doenças que atingem populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, localizadas, majoritariamente, nos países em desenvolvimento. Um aspecto adicional que contribui para a manutenção dessa situação diz respeito à baixa prioridade recebida por essas doenças no âmbito das políticas e dos serviços de saúde (WERNECK et al., 2011).

Pelo menos 1 bilhão de pessoas - um sexto da população mundial - atualmente sofrem de uma ou mais doenças negligenciadas, sendo a esquistossomose considerada uma das mais significantes e prevalentes (HOTEZ et al., 2007; STEINMANN et al., 2006; WHO, 2006).

A esquistossomose é uma das doenças mais debilitantes e negligenciadas de regiões tropicais e subtropicais, estando distribuída em 74 países situados em

três diferentes continentes: África, Ásia e América (Figura 1) (STEINMANN et al., 2006; HOTEZ et al., 2007). Estima-se que a doença afete mais de 207 milhões de pessoas no mundo, cerca de 800 milhões vivem em áreas de risco de infecção e 280 mil morrem anualmente com a doença (MITSUI et al., 2009; PENIDO et al., 2008; STEINMANN et al., 2006). Metade dos pacientes infectados são sintomáticos e em torno de 20 milhões apresentam manifestações graves da doença (STEINMANN et al., 2006).



**Figura 1.** Distribuição mundial da esquistossomose. Fonte: Utzinger et al., 2011.

Apesar de a esquistossomose ser uma doença de grande importância para a saúde pública, tem sido negligenciada durante décadas, correndo sérios riscos de disseminação e intensificação da doença na ausência de medidas de controle mais efetivas. O descaso com a doença acontece uma vez que, a ocorrência da esquistossomose está confinada aos trópicos e sub-trópicos, afetando principalmente os segmentos pobres da população (HOTEZ et al., 2009) e por ser uma doença crônica e debilitante que causa principalmente morbidade. Assim, a esquistossomose apresenta muito menos iniciativas globais de saúde, que ainda tendem a focar em resultados de mortalidade (GRAY et al., 2010; UTZINGER et al., 2009).

Acredita-se que a esquistossomose causa, anualmente, perdas entre 1,7 a 4, 5 milhões de “Disability Adjusted Life Years” (soma dos anos potenciais de vida

perdidos devido à prematura mortalidade e dos anos de vida produtivos perdidos devido à enfermidade). Por essa razão é considerada, dentre as doenças parasitárias negligenciadas, uma das mais prevalentes e importantes nos países em desenvolvimento (PARISE-FILHO & SILVEIRA, 2001; WHO, 2004; UTZINGER & KEISER, 2004).

Em 2006 e 2008, foram realizadas oficinas de prioridades em doenças negligenciadas e iniciado o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas no Brasil, com parceria do Ministério da Saúde e Ministério da Ciência e Tecnologia. Por meio de dados epidemiológicos, demográficos e o impacto da doença, foram definidas, entre as doenças consideradas negligenciadas, sete prioridades de atuação que compõem o programa em doenças negligenciadas, estando entre elas, a esquistossomose. (MINISTÉRIO da SAÚDE, 2010).

Espera-se que iniciativas e incentivos dados pelo governo façam com que as indústrias farmacêuticas se interessem também em desenvolver fármacos que atuem contra as doenças negligenciadas.

## **1.2 *Schistosoma mansoni* e o ciclo evolutivo**

Apesar de existirem referências de parasitismo de esquistossomas em escritos de historiadores do Egito medieval a cerca de 3500 anos, as primeiras observações do verme, hoje conhecido como *S. haematobium*, só foram registradas em 1851. No Egito, o patologista alemão Theodore Maximillian Bilharz encontrou um helminto na veia porta ao necropsiar um jovem egípcio (COURA & AMARAL, 2004; PARAENSE, 2008). Os ovos desse parasito possuíam espículo terminal. Bilharz considerando como bocas as duas ventosas existentes, e por habitar o sangue dá ao parasita o nome de *Distomum haematobium*. Ele observou também a presença de uma fenda longitudinal em todo o corpo do verme macho, denominando de *canalis gynaeophorus*. Após alguns anos, Weinland e Cobbold verificaram que somente uma ventosa continha cavidade oral e, então Weinland sugeriu o nome *Schistosoma* (corpo fendido no macho) (PARAENSE, 2008).

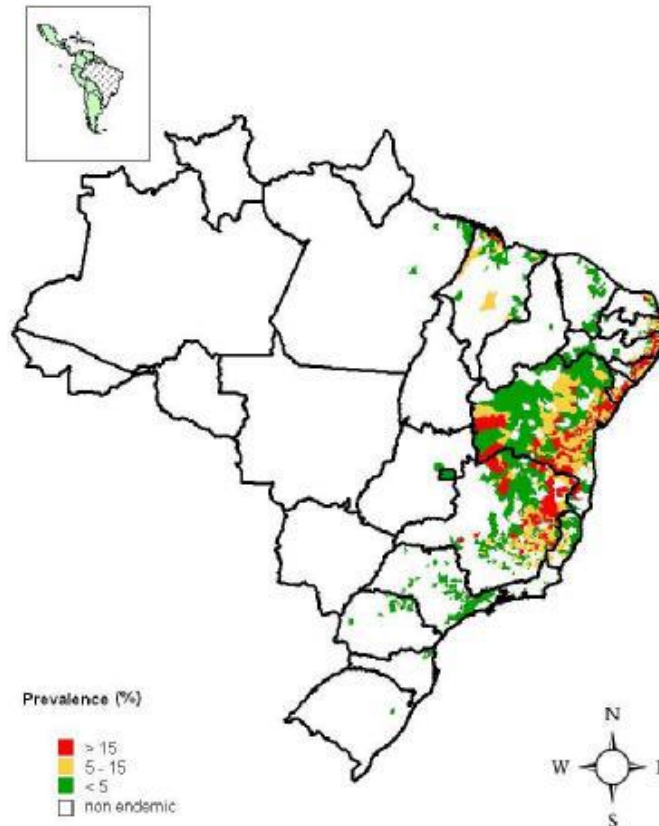


O parasito causador da esquistossomose é um trematódeo digenético que pertence ao filo *Platyhelminthes*. Na família Schistosomatidae, os vermes pertencentes ao gênero *Schistosoma* têm como característica a existência de sexos separados, com nítido dimorfismo sexual (PASSOS, 1998; RAMOS, 2004). Pertencente a este gênero existem cinco espécies que parasitam o homem, de forma eventual ou sistemática, são elas: *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* (essas três espécies são responsáveis por 95% dos casos humanos), *S. intercalatum* e *S. mekongi*, bem menos frequentes (COURA & AMARAL, 2004).

Em 1902 Manson encontrou ovos com espinho lateral, em pacientes das Antilhas, admitindo uma nova espécie de *Schistosoma*, que foi classificada como *S. mansoni*, por Sambon, em 1907. No Brasil esta mesma espécie teve sua presença confirmada por Pirajá da Silva, na Bahia, em 1908 (COURA & AMARAL, 2004; PARAENSE, 2008).

A esquistossomose mansônica ocorre em 52 países e territórios, estando presente principalmente na América do Sul, Caribe, África e Leste do Mediterrâneo, onde representa um sério problema sócio-econômico e de saúde pública, ocasionando a morte de 280.000 pessoas infectadas por ano. É conhecida por barriga d'água, xistosa, doença do caramujo ou bilharziose (KING, 2009). O *Schistosoma mansoni*, espécie encontrada no Brasil, é responsável pela esquistossomose intestinal, existindo cerca de 4 a 6 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões vivendo em áreas endêmicas, sendo o país mais afetado de todas as Américas (LAMBERTUCCI, 2010).

A doença está presente em uma vasta extensão do Brasil, ocorrendo em diversos estados, principalmente na região nordeste. A zona endêmica da doença é quase contínua do Ceará ao Espírito Santo, concentrada principalmente na região costeira (Figura 2). Bahia e Minas Gerais são os estados mais atingidos, com distribuição de casos em quase todo território (AMARAL et al., 2006).



**Figura 2:** Distribuição da esquistossomose mansônica nos estados brasileiros. Fonte: Amaral et al., 2006.

A maioria dos estudos indicam que a esquistossomose tenha sido introduzida no Brasil pelos escravos originários da costa ocidental da África que ingressaram no país pelos portos de Recife e Salvador. Os escravos foram ocupados como mão-de-obra em lavouras de cana de açúcar, onde existiam condições bio-ecológicas para que se completasse o ciclo evolutivo do parasito. A expansão da esquistossomose mansônica em território brasileiro acompanhou as correntes de migração interna e foi condicionada à presença dos moluscos, hospedeiros intermediários, do gênero *Biomphalaria*. Os moluscos vivem em água doce, sendo o principal responsável pela alta prevalência da infecção principalmente nas regiões tropicais, onde a utilização desta água é de grande importância para populações locais. No Brasil, três espécies de moluscos são os principais hospedeiros intermediários naturais do *S. mansoni*, *B. glabrata*, *B.*

*tenagophila* e *B. straminea* e duas espécies são consideradas potenciais hospedeiros, pois a infecção tem sido apenas experimental (*B. amazonica* e *B. peregrina*). (COURA & AMARAL, 2004; PASSOS, 1998; RAMOS, 2004; VALENÇA, 2000).

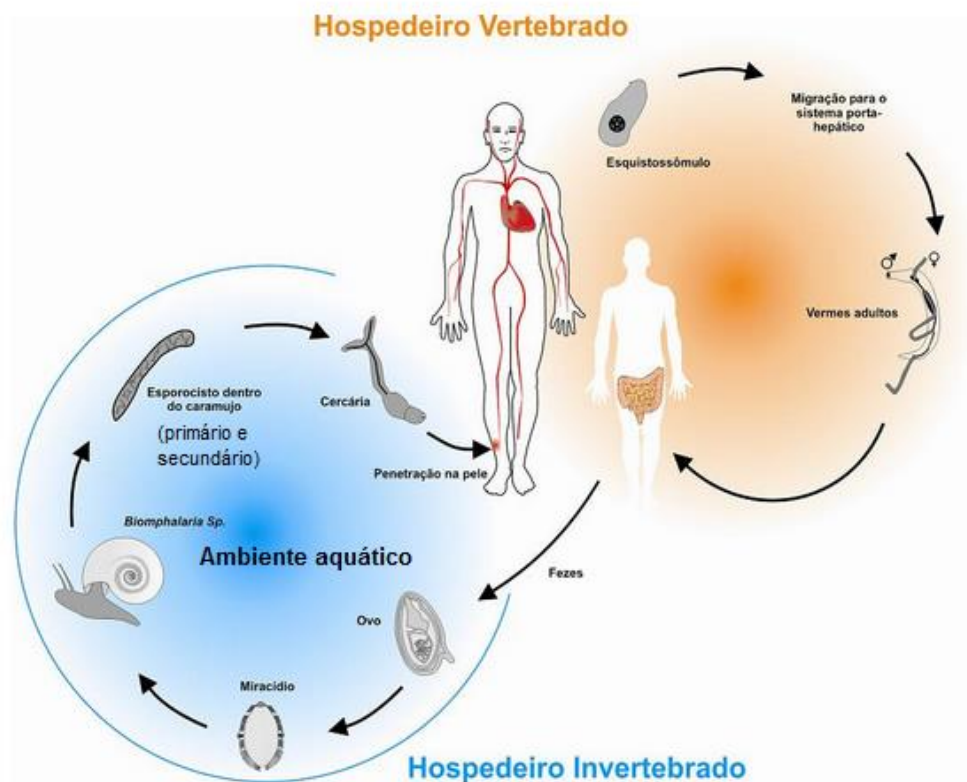
No século XVII, surge movimento migratório orientado para o interior dos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Alagoas, Sergipe e Bahia, destinado a implementar a criação de gado, com a finalidade de abastecer o mercado aberto com a colonização do litoral nordestino, decorrente da exploração de cana-de-açúcar. É possível que o traslado de mão-de-obra escrava, fixada inicialmente na orla litorânea, para o interior, tenha iniciado o deslocamento da área endêmica de esquistossomose para regiões onde, até hoje, são elevados os índices de infecção autóctone, como alguns municípios dos Estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Alagoas (CHIEF & WALDMAN, 1998; PASSOS, 1998).

No século XVIII, criaram-se condições para que a esquistossomose viesse a atingir áreas no interior de Minas Gerais e Bahia, como decorrência de deslocamentos populacionais para essas regiões, atraídos pela descoberta de jazidas auríferas e de outros minerais preciosos. No Estado de São Paulo a introdução da cultura cafeeira na região do Vale do Paraíba determinou, em meados do século XIX, a introdução da parasitose no Estado (CHIEF & WALDMAN, 1998).

Uma vez introduzido em nosso território, o *S. mansoni* encontrou condições ambientais que favoreceram a evolução do seu ciclo biológico. O ciclo alterna duas fases de vida parasitária, uma que ocorre no hospedeiro intermediário e outra que ocorre no hospedeiro definitivo (Figura 3) (KATZ & ALMEIDA, 2003).

O ciclo tem início quando as fezes contendo ovos do parasito entram em contato com a água doce, ocorrendo o rompimento dos ovos e liberação do miracídio, que é a forma larvária infectante que penetra no molusco (gênero *Biomphalaria*) hospedeiro intermediário. Ao penetrar nos moluscos, os miracídios perdem os cílios, efetuam poliembrionia e transformam-se nos esporocistos primários, estes por sua vez em alguns dias vão originar os esporocistos secundários. Quando maduros os esporocistos secundários darão origem as

cercárias, que são as larvas infectantes para o hospedeiro vertebrado. As cercárias, sob o estímulo da luz e do calor (horários mais quentes e luminosos do dia, principalmente de 11 às 17 horas) abandonam ativamente o caramujo permanecendo no meio aquático até encontrarem um hospedeiro definitivo, em cujo tegumento penetram ativamente. Nesse processo, apenas o corpo da cercária penetra ocorrendo a perda da cauda bifurcada, formando assim o esquistossômulo. Este por sua vez, penetra nos vasos sanguíneos, é levado pela circulação para o coração e pulmões e depois para o sistema porta-hepático, onde se diferenciam sexualmente, tornando-se vermes adultos machos e fêmeas. Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas, onde geralmente ocorre o acasalamento e as fêmeas fecundadas dão início à postura de ovos (aproximadamente 300 ovos/dia). Parte dos ovos atravessa a parede intestinal, alcança a luz e é eliminado ao meio externo com as fezes. Enquanto isso, outra parte dos ovos é retida nos tecidos, principalmente no fígado, formando ao redor desses uma reação granulomatosa, que é a principal causa da morbidade da doença (PASSOS, 1998; KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER et al., 2003; RAMOS, 2004; SOUZA et al., 2011).



**Figura 3:** Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Minas Gerais Genome Network, 2012. Acesso: <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br>

### 1.3 Manifestações clínicas da esquistossomose mansônica

A patogênese da esquistossomose mansônica é dependente da interação humano/helminto. Em relação ao *S. mansoni* são importantes a linhagem, a fase evolutiva, a intensidade e o número de infecções. Do lado do hospedeiro, participam a idade, padrão alimentar, etnia, órgão predominantemente lesado, frequências das reinfecções, infecções associadas e a imunidade (KATZ & ALMEIDA, 2003; PEARCE & MACDONALD, 2002). A esquistossomose mansônica se desenvolve em duas fases, uma aguda e uma crônica.

#### **Fase aguda**

Muitas pessoas infectadas podem, de acordo com a intensidade da infecção, permanecerem assintomáticas. Por sua vez, os sintomas clínicos tem

correlação com as fases do desenvolvimento do parasito no organismo humano (PORDEUS et al., 2008).

Depois da penetração das cercárias, podem surgir quadros de dermatite cercariana, importante reação inflamatória dérmica e subdérmica, que é capaz de destruir até metade do quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele, sendo esta a primeira “linha de defesa” contra a infecção. Esta reação inflamatória apresenta-se clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso, cuja intensidade depende do número e duração das exposições e o estado imunológico do hospedeiro (SOUZA et al., 2011). Após três a sete semanas da exposição, sintomas como febre alta, mal estar, astenia, anorexia, cefaleia, dor abdominal, tosse, náuseas, vômitos, e diarreia podem aparecer. Durante o exame físico pode-se detectar a hepatoesplenomegalia e o exame laboratorial aponta eosinofilia muito elevada. Como esses sintomas são comuns em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico, existindo assim dificuldade em se fechar o diagnóstico da forma aguda antes do aparecimento dos ovos nas fezes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; SILVA, 2008; SOUZA et al., 2011).

Em moradores de áreas endêmicas as manifestações clínicas da fase aguda não são evidenciadas. Essa fase pode durar em média de 30 a 60 dias, desaparecendo quando o paciente é diagnosticado e submetido a tratamento específico ou pode evoluir para a fase crônica caso não haja tratamento adequado (KATZ & ALMEIDA, 2003).

### **Fase crônica**

A doença começa a se cronificar a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos. Aparecem os sinais e sintomas de evolução da patologia no acometimento de vários órgãos, com níveis extremos de gravidade. As manifestações clínicas variam dependendo da localização do parasito e da intensidade da carga parasitaria, podendo apresentar a forma intestinal,

hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; PORDEUS et al., 2008).

Após a regressão dos sintomas, a maioria das pessoas permanece assintomática, quando então aparecem as manifestações clínicas que caracterizam a forma intestinal. Entre os sintomas estão a indisposição, emagrecimento, tonturas, anorexia, empachamento pós-prandial, surtos diarreicos podendo haver cólicas ou não, alternados por constipação intestinal (SILVA, 2008).

Na forma hepatointestinal, os sintomas são semelhantes ao da forma intestinal, embora bem mais acentuados, havendo um maior comprometimento hepático, estando o fígado aumentado ao exame clínico. Com o aumento da intensidade da infecção, começam a ocorrer processos inflamatórios no fígado, como reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni* (SILVA, 2008).

A patologia mais frequente da infecção esquistossomótica advém da deposição de ovos nos tecidos do hospedeiro. Estima-se que aproximadamente 50% dos ovos eliminados pelas fêmeas cheguem à luz intestinal e o restante dos ovos que não se aderem ao epitélio intestinal são carreados da veia porta para o fígado ocasionando o principal e mais importante efeito patológico da infecção, o granuloma (apenas os ovos maduros provocam a formação de granulomas esquistossomóticos) (ANDRADE, 1998; FARIA, 1999; RAMOS, 2004).

A reação inflamatória granulomatosa ocorre em decorrência da eliminação de antígenos do miracídio, chamados genericamente de SEA (*Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo), que atravessam a casca do ovo e estimulam células específicas e citocinas, favorecendo assim, a formação de um infiltrado de células inflamatórias ao redor dos ovos. Contudo, as alterações hepáticas parecem não decorrer apenas do processo granulomatoso e da fibrose formada posteriormente, mas também da liberação de substâncias hepatotóxicas produzidas pelos ovos do parasito (RAMOS, 2004). Durante o processo granulomatoso as células inflamatórias vão sendo substituídas por células semelhantes a fibroblastos que se orientam em camadas concêntricas e ativam a produção de colágenos. Devido ao aumento da deposição de proteínas da matriz

extracelular, a estrutura do granuloma se completa com a fibrose, que se inicia na periferia desse (DAVIS & KRESINA, 1996). Com o curso crônico da infecção, os diversos pontos de fibrose podem se coalescer levando à diminuição da luz dos vasos sanguíneos e à perda da elasticidade, ocorrendo assim um aumento da pressão portal e conseqüentemente as alterações patológicas da esquistossomose na sua fase crônica. A hipertensão portal é uma das causas que proporciona o surgimento da esplenomegalia (havendo agora a forma hepatoesplênica), além de levar a formação de varizes esofagianas, ascite e caquexia, que comprometem e agravam o quadro clínico do indivíduo infectado. Eventualmente, estas varizes esofagianas (ou gástricas) se rompem provocando fortes hemorragias, responsáveis por um número considerável de óbitos (TANABE, 2003).

A forma neurológica também faz parte da fase crônica da doença, sendo denominada de neuroesquistossomose. A neuroesquistossomose ocorre pela presença do elemento parasitário – ovos ou vermes adultos – fora do habitat natural do helminto, ou seja, no sistema nervoso central (SNC) (SOUZA et al., 2011). A deposição assintomática de ovos do *S. mansoni*, tanto no encéfalo como na medula espinhal, revelou-se mais comum do que a forma sintomática da doença, conhecida por mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE). Ao contrário, a MRE ocorre com maior frequência nas formas aguda e intestinal crônica, sendo a forma ectópica mais grave e incapacitante da infecção pelo *S. mansoni*. A patogenia da MRE permanece desconhecida, porém, admite-se que a resposta inflamatória do hospedeiro aos ovos presentes no tecido nervoso constitua o principal determinante das lesões do SNC. A resposta inflamatória pode variar de reação intensa do hospedeiro resultando em granulomas ou massas expansivas, até reação mínima sem expressão clínica. Vermes adultos, às vezes, são vistos nos vasos subaracnóides da medula espinhal; as lesões medulares granulomatosas se dão, entretanto, em torno dos ovos depositados. A deposição de ovos do *S. mansoni* no cérebro e meninges mostra-se mais frequente nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (SILVA et al., 2004).



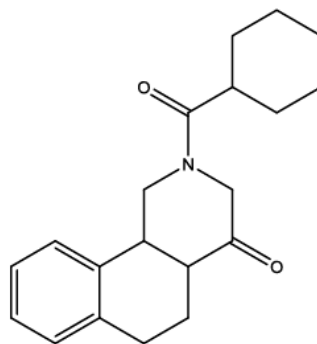
#### 1.4 A Quimioterapia esquistossomicida

Um dos maiores problemas de saúde pública em países onde a doença é endêmica é controlar a esquistossomose. Diferentes medidas de intervenção podem ser usadas e as seguintes ações, isoladas ou combinadas, podem ser adotadas: (1) controle do hospedeiro intermediário através de moluscidas ou métodos biológicos, (2) saneamento básico e abastecimento de água potável; (3) educação sanitária e ambiental para população exposta e (4) quimioterapia, através do tratamento individual ou em massa de pessoas em áreas de alta prevalência (COURA & AMARAL, 2004; GALVÃO, 2010).

De todos os métodos de controle listados acima, a quimioterapia é atualmente, a única forma amplamente utilizada em áreas endêmicas para o controle da esquistossomose, pois tem duplo benefício, uma vez que, reduz a morbidade causada pela presença dos vermes adultos no hospedeiro humano e diminui o número de ovos eliminados no meio ambiente (GALVÃO, 2010).

Desde a introdução do tártaro emético (primeiro agente terapêutico da esquistossomose) há mais de 90 anos, vários têm sido os medicamentos utilizados na quimioterapia esquistossomicida: miracil A, lucantone, niridazol, hicantone, metrifonato, oxamniquina e o praziquantel, que é o medicamento hoje disponível e em uso clínico (CUNHA, 1992; KATZ, 2008a).

O Praziquantel (PZQ) descoberto na década de 1970 é um derivado da isoquinolino-pirazino e está disponível para uso humano e veterinário (Figura 4). Curiosamente, no Brasil este medicamento foi introduzido para tratamento de cestódeos, por isso o nome comercial de Cestox<sup>®</sup> e Cisticide<sup>®</sup>, ao contrário do que ocorreu na África e Ásia onde foi colocado para tratamento das esquistossomoses (CUNHA, 1992; KATZ, 2008a).



**Figura 4:** Estrutura química do Praziquantel.

Foi o primeiro fármaco que apresentou atividade acentuada contra todas as espécies de *Schistosoma* patogênicas aos seres humanos (*S. mansoni*, *S. mekongi*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. haematobium*) (CIOLI et al., 2004; GEERTS & GRYSEELS, 2000; WHO, 1998). Uma única dose oral de 40mg/kg é geralmente suficiente para curar entre 70-90% dos indivíduos e diminuir de 90-95% o número médio de ovos eliminados (DOENHOFF et al., 2002; WHO, 1998). Essa dosagem pode ser diferenciada para pacientes hospitalizados, principalmente indivíduos infectados com *S. japonicum* e *S. mekongi*, onde se recomenda a dose de 30mg/kg, três vezes ao dia por dois dias consecutivos (GEERTS & GRYSEELS, 2000). A absorção do PZQ é de 75-100%, sendo rapidamente absorvido pelo organismo quando administrado oralmente (cerca de 15 minutos, com picos entre 1 a 2 horas), desaparecendo rapidamente da circulação sanguínea (1 a 3 horas após ingestão), sua eliminação ocorre essencialmente através da urina (80%), sendo o restante encontrado nas fezes e na bile, ocorrendo em cerca de 24 horas. A concentração plasmática do fármaco é influenciada pela dose, pela quantidade e qualidade da refeição e pela sua formulação (CIOLI & PICCA-MATTOCCIA, 2003; KATZ, 2008a). Os efeitos colaterais mais comuns, em consequência da administração do fármaco, estão relacionados ao trato gastrointestinal: dores e desconfortos abdominais, náuseas, vômitos, anorexia e diarreia. Esses efeitos aparecem em 30-60% dos pacientes, mas usualmente são leves e passageiros, desaparecendo dentro de 24 horas

(CIOLI et al., 1995). A frequência e a gravidade desses efeitos estão diretamente relacionadas com a intensidade de infecção (CIOLI & PICA-MATTOCCIA, 2003).

O mecanismo de ação sobre o parasito ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que o primeiro efeito sobre o esquistossoma após o tratamento é a rápida contração muscular e subsequente paralisia do verme, provavelmente pelo rápido influxo de  $Ca^{2+}$  (COLES, 1979; MEHLHORN et al., 1981). Outros efeitos também observados são: alterações morfológicas no tegumento, representado por vacuolizações e aumento na exposição de antígenos na superfície do parasito, que parece estar ligado à resposta imune do hospedeiro (CIOLI et al., 1995; DOENHOFF et al., 2008).

Esse fármaco é atualmente o único recomendado para o tratamento clínico da esquistossomose e uso em programas de controle nas áreas endêmicas pelas seguintes razões: ausência ou frequência baixa de efeitos colaterais graves; alta taxa de cura parasitológica para as três principais espécies de *Schistosoma*; eficácia em dose única, administrada oralmente; estabilidade química e baixo custo (KATZ, 2008b). Porém, apesar dessas vantagens o uso do PZQ têm sido menos promissor do que o esperado, existindo relatos de resistência ao fármaco (CIOLI & PICCA-MATTOCCIA, 2003; DOENHOFF et al., 2002). Além de não atuar nas formas jovens, sendo este provavelmente um dos motivos de muitos tratamentos fracassarem em áreas de alta endemicidade, porque a eficiência da terapia com este fármaco depende não só da intensidade da infecção, mas também do tempo da infecção (PICCA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004).

### **1.5 O aparecimento da resistência aos fármacos esquistossomicidas**

Vários estudos clínicos e experimentais revelaram uma grande variação na resposta terapêutica de linhagens distintas de *S. mansoni*, tanto de áreas geográficas diferentes como dentro de uma mesma área. Essa variação de susceptibilidade encontrada na resposta aos fármacos indica que o *S. mansoni* possui uma larga capacidade para desenvolvimento de resistência às dosagens terapêuticas habitualmente administradas ao homem (ARENA, 1997).

O desenvolvimento de *Schistosoma* sp. resistente ao tratamento foi demonstrado experimentalmente, mostrando-se que doses sub-curativas de PZQ sobre várias gerações produziam parasitos menos sensíveis ao fármaco (FALLON & DOENHOFF, 1994).

Coles et al. (1987), consideraram que o desenvolvimento da resistência em uma população de vermes depende de fatores como: porcentagem e frequência com que as pessoas são tratadas, dosagem do medicamento utilizado e sua eficácia e o movimento da população humana.

Vários estudos foram realizados para detectar variações na suscetibilidade a fármacos apresentados por isolados de *S. mansoni* de regiões distintas, mostrando que eles diferiam em sensibilidade aos esquistossomicidas (BONESSO-SABADINI, 1995). Coles et al. (1987), afirmaram que o parasito poderia se tornar resistente a um fármaco por meio de tratamentos repetidos. Provavelmente, os programas de tratamento em massa são um dos principais fatores que favorecem o aparecimento de linhagens com suscetibilidade alterada aos esquistossomicidas.

No Brasil, os primeiros casos de resistência a esquistossomicidas (OXQ e tricantona) em linhagens de *S. mansoni* foram relatados por Katz et al. (1973) e Dias et al. (1978).

Fallon & Doenhoff (1994), induziram resistência ao PZQ e OXQ a partir de tratamentos com um dos fármacos em seis gerações consecutivas de um “pool” de linhagens suscetíveis a estes medicamentos. Esses autores concluíram que a resistência obtida era fármaco-específica, pois o “pool” selecionado para o PZQ foi resistente e suscetível a OXQ, não constatando resistência cruzada entre os dois fármacos. Essa foi a primeira demonstração experimental de resistência ao fármaco de escolha, PZQ, para tratamento da esquistossomose.

No norte do Senegal, o PZQ foi utilizado para tentar controlar um foco de esquistossomose mansoni. Para tanto, as pessoas foram tratadas com dose única oral de 40 mg/kg do PZQ. Porém, as taxas de cura obtidas foram de apenas 18-36%, que foram alarmantemente baixas em comparação com a taxa de cura normalmente esperada de 60-90% (STELMA et al., 1995; DOENHOFF et al.,

2008). A resistência ao praziquantel também foi reportada no Egito, por Ismail et al. (1996) quando tratou 1607 pacientes infectados com *S. mansoni* na região delta do Nilo com PZQ 40 mg/kg.

Outro estudo realizado por Stelma et al (1997) mostrou que o *S. mansoni* no Senegal não está respondendo adequadamente ao tratamento com o PZQ, uma vez que pessoas tratadas com a oxamniquina na dose única oral de 20 mg/kg apresentaram taxa de cura de 79%, enquanto um grupo controle de pessoas tratadas com o PZQ na dose única de 40 mg/kg, apresentaram taxa de cura de apenas 36%.

De fato, desde a descoberta do PZQ nos anos 1970, pouco avanço terapêutico foi alcançado para tratar essa parasitose e o uso extensivo e inapropriado de altas dosagens do fármaco em regiões endêmicas culminou com o desenvolvimento de resistência. Outro fator que representa uma séria ameaça ao controle da doença é a dependência do tratamento da esquistossomose em um único fármaco (KÖHLER, 2001). Nesse contexto, as plantas medicinais vêm sendo alvo de muitos estudos, na tentativa de se estabelecer uma estratégia futura no controle da esquistossomose.

### **1.6 Plantas medicinais: um novo caminho no combate a esquistossomose mansônica**

Planta medicinal é uma espécie vegetal, preferencialmente cultivada, utilizada com propósitos terapêuticos. Chama-se planta fresca aquela coletada no momento de uso e planta seca a que foi precedida de secagem, equivalendo a “droga vegetal” (VEIGA-Jr. et al., 2005).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade e o seu conhecimento representa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (LOPEZ, 2006; MACIEL et al., 2002; VEIGA-Jr. et al., 2005). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (LOPEZ,

2006). No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (SILVA, 2002).

Existe uma grande quantidade de plantas em todo planeta, mas a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

As plantas medicinais são importantes fontes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de medicamentos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Atualmente estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis de origem sintética foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO et al., 2001). Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são originários de plantas e um número significativo são medicamentos sintéticos obtidos de precursores naturais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O segmento de fitoterápicos (“medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário”- OMS, 1998), movimenta anualmente, no mundo, cerca de 22 bilhões de dólares, com um crescimento de 12% ao ano (LOPEZ, 2006).

No Brasil, esse segmento responde por cerca de 7% do mercado farmacêutico brasileiro. Estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; LOPEZ, 2006). O Brasil é detentor da maior biodiversidade do mundo (20-22% do total existente no planeta), compreendendo mais de 50.000 espécies vegetais superiores catalogadas, (CALIXTO & SIQUEIRA-JÚNIOR, 2008; LOPEZ, 2006).

Além da grande biodiversidade, o Brasil possui uma rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais como remédios caseiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Nesse sentido, em 9 de dezembro de 2008, a Portaria Interministerial nº 2960, aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Em seguida, o Ministério da Saúde divulgou, em fevereiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que contem 71 plantas, com o objetivo de orientar estudos e pesquisas na elaboração de fitoterápicos. Incluso na RENISUS, estão algumas espécies de *Phyllanthus*, entre elas a *P. amarus*, pois considera que essas espécies de vegetais tenham potencial em avançar nas etapas de cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

De fato, as plantas têm sido tradicionalmente usadas nos tratamentos de diferentes tipos de doenças, e vem se destacando como uma potencial ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas.

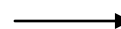
Assim sendo, no início da década de 1980, a artemisinina obtida das folhas da planta *Artemisia annua* e seus derivados, principalmente o arteméter e o artesunato, foram utilizados como agente esquistossomicida pelos chineses, inicialmente com o *S. japonicum* (XIAO et al., 1995; XIAO et al., 2002). Posteriormente, foi demonstrado que esses compostos também são efetivos contra o *S. mansoni* (XIAO & CATTO, 1989; XIAO et al., 2002), *S. haematobium* (XIAO et al., 2000; XIAO et al., 2002) e *S. mekongi* (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2005; 2006). Diferentemente do praziquantel, a atividade dos derivados de artemisinina é maior nas formas jovens do que nos vermes adultos (XIAO et al., 2002). Por apresentar atividade acentuada contra vermes imaturos, o arteméter

vem sendo utilizado em áreas endêmicas, como droga profilática na esquistossomose. Porém, o arteméter tem que ser utilizado com cautela, uma vez que ele é um importante antimalárico e em algumas regiões do mundo há superposição de áreas endêmicas de malária e esquistossomose onde infecções concomitantes podem ocorrer, e o uso inapropriado poderá ocasionar o aparecimento de resistência aos agentes etiológicos da malária (FENWICK et al., 2003; UTZINGER et al., 2001, 2003; KEISER et al., 2009).

Após o início dos estudos com a planta *Artemisia annua*, outras pesquisas utilizando plantas medicinais também foram realizadas com o intuito de se obter um fitoterápico esquistossomicida, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1:** Plantas medicinais que já foram investigadas quanto à atividade esquistossomicida mansônica.

| Nome científico                                  | Parte usada da planta                          | Extrato/ Composto                                      | Linhagem/Ensaio  | Referências   |
|--|--|--|--|---|
| <i>Commiphora molmol</i>                         | Caule  | Myrra  | –  | SHEIR et al., 2001; EI BAZ et al., 2003; BARAKAT et al., 2005 |
| <i>Nigella sativa</i>                            | Sementes                                       | Óleo; extratos aquoso, etanólico e clorofórmico        | Linhagem egípcia<br>Testes <i>in vitro</i> (extratos) e <i>in vivo</i> (óleo); | MAHMOUD et al., 2002; MOHAMED et al., 2005;                   |
| <i>Allium sativum</i><br>e<br><i>Allium cepa</i> | -  | Óleo   | Linhagem egípcia;<br>Teste <i>in vivo</i>                                      | METWALLY, 2006  |
| <i>Allium sativum</i>                            | Folhas escamiformes esmagadas "dentes de alho" | Extrato aquoso   | Linhagem egípcia;<br>Teste <i>in vivo</i>                                      | EI-SHENAWEY et al., 2008                                      |
| <i>Clerodendrum umbellatum</i>                   | Folhas   | Extrato aquoso   | Linhagem Camaroniana. Teste <i>in vivo</i>                                     | JATSA et al., 2009  |
| <i>Curcuma longa</i>                             | Rizoma   | Curcumina  | Linhagem egípcia;<br>Teste <i>in vivo</i>                                      | ALLAM, 2009   |
| <i>Curcuma longa</i>                             | Rizoma   | Curcumina  | Linhagem LE;   | MAGALHÃES et al., 2009  |
| <i>Zanthoxylum naranjillo</i>                    | Folhas   | Fração de acetato de etila obtida do extrato etanólico | Teste <i>in vitro</i>  | BRAGUINE et al., 2009   |





|   |                 |   |  |   |
|---|-----------------|---|--|---|
| <b><i>Dryopteris</i> sp.</b>  | Rizoma          | Floroglucinol                                   | Linhagem LE                            | MAGALHÃES et al., 2010                            |
| <b><i>Pulicaria crispa</i></b>  | Folhas          | Extrato metanólico                              | Linhagem Egípcia; Teste <i>in vivo</i> | MAGHRABY et al., 2010                             |
| <b><i>Piper tuberculatum</i></b>  | Inflorescências | Piplartina                                      | Linhagem BH; Teste <i>in vitro</i>     | MORAES et al., 2011(a)                            |
| <b><i>Baccharis dracunculifolia</i></b>   | Folhas          | Óleo essencial                                  | Linhagem LE; Teste <i>in vitro</i>     | PARREIRA et al., 2010                             |
| <b><i>Cratylia mollis</i></b>   | Semente         | Cramoll 1,4                                     | Linhagem BH; Teste <i>in vivo</i>      | MELO et al., 2011(a)                              |
| <b><i>Ageratum conizoides</i> L.</b>  | Folhas frescas  | Óleo essencial                                  | Linhagem LE; Teste <i>in vitro</i>     | MELO et al., 2011(b)                              |
| <b><i>Chenopodium ambrosoides</i>,<br/><i>Conyza dioscorides</i> e<br/><i>Sesbania sesban</i></b> | -               | Extrato metanólico                              | Linhagem egípcia; Teste <i>in vivo</i> | KAMEL et al., 2011                                |
| <b><i>Pilocarpus microphyllus</i></b>   | Folhas          | Epiisopiloturina                                | Linhagem BH; Teste <i>in vitro</i>     | VERAS et al., 2012                                |
| <b><i>Solanum lycocarpum</i></b>  | Frutas          | Extrato alcalóidico e compostos isolados        | Linhagem LE; Teste <i>in vitro</i>     | MIRANDA et al., 2012                              |
| <b><i>Baccharis trimera</i></b>   | Folhas          | Extrato diclorometânico; óleo essencial         | Linhagem BH; Teste <i>in vitro</i>     | ALLEGRETTI et al., 2012;<br>OLIVEIRA et al., 2012 |
| <b><i>Cordia verbenacea</i> DC</b>  | Folhas          | Fração Aquosa, Fração Orgânica e Óleo essencial | Linhagem BH; Teste <i>in vitro</i>     | ALLEGRETTI et al., 2012                           |

### 1.7 *Phyllanthus amarus*

O gênero *Phyllanthus*, descrito pela primeira vez por Linnaeus em 1737, pertence à família Euphorbiaceae (CALIXTO et al., 1998, KOMURAI AH et al., 2009; JOSEPH & RAJ, 2011). Existem mais de 300 gêneros com mais de 5000 espécies na família Euphorbiaceae em todo o mundo. O gênero *Phyllanthus* possui cerca de 750-800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (KOMURAI AH et al., 2009; JOSEPH & RAJ, 2011). Acredita-se que existem em média 200 espécies de plantas desse gênero

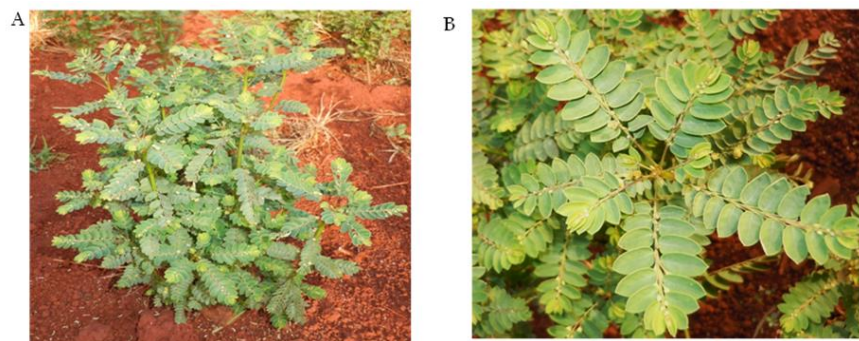
distribuídas pelas Américas, principalmente no Caribe e no Brasil (CALIXTO et al., 1998; TORRES et al., 2003). O nome *Phyllanthus* vem do grego, onde *phyllon* = folha e *anthos* = flor, em alusão às flores produzidas em ramos que se assemelham a folhas compostas (TORRES et al., 2003).

No Brasil, as plantas do gênero *Phyllanthus* são popularmente conhecidas como “quebra-pedra”, “arrebenta-pedra” ou “erva-pombinha”, sendo reconhecidas na medicina popular brasileira e de outros países, por suas propriedades diuréticas, antidiabéticas, antissépticas, hepatoprotetora entre outras (CALIXTO et al., 1998; TORRES et al., 2003).

O interesse nas plantas do gênero *Phyllanthus* tem aumentado consideravelmente, especialmente em relação ao seu potencial terapêutico para muitas doenças. Várias são as razões que contribuíram para isso, tais como: a grande distribuição em muitos países tropicais e subtropicais; o grande número de espécies deste gênero, amplo uso terapêutico na medicina popular e a grande diversidade de metabólitos secundários presentes em tais plantas (CALIXTO et al., 1998).

Uma grande variedade de espécies de plantas pertencentes a este gênero tem sido fitoquimicamente e farmacologicamente investigadas e muitas moléculas têm sido isoladas e identificadas. Nesse contexto, entre todas as espécies estudadas, a *Phyllanthus amarus* tem recebido uma atenção especial.

*P. amarus* é uma espécie amplamente distribuída, é um pequeno arbusto ereto cujo caule tem cápsula verde, cresce entre 10-50 cm de altura, e suas flores são formadas por 5 sépalas brancas, como mostra a Figura 5 (KIRAN et al., 2011). Essa espécie possui uma grande variedade de grupos de compostos como alcaloides, flavonoides, taninos, polifenóis e majoritariamente as lignanas. Entre esses grupos, muitos têm sido isolados, caracterizados e suas propriedades medicinais tem sido investigadas (KHAN et al., 2011; KIRAN et al., 2011; KOMURIAH et al., 2009).



**Figura 5:** A. *Phyllanthus amarus* cultivada no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, 2011. B. Imagem ampliada de *P. amarus*.

Embora muitos dos seus compostos sejam conhecidos quimicamente, suas propriedades farmacológicas permanecem, em geral, desconhecidas. Algumas ações farmacológicas da *P. amarus* já foram comprovadas através de estudos científicos, tais como: (1) tratamento da hepatite B, através da supressão da replicação do vírus (RAJESHKUMAR et al., 2002; RAPHAEL & KUTTAN, 2003); (2) efeito hepatoprotetor contra ações do paracetamol, tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), galactosamina e álcool (PRAMYOTHIN et al., 2007; KRITHIKA et al., 2009); a filantina e hipofilantina, que são lignanas, presentes na *P. amarus* são descritas como protetores dos hepatócitos contra o tetracloreto de carbono (KHATOON et al., 2006); (3) potente ação na inibição de carcinomas hepáticos (RAJESHKUMAR & KUTTAN, 2000); (4) efeitos antiespasmódicos do extrato na musculatura lisa tem sido reportado por contribuir no efeito do cálculo renal (KASSUYA et al., 2003). (5) atividade antibacteriana (KLOUCEK et al., 2005); (6) atividades anti-inflamatória e analgésica (KASSUYA et al., 2005; 2006); (7) Inibição de lesões gástricas (RAPHAEL & KUTTAN, 2003); (8) efeito inibitório da replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (NOTKA et al., 2004); (9) atividade hipoglicemiante (RAPHAEL et al., 2002); (10) atividade antiparasitária, contra *Plasmodium berghei* (DAPPER et al., 2007); (11) atividade antioxidante (KARUNA et al., 2009).

Devido às propriedades antiinflamatória e hepatoprotetora da *P. amarus*, já comprovadas cientificamente, essa planta foi selecionada para o estudo em questão, uma vez que a principal patologia da esquistossomose é a reação

inflamatória (granulomas), que atinge principalmente o fígado. Assim sendo, esse trabalho realizou um estudo *in vitro* e *in vivo* com o extrato etanólico bruto e frações de diferentes polaridades obtidas da *P. amarus*, com o intuito de verificar o efeito esquistossomicida dessa planta contra o *S. mansoni* linhagem BH.

## 2. Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Selecionar, através de testes *in vitro* e *in vivo*, substâncias com atividade esquistossomicida a partir do fracionamento do extrato etanólico de *P. amarus*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato etanólico das folhas secas de *P. amarus* e realizar o fracionamento biomonitorado desse extrato através de ensaios *in vitro* e químicos, utilizando a cromatografia em camada delgada e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar *in vitro* os seguintes parâmetros: mortalidade dos vermes (ausência total de movimentos), capacidade reprodutiva (oviposição e acasalamento) e possíveis alterações morfológicas no tegumento dos vermes adultos.
- Determinar a concentração letal (CL50) das amostras de *P. amarus* sobre os vermes adultos usando testes *in vitro*.
- Avaliar *in vivo*, os seguintes parâmetros: quantidade de vermes recuperados das veias mesentéricas e porta; viabilidade dos ovos retidos na parede intestinal (oograma); oviposição dos vermes; reações granulomatosas no fígado através de observações histológicas e possíveis alterações morfológicas no tegumento de vermes machos e fêmeas, através da microscopia eletrônica de varredura.

# **3. Material & Métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do material vegetal

As partes aéreas de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn, utilizadas na preparação do extrato etanólico foram coletadas no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP. Realizou-se um cultivo com o genótipo 14 que foi coletado em 29/03/05, nomeado de Planta 14/05.

As mudas foram preparadas no viveiro de plantas da casa de vegetação do CPQBA-UNICAMP como mostra a Figura 6.



**Figura 6:** Mudas de *P. amarus* cultivada em Casa de Vegetação do CPQBA – UNICAMP e imagem ampliada de uma muda de *P. amarus*.

A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Grady L. Webster (University of Califórnia Davis, USA). Sua exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC 127.411.

Logo após a coleta da planta, as folhas foram separadas e secas durante seis dias em estufa com circulador de ar, aquecidas a gás (40°C), seguido de moagem em moinho de facas (MR 030) e armazenadas em sacos plásticos escuros. O material vegetal foi preparado e fornecido pela Divisão de Agrotecnologia do CPQBA.

#### 3.2 Preparação do extrato etanólico bruto de *Phyllanthus amarus*

O Extrato Etanólico Bruto (EEB) foi preparado a partir de 1000 g das folhas secas e moídas com 5 L de etanol 96% (Merck) sob agitação mecânica por 6 h em



temperatura ambiente. Após filtração em sistema a vácuo, o processo de extração foi repetido com 3 L de etanol 96% e após uma nova filtração, o resíduo da planta foi lavado novamente com o mesmo solvente. Os extratos foram agrupados e o solvente removido à vácuo em evaporador rotativo, fornecendo o EEB de *P. amarus*, que foi submetido à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e depois à Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).

### **3.3 Fracionamento do EEB por coluna seca**

Para o fracionamento do EEB utilizou-se membrana de acetato de celulose com 40 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro como suporte da fase estacionária. A coluna foi empacotada com sílica gel 60 Merck (0,063 -0,200 mm). A fase móvel foi selecionada, após a análise do extrato por CCD, utilizando-se diferentes eluentes. Foi preparada uma mistura de sílica com o extrato seco, com trituração e homogeneização em almofariz com pistilo, chamada de “papa”, utilizando-se 2 g do EEB e a mesma massa de sílica. Em seguida, a “papa” foi adicionada à coluna, e a eluição foi realizada com o eluente hexano:acetato de etila 70:30 v/v. Foram coletadas frações, que foram agrupadas por similaridade através da análise por CCD, originando cinco frações, denominadas de Fr 1, Fr 2, Fr 3, Fr 4 e Fr 5. Depois de filtradas, e tendo evaporado todo o solvente que foi utilizado na lavagem da coluna, as frações foram analisadas por CCD e subsequentemente por CG/EM.

### **3.4 Fracionamento líquido-líquido do EEB**

Para o fracionamento líquido-líquido, o EEB foi particionado sucessivamente com diferentes solventes, hexano e butanol, em ordem crescente de polaridade.

#### **Fração Hexânica**

A partição foi feita em funil de separação utilizando 10 g do EEB, 200 mL de solução hidroalcoólica (50% v/v) e 200 mL de hexano. A fração hexânica foi

coletada em balão de fundo redondo, após agitação do funil e decantação das amostras. A fração hidroalcoólica passou por mais dois processos de extração, utilizando 100 mL de hexano em cada uma. As frações hexânicas foram agrupadas no mesmo balão e evaporadas a vácuo em rotaevaporador até a total eliminação do solvente, fornecendo a fração hexânica (FHEX).

### **Fração Butanólica**

A fração butanólica (FBuOH) foi obtida a partir da fração hidroalcoólica após a extração com o hexano, sendo submetida à evaporação em rotaevaporador para a eliminação do etanol ficando apenas uma solução aquosa. A solução aquosa foi colocada em um funil de separação juntamente com 200 mL de butanol. A fração foi transferida para um balão de fundo redondo e a fração aquosa extraída pela 2ª vez com 100 mL de butanol. Após a separação das fases, as frações butanólicas foram agrupadas e evaporadas a vácuo em rotaevaporador até a total eliminação do solvente, fornecendo a FBuOH.

### **Fração Aquosa**

Após a separação da fração butanólica, a fração aquosa (FH<sub>2</sub>O) foi transferida para um balão de fundo redondo e evaporada à vácuo em rotaevaporador até a total eliminação do solvente, fornecendo a FH<sub>2</sub>O.

## **3.5 Fracionamentos das frações butanólica e hexânica por coluna seca**

Para o fracionamento das FHEX e FBuOH utilizou-se membrana de acetato de celulose com 30 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro como suporte da fase estacionária. A coluna foi empacotada com sílica gel 60 Merck (0,063 -0,200mm).

Para o preparo da “papa” foi utilizado 1 g da FBuOH e a mesma massa de sílica. Em seguida, a “papa” foi adicionada à coluna, e a eluição foi realizada com o eluente clorofórmio:metanol 90:10 (v/v). Foram obtidas três frações denominadas fração 1 butanólica (F1BuOH), fração 2 butanólica (F2BuOH) e

fração 3 butanólica (F3BuOH), que depois foram filtradas e evaporado todo o solvente que foi utilizado na lavagem da coluna.

Para o preparo da “papa” da FHEX foi utilizado 1 g dessa fração e a mesma massa de sílica. Em seguida, a “papa” foi adicionada à coluna, e a eluição foi realizada com o eluente hexano:acetato 60:40 v/v. Foram obtidas três frações denominadas fração 1 hexânica (F1HEX), fração 2 hexânica (F2HEX) e fração 3 hexânica (F3HEX), que foram filtradas e o solvente evaporado em rotaevaporador.

### **3.6 Purificação de lignanas**

As lignanas nirantina, filantina e a composição filantina + filtetralina + nirtetralina foram isoladas e caracterizadas quimicamente na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, a partir das folhas de *P. amarus* e cedidas para realização dos experimentos.

### **3.7 Métodos cromatográficos para análise do extrato etanólico, frações e compostos isolados**

#### **3.7.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

O extrato e as frações foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que é uma técnica simples e de baixo custo para a separação rápida de amostras (COLLINS et al., 1995).

As CCD foram feitas utilizando-se cromatoplasas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> – Merck. Para a realização das cromatoplasas foram dissolvidos 20 mg do EEB em 1 mL de etanol e as demais amostras foram preparadas dissolvendo 10mg de cada fração em 1 mL de acetato de etila. Com as amostras prontas, estas foram colocadas na parte inferior da placa com o auxílio de um capilar, através de sucessivas aplicações da solução da amostra, previamente preparada conforme descrito acima. Estas placas foram colocadas em cubas de vidro fechadas, contendo o solvente que eluiu pela camada adsorvente por ação capilar. Todas as

amostras utilizaram o eluente hexano:acetato de etila 70:30 (v/v), com exceção da fração butanólica, que utilizou o clorofórmio:metanol 90:10 (v/v). À medida que o eluente sobe pela placa, a amostra é compartilhada entre a fase líquida móvel e a fase sólida estacionária. Durante esse processo ocorreu a separação dos diversos componentes, onde as substâncias menos polares avançaram mais rapidamente que as substâncias mais polares. Esta diferença na velocidade resultou na separação dos compostos presentes nas amostras (COLLINS et al., 1995).

As placas foram retiradas das cubas e a detecção dos compostos foi realizada primeiramente por irradiação sob lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm. Em seguida, as placas foram pulverizadas com solução de anisaldeído (ácido acético:ácido sulfúrico:anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) para revelação das placas e colocadas em estufa aquecida a 100<sup>o</sup> C por 5 min (WAGNER & BLADT, 1996).

### **3.7.2 Cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG/EM)**

As análises por CG/EM foram realizadas num cromatógrafo Hewlett-Packard 6890N, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975 e injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (25m x 0,2 mm x 0,33 µm). As condições de análise, como temperaturas do injetor, detector, e coluna foram otimizadas de acordo com as características das substâncias a serem avaliadas. Para análise das amostras foi utilizado hélio como gás de arraste a 1 mL/min. Para preparação das amostras, 10 mg do EEB e frações foram solubilizadas em 1 mL de acetato de etila, exceto a fração butanólica que foi solubilizada em metanol.

A quantificação das substâncias detectadas foi feita por normalização de área e para a identificação das lignanas filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina, presentes no EEB e frações, foram utilizadas amostras enriquecidas nessas substâncias, previamente obtidas pelo grupo de pesquisa do CPQBA/DQOF.

### **3.8 Manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni***

#### **3.8.1 Linhagem do *Schistosoma mansoni***

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH, oriunda de Belo Horizonte-MG. Esta linhagem é mantida em moluscos *Biomphalaria glabrata*, no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp.

#### **3.8.2 Hospedeiro intermediário e infecção**

Os moluscos planorbídeos *B. glabrata* foram mantidos em tanques (50L) e alimentados, diariamente, com folhas de alface frescas e ração para roedores triturada com adição de carbonato de cálcio 10%, até que atingissem o tamanho ideal para poderem ser infectados (6 a 10 mm de diâmetro).

Para a infecção dos caramujos as fezes foram obtidas pelo método de tamisação (fezes de camundongos infectados há sessenta dias foram coletadas e maceradas com água, em seguida, essas fezes foram colocadas em um cálice de sedimentação. Após a formação do sedimento, o sobrenadante passou pelo processo de tamisação por duas vezes). O conteúdo obtido da tamisação foi retido em uma placa de Petri e exposto a luz e temperatura de aproximadamente 28°C durante uma hora, para eclosão das larvas. Foram pipetados 10 miracídios e colocados em um frasco de vidro, juntamente com um único exemplar de *B. glabrata*, para que ocorresse a infecção. Após o período de exposição, os mesmos foram mantidos em aquários com água dechlorada e alimentados diariamente com alface fresca.

Decorridos 35 a 40 dias de infecção, cerca de cinco moluscos foram colocados em um recipiente com água filtrada e dechlorada, e submetidos ao calor e iluminação (utilizando-se lâmpada incandescente) por duas horas em média, para obtenção das cercárias. Para cada ciclo de infecção foram expostos 30 moluscos para que fornecesse uma quantidade razoável de indivíduos positivos a fim de se obter equilíbrio entre os sexos do parasito no camundongo (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

### 3.8.3 Hospedeiro definitivo e infecção

Para realização dos testes *in vitro*, foram utilizadas fêmeas de camundongos “Swiss”, e para os testes *in vivo*, fêmeas de camundongos Balb-C. Os animais foram infectados individualmente com 70 cercárias da linhagem BH, provenientes de moluscos *B. glabrata*, utilizando-se a técnica de imersão da cauda do animal em suspensão cercariana, durante duas horas com exposição de luz e temperatura de aproximadamente 28°C (OLIVER & STIREWALT, 1952). Para conter os camundongos durante esse período, foram utilizados dispositivos de contenção de camundongos. No final do processo de infecção, o conteúdo de cada tubo de ensaio referente a cada camundongo foi analisado para contar quantas cercárias não penetraram no animal.

Após o período de infecção, os animais foram mantidos em caixas plásticas, com tampa metálica, onde recebeu alimentação a base de ração e água “*ad libitum*”.

### 3.9 Testes *in vitro*

#### 3.9.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura Instituto Roswell Park Memorial (RPMI) 1640 (Nutricell) foi inicialmente diluído em 1L de água MiliQ, em seguida acrescentou-se 2 g de bicarbonato de sódio e depois o pH foi ajustado para 7,0-7,2. O meio de cultura foi filtrado em sistema de filtração estéril Millipore® e mantido em geladeira. Antes do uso foi acrescentado penicilina/estreptomicina 0,01% (Nutricell) (MOURÃO, 2001).

#### 3.9.2 Preparo das amostras

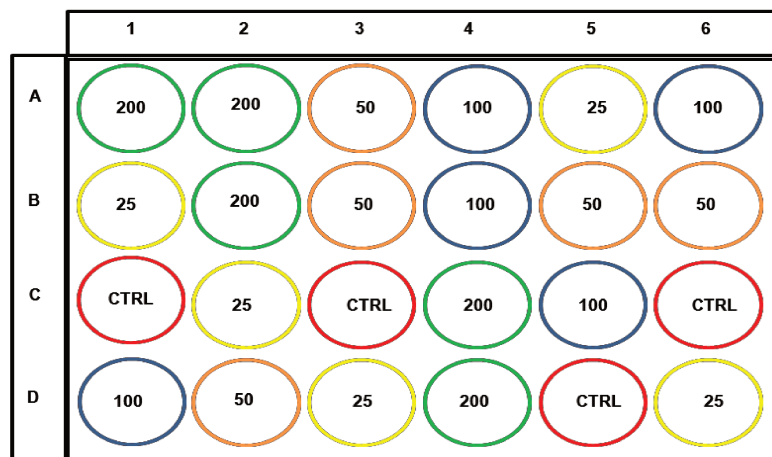
De cada amostra seca pesou-se 10 mg em um vidro e colocou-se 1 mL de tampão PBS (phosphate buffered saline) para solubilização. Após a solubilização, adicionava-se 40, 20, 10 ou 5 µL das amostras nos “poços” das placas dos testes “*in vitro*”, sendo assim testadas quatro concentrações: 200, 100, 50 e 25 µg/mL.

### **3.9.3 Obtenção dos vermes para realização dos testes *in vitro***

Após 60 dias de infecção, camundongos “*Swiss*” foram eutanaziados por deslocamento cervical e através da perfusão do sistema porta-hepático os vermes adultos de *S. mansoni* foram coletados e colocados em solução estéril de NaCl 0,9%. Após a coleta, os vermes foram lavados mais uma vez em solução salina e posteriormente, com o auxílio de um estereomicroscópio, vermes machos e fêmeas acasalados foram selecionados, e lavados em meio RPMI.

### **3.9.4 Avaliação do efeito do EEB, frações e substâncias isoladas na cultura de *S. mansoni***

Para realização dos testes *in vitro*, os vermes machos e fêmeas acasalados foram coletados como descrito no item 3.9.3, e em seguida transferidos para placas de cultura de 24 poços. Cada poço continha 2 mL de meio RPMI acrescido de penicilina/estreptomicina a 0,01%, 1 casal de vermes e as amostras. Foram testadas 18 amostras, entre elas: extrato etanólico bruto e frações 1, 2, 3 e 4, partição aquosa, partição hexânica e frações 1, 2 e 3, partição butanólica e frações 2 e 3, além das lignanas nirantina, filantina, hipofilantina e filantina + fildetralina + nirtetralina nas concentrações de 200 µg/mL (C<sub>1</sub>), 100 µg/mL (C<sub>2</sub>), 50 µg/mL (C<sub>3</sub>) e 25 µg/mL (C<sub>4</sub>), sendo preparadas 5 réplicas de cada concentração. No grupo controle negativo os vermes foram mantidos apenas em meio de cultura RPMI sem adição de extratos e no grupo controle farmacológico foi utilizado o PZQ na concentração 10 µg/mL. A forma de organização das placas de cultura pode ser visualizada na Figura 7.



**Figura 7:** Organização da placa de meio de cultura para realização dos testes *in vitro*.

Após o preparo das placas de cultura, estas foram continuamente monitoradas com o auxílio de um microscópio invertido em intervalos de tempo crescentes e regulares, sendo a primeira observação realizada no momento em que a placa fica pronta, seguida das observações após 6 h, 24 h, 48 h e 72 h de experimento. As placas de cultura foram mantidas em estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Foram avaliados os seguintes critérios: mortalidade dos vermes (ausência total de movimentos durante 2 minutos), capacidade reprodutiva (oviposição e acasalamento) e possíveis alterações morfológicas no tegumento (XIAO & CATTO, 1989; SANDERSON et al., 2002; MITSUI et al., 2009; KEISER, 2010).

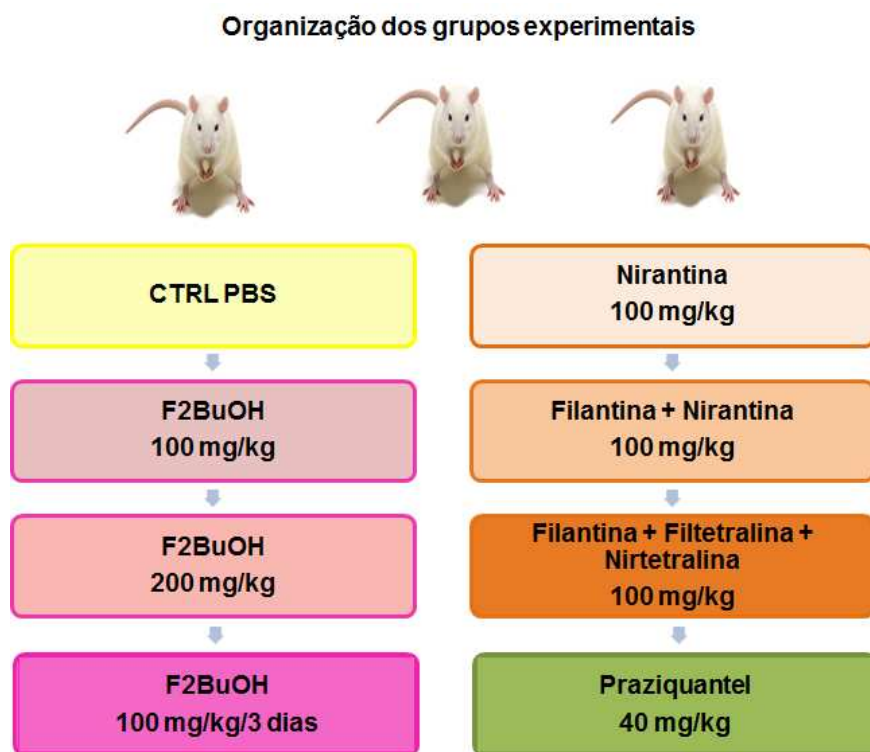
### 3.10 Testes *in vivo*

#### 3.10.1 Tratamento dos camundongos

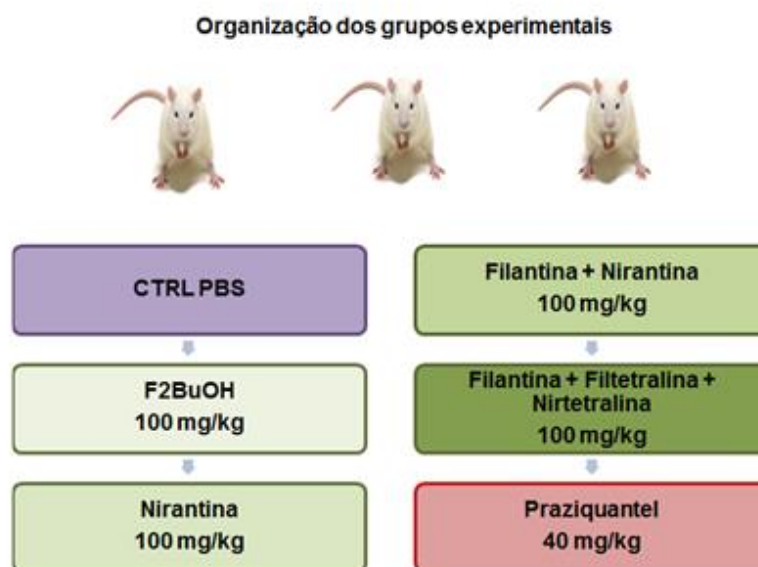
Após a infecção dos camundongos Balb-c realizada conforme descrito no item 3.8.3, os animais foram tratados em dois períodos distintos, 45 e 60 dias após a infecção. O intuito foi avaliar a eficácia dos tratamentos quando os vermes adultos estão no pico de sua oviposição (45 dias) e em um estágio mais avançado da doença (60 dias). Para o grupo tratado no 45º dia de infecção foram testadas a F2BuOH 100 e 200 mg/kg dose única, F2BuOH 100 mg/kg administrados em 3 dias consecutivos e as lignanas nirantina, filantina + nirantina (1:1; m/m) e a composição filantina + firtetralina + nirtetralina (4,9:48,3: 33,1) na concentração de



100 mg/kg em dose única (Figura 8). Para o tratamento no 60º dia de infecção foram testadas a F2BuOH, as lignanas nirantina, filantina + nirantina (1:1; m/m) e a composição filantina + filtetralina + nirtetralina (4,9:48,3: 33,1) na concentração de 100 mg/kg em dose única (Figura 9). Os grupos controle para os dois períodos de tratamento foram formados pelo grupo controle farmacológico com o PZQ 40 mg/kg (dose padrão) e controle negativo utilizando o tampão PBS. Cada tratamento foi realizado em 10 animais e a administração das substâncias foi feita por via oral através de tubagem esofágica, sendo administrados 0,3 mL de cada substância.



**Figura 8:** Tratamentos realizados no 45º dia de infecção.



**Figura 9:** Tratamentos realizados no 60º dia de infecção.

### 3.10.2 Análises realizadas após o tratamento

Após 15 dias do tratamento, período correspondente à eliminação dos parasitos, os camundongos foram eutanaziados por deslocamento cervical e os vermes coletados pela perfusão do sistema porta-hepático (YOLLES et al., 1947).

#### Exame de fezes

Realizado pelo método quantitativo de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), para quantificar os ovos eliminados nas fezes.

#### Coleta dos vermes e Análise dos órgãos

Após a eutanásia e perfusão do sistema porta-hepático dos animais, os vermes foram coletados das veias mesentéricas e da veia porta e colocados em placa de Petri com NaCl 0,9%. Em seguida, foram contados e identificados segundo o sexo.

Após a coleta dos vermes, foram retirados os órgãos como: fígado, baço, pulmão e intestino, sendo os três primeiros comprimidos entre duas placas de

vidro, e analisados na lupa para verificação da existência ou ausência de vermes nesses órgãos. O intestino foi retirado para realização do oograma.

### **Oograma**

Um fragmento de 0,5 cm do intestino grosso (cólon descendente) foi retirado para realização do oograma, que consiste na contagem dos ovos nos seus diferentes estágios de maturidade (1º a 4º estágios (ovos imaturos); 5º estágio (ovo maduro) e ovos mortos), para saber se o extrato interferiu na oviposição e na viabilidade dos mesmos (HERMETO et al., 1994). Para tanto, foram analisados 10 campos aleatórios no microscópio óptico com aumento de 100 vezes. A classificação dos estágios de desenvolvimento seguiu o critério proposto por Pellegrino et al., (1962).

### **Análise Histológica**

Para a realização dos cortes histológicos foram retiradas porções da região inferior do lóbulo direito do fígado, sendo fixadas em formol 10%. Foram escolhidos aleatoriamente três fígados de cada tratamento e período para fazer os cortes. A coloração foi feita pela Hematoxilina de Ehrlich e Eosina Y 0.5% e a espessura dos cortes foi de 5 µm. Posteriormente, foram contados 10 campos do corte histológico na objetiva de 10x com o auxílio do programa “Image Manager 50”, e medido o tamanho daqueles que tinha o ovo na região central.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os vermes recuperados na perfusão foram fixados por 24 h, em solução de glutaraldeído 2,5%, tamponado em pH 7,2 com solução de cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, o material foi lavado com solução tampão de cacodilato de sódio por 1 h, com trocas de 15 em 15 minutos e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 h ao abrigo da luz. Em seguida, foi feita uma lavagem em tampão de cacodilato de sódio por meia hora, e logo depois seguiu o processo de desidratação em uma série crescente de etanol (50, 70, 90 e 100%). Após a desidratação, o material foi levado para a câmara de ponto crítico, onde as

amostras foram secas. Em seguida, as mesmas foram montadas sobre 'stubs' e cobertas com uma fina camada de ouro no *sputter coat*, sendo depois, este material analisado em Ultramicroscópio Eletrônico de Varredura Jeol (JSM-820).

### 3.11 Ensaios de citotoxicidade

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular humana de queratinócitos (HaCaT), gentilmente cedida pelo curso de odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. A linhagem foi cultivada e mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 mL (Nunc<sup>®</sup>), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), da suspensão celular na densidade de 3-6x10<sup>4</sup>, em meio RPMI/ 5% SFB, acrescido de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1mL/L RPMI). Após 24 h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100 µL/compartimento das amostras testadas (EEB e as lignanas filantina e nirantina) em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Para o preparo das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foi dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. Nessa concentração final de DMSO não há interferência no crescimento celular.

No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T0, o que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e as placas incubadas por 1 h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada

para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente à temperatura ambiente ocorreu a coloração das células com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B 0,4% (SRB) (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente. Logo após, foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração das amostras, o crescimento celular expresso em porcentagem foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se  $T < T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

$T$  = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

$T_1$  = absorbância do branco de células.

$T_0$  = absorbância do controle de células na placa  $T_0$ .

A partir dos valores calculados com as fórmulas acima, gráficos da porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada foram gerados para cada uma das linhagens testadas e através da regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0 foi calculado o TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) (Shoemaker, 2006).

### 3.12 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados obtidos foi aplicado a Análise da Variância (ANOVA) e o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan, utilizado para comparar as medianas das respostas entre os grupos tratados com

as amostras de *P. amarus* e os grupos controles, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa SAS 9.1 (SAS Institute Inc, Carry, NC, EUA).

A eficácia dos tratamentos foi avaliada pelo percentual de redução no número total de vermes (RV) dos grupos tratados em relação aos grupos Controle infectados. A RV foi calculada através da quantidade média de vermes vivos encontrados durante a perfusão do sistema porta-hepático, como mostra a fórmula seguinte (DELGADO et al., 1992):

$$\text{Redução de vermes (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Onde: a = média do número de vermes do grupo controle;  
b = média do número de vermes do grupo tratado.

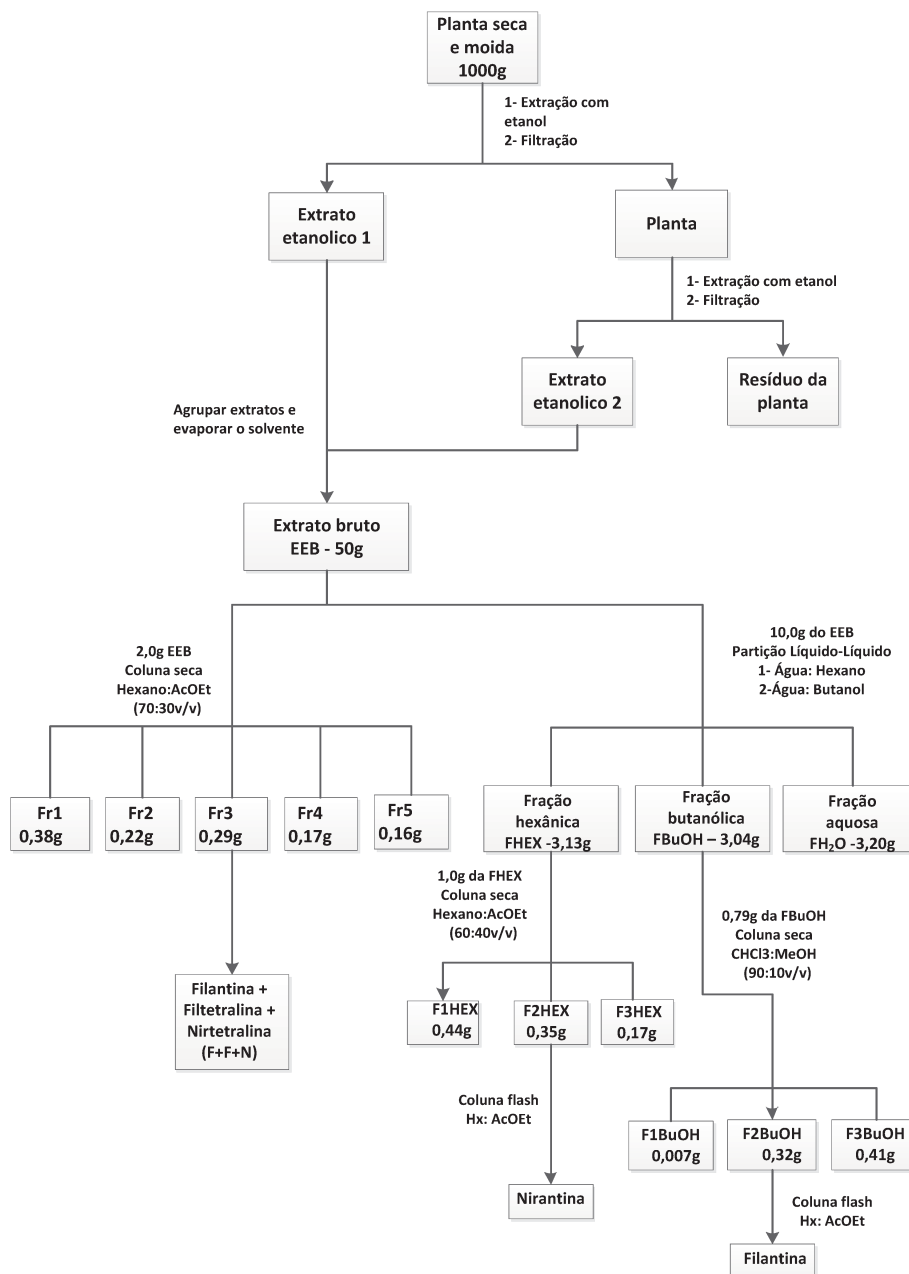
A fórmula acima também foi aplicada para o cálculo da redução do número de vermes fêmeas (RVF) e de ovos (RO).

# 4. Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudos fitoquímicos

Na figura 10 estão apresentadas as etapas realizadas para a obtenção do extrato etanólico e frações a partir das folhas da planta *P. amarus* e os rendimentos em massa.



**Figura 10:** Fluxograma da obtenção das amostras de *P. amarus* e seus rendimentos.



#### 4.1.1 Análise do EEB

##### Rendimento

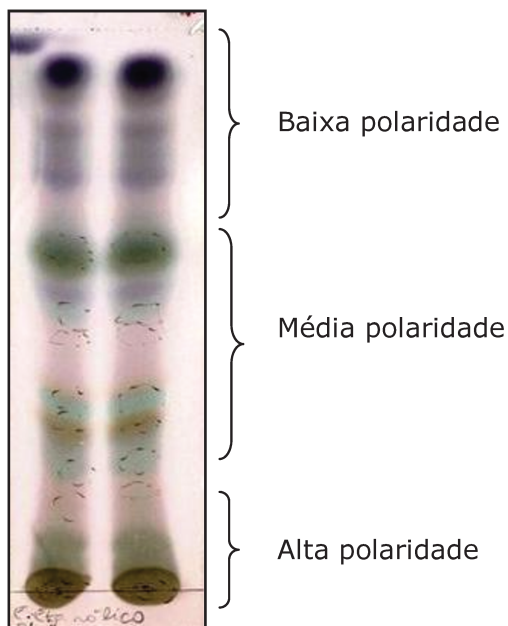
Foi obtida uma massa total de 50 g do EEB, apresentando um rendimento de 5%. Na Figura 11 está apresentado o processo de extração do EEB.



**Figura 11:** Extração e filtração a vácuo do extrato etanólico bruto.

##### Cromatografia em camada delgada (CCD) do EEB

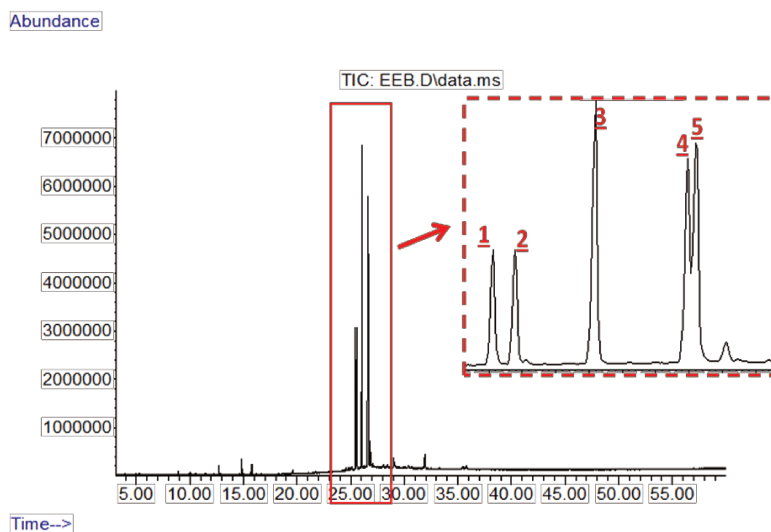
O EEB foi analisado inicialmente por CCD e a visualização das bandas foi feita sob luz UV (254 e 366nm), sendo revelado depois com solução de anisaldeído. O EEB apresentou classes de compostos químicos diferentes, que podem ser observadas na Figura 12.



**Figura 12:** Cromatografia em Camada Delgada do extrato etanólico bruto de *P. amarus*.

### **Cromatografia a gás por espectrometria de massas (CG/EM) do EEB**

A Figura 13 e a Tabela 2 apresentam os compostos possíveis de serem identificados através da CG/EM, revelando a presença de cinco lignanas: filantina, filtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina, destacando-se a nirantina (24,2%) e a nirtetralina (25,8%).



**Figura 13:** Análise do extrato etanólico bruto por CG/EM. 1 filantina; 2 filtetralina; 3 nirtetralina; 4 hipofilantina; 5 nirantina.

**Tabela 2:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM no extrato etanólico bruto de *P. amarus*.

| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância                         |
|-------------|-----|------------|------------------------------------|
| 12,7        | 284 | 0,8        | Hexadecanoato de Metila            |
| 14,8        | 296 | 1,9        | Fitol                              |
| 15,7        | 306 | 1,1        | 9,12,15-Octadecatrienoato de etila |
| 25,4        | 418 | 10,0       | Filantina                          |
| 25,5        | 416 | 10,3       | Filtetralina                       |
| 26,0        | 430 | 25,8       | Nirtetralina                       |
| 26,6        | 430 | 19,6       | Hipofilantina                      |
| 26,6        | 432 | 24,1       | Nirantina                          |
| 26,8        | 430 | 2,1        | NI                                 |
| 29,0        | 414 | 1,3        | Sitosterol                         |
| 31,9        | 480 | 2,5        | NI                                 |

} = 90%

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção

Nas Figuras 14 a 18 estão apresentados os espectros de massas das principais substâncias observadas no EEB de *P. amarus*, em ordem crescente de tempo de retenção, bem como suas estruturas químicas.

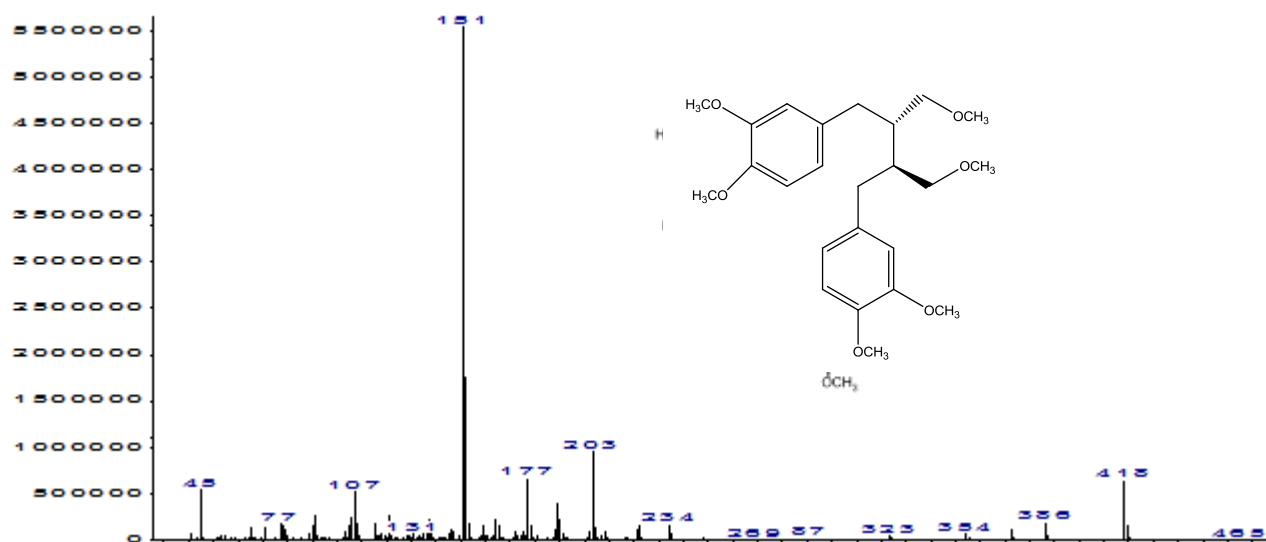


Figura 14: Espectro de massas da substância filantina 1 (MM = 418) de  $t_R$  25,45 minutos.

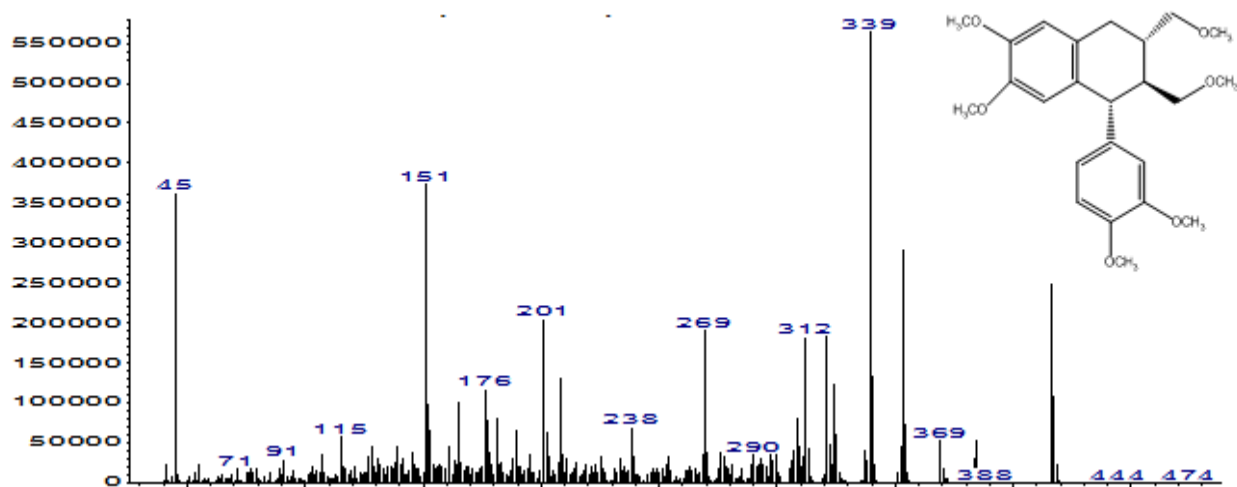


Figura 15: Espectro de massas da substância filtetralina 5. (MM = 416) de  $t_R$  25,56 minutos.

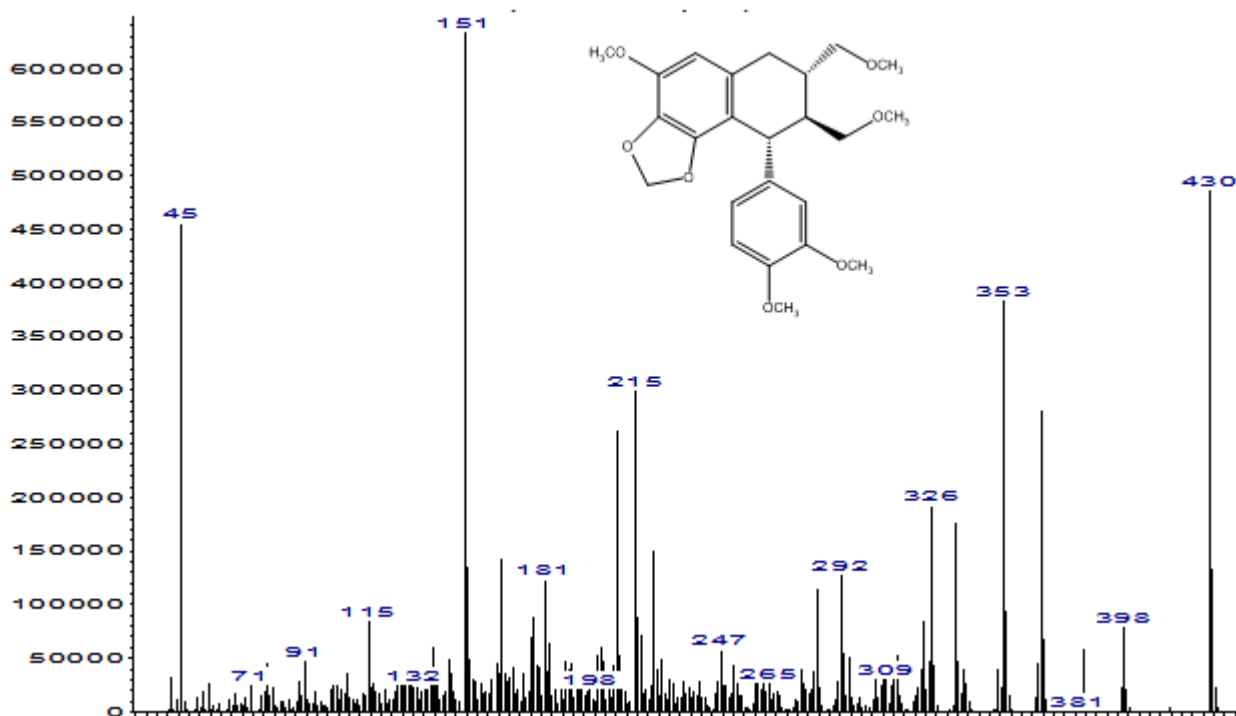


Figura 16: Espectro de massas da substância hipofilantina **3** (MM = 430) de  $t_R$  26.60 minutos –

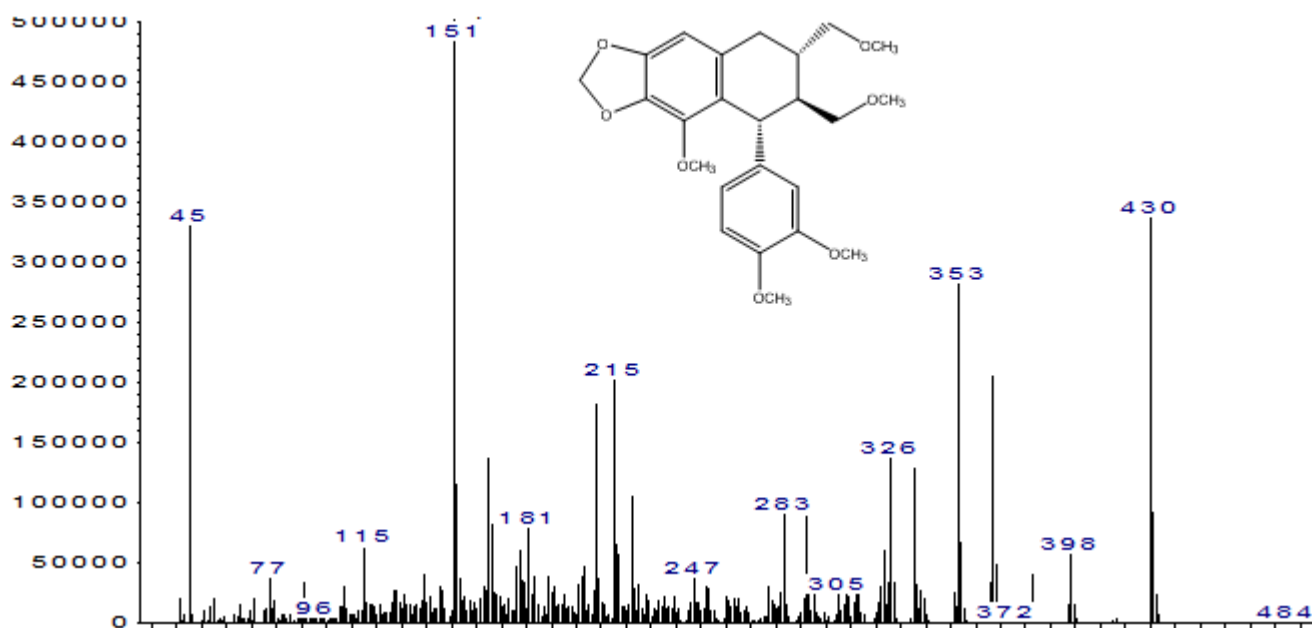
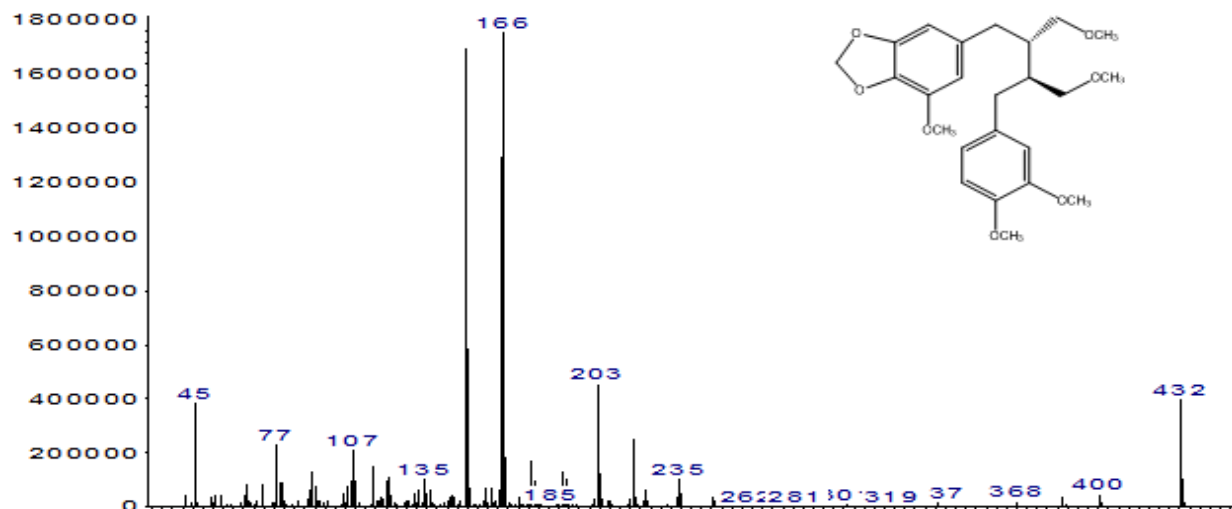


Figura 17: Espectro de massas da substância nirtetralina **4** (MM = 430) de  $t_R$  26.04 minutos.

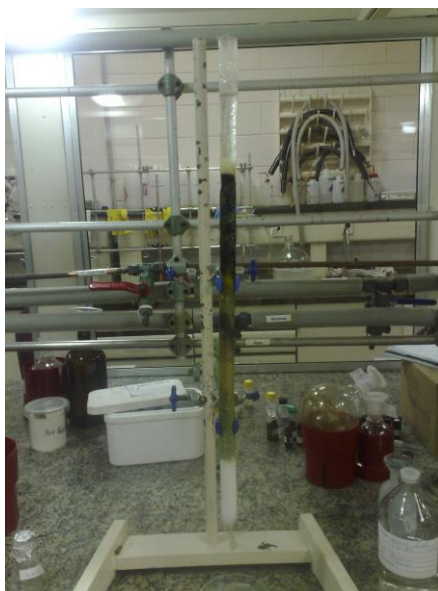


**Figura 18:** Espectro de massas da substância niranitina **2** (MM = 432) de  $t_R$  26.65 minutos.

#### 4.1.2 Análise do fracionamento do EEB por coluna seca

##### Rendimento

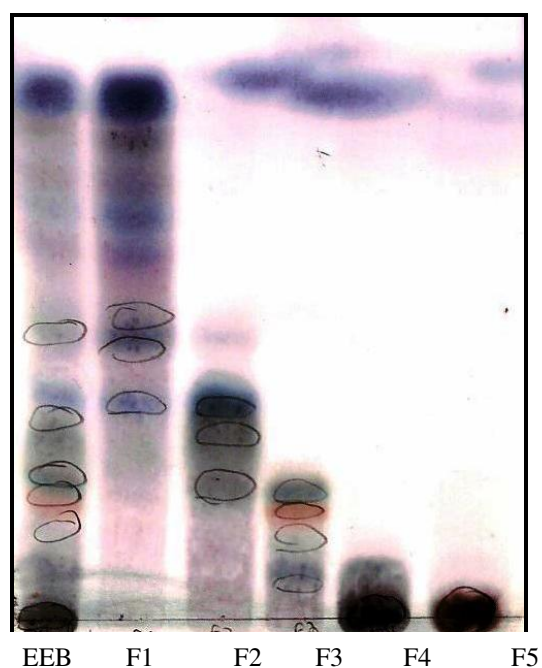
O fracionamento do EEB por coluna seca (Figura 19) originou cinco frações denominadas Fr 1, Fr 2, Fr 3, Fr 4 e Fr 5. A massa obtida com a soma de todas as frações foi de 1,2 g, apresentando rendimento de 58,3%.



**Figura 19:** Fracionamento do extrato etanólico bruto por coluna seca.

### **CCD das frações obtidas do EEB por coluna seca**

A Figura 20 mostra que as frações originadas do EEB através da coluna seca apresentam compostos de diferentes polaridades. A fração 1 apresenta compostos de alta, média e baixa polaridades. As frações 2 e 3 revelaram compostos de alta e média polaridades, e nas frações 4 e 5 foram observadas a presença de substâncias de alta polaridade.

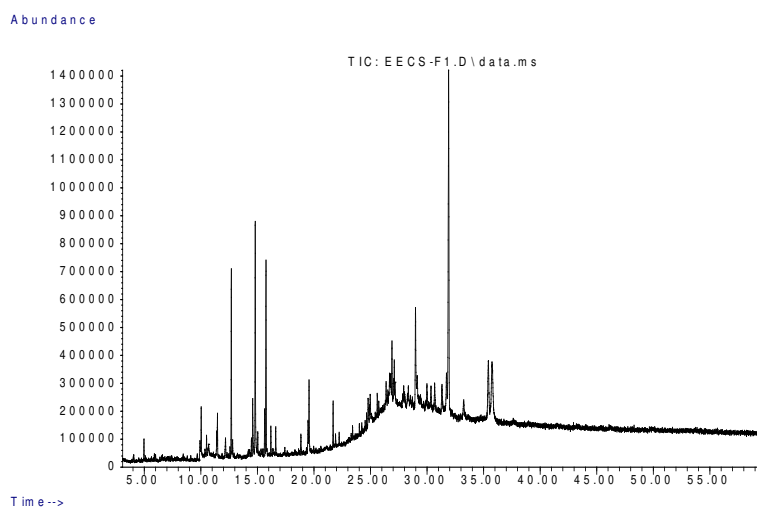


**Figura 20:** Análise por CCD do extrato etanólico bruto e frações 1, 2, 3, 4 e 5 de *P. amarus* obtidas por coluna seca.

### **CG/EM das frações obtidas do EEB por coluna seca**

Através da técnica CG/EM foi possível analisar as frações 1, 2 e 3, uma vez que essa é uma técnica para separação e análise de substâncias voláteis, ou seja, aquelas de baixa ou média polaridade. Sendo assim, as frações 4 e 5 não foram avaliadas através desse método por possuírem substâncias que não seriam possíveis de identificação com a CG/EM. As Figuras 21 a 23 e as Tabelas 3 e 4 mostram as substâncias que foram possíveis identificar através dessa técnica.

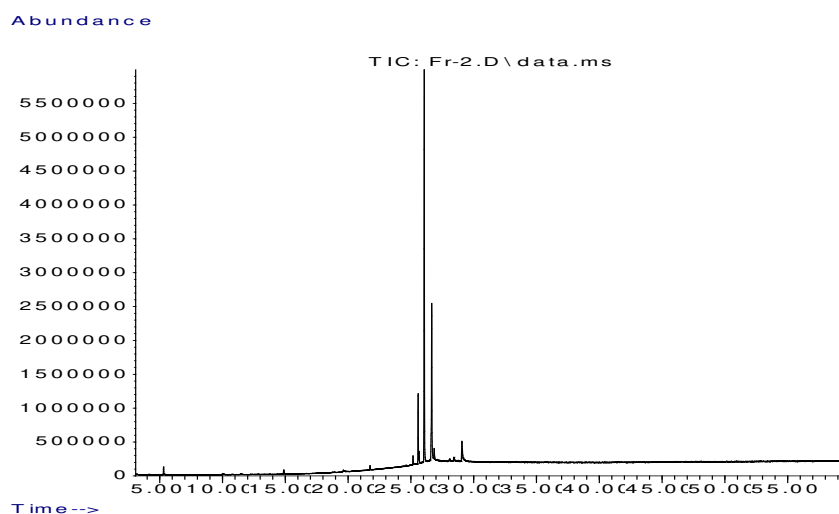
### Fração 1 (Fr 1)



**Figura 21:** Análise por CG/EM da fração 1 do extrato etanólico bruto de *P. amarus*.

Os principais compostos identificados por CG/EM na Fr 1 do EEB de *P. amarus* foram ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa (C16 a C22).

### Fração 2 (Fr 2)



**Figura 22:** Análise por CG/EM da fração 2 do extrato etanólico bruto de *P. amarus*.



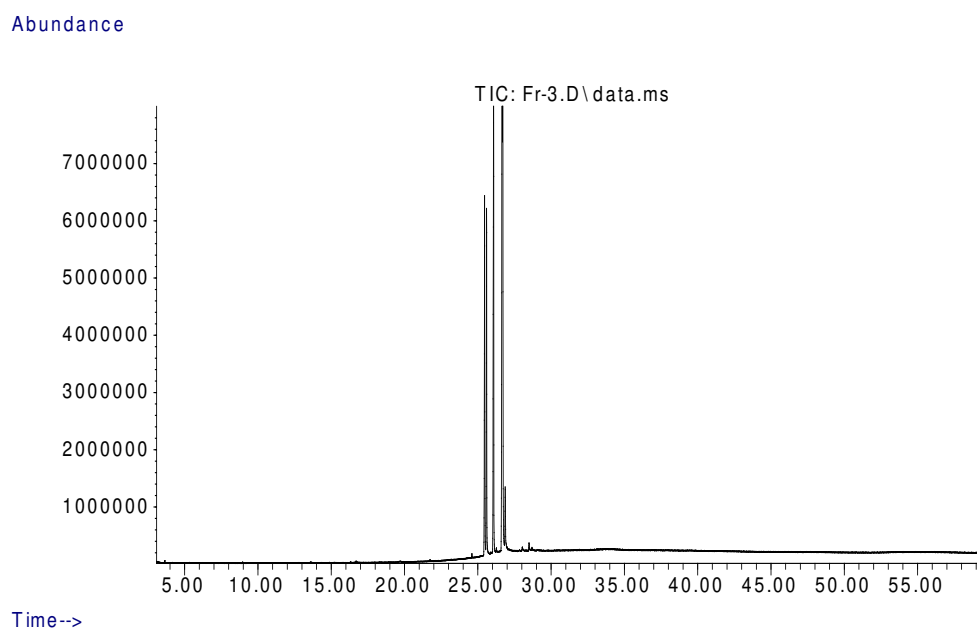
As substâncias identificadas na fração 2 do EEB de *P. amarus* através da análise por CG/EM estão apresentadas na Tabela 3. Esta fração mostrou-se enriquecida em lignanas, destacando a nirtetralina (50,8%) e nirantina (28,2%).

**Tabela 3:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 do EEB de *P. amarus*.

| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância   |
|-------------|-----|------------|--|
| 05,3        | 190 | 1,2        | 2(4H)Benzofuranona,5,6,7,7 <sup>a</sup> -tetrahydro-4,4,7 <sup>a</sup> -trimetil |
| 25,1        | 402 | 1,2        | 5-demetoxi-nirantina   |
| 25,5        | 400 | 8,8        | 5-demetoxi-nirtetralina  |
| 25,6        | 400 | 1,9        | NI   |
| 26,0        | 430 | 50,8       | Nirtetralina   |
| 26,6        | 432 | 28,2       | Nirantina  |
| 26,8        | 430 | 2,1        | NI   |
| 29,0        | 414 | 5,7        | NI   |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção

### Fração 3 (F3)



**Figura 23:** Análise por CG/EM da fração 3 do extrato etanólico bruto de *P. amarus*.

As substâncias identificadas na fração 3 do EEB de *P. amarus* através da análise por CG/EM estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 3 do EEB de *P. amarus*.

| $t_R$ (min) | M M | % relativa | Substância    |
|-------------|-----|------------|---------------|
| 25,4        | 418 | 12,3       | Filantina     |
| 25,6        | 416 | 12,1       | Filtetralina  |
| 26,0        | 430 | 21,4       | Nirtetralina  |
| 26,6        | 430 | 32,0       | Hipofilantina |
| 26,7        | 432 | 19,0       | Nirantina     |
| 26,8        | 430 | 2,8        | NI            |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção

#### 4.1.3 Fracionamento líquido-líquido do EEB

##### Rendimento

Os rendimentos obtidos com o fracionamento líquido-líquido do EEB foram: 31,9% (3,19g) da fração hexânica, 30,4% (3,04g) da fração butanólica e 31,3% (31,3g) da fração aquosa. A massa obtida com a soma de todas as frações foi de 9,36 g, apresentando rendimento total de 93,6 %.

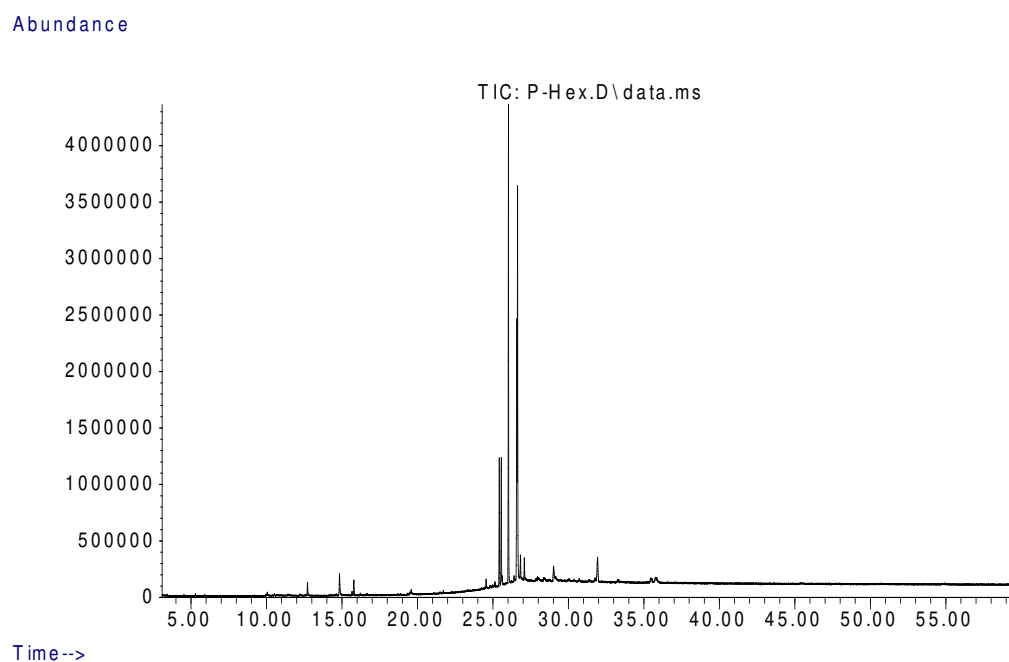
##### CCD das frações obtidas na partição do EEB

A análise da CCD, revelou que a FHEX e FBUOH apresentam maior número de compostos de média e baixa polaridade e a partição  $FH_2O$ , compostos de alta polaridade.

##### CG/EM das frações obtidas por partição do EEB

Em função da CCD apenas as FHEX e FBUOH foram refractionadas e analisadas por CG/EM.

As substâncias da FHEX foram identificadas através do cromatograma visto na Figura 24 e estão apresentadas na Tabela 5.



**Figura 26:** Análise por CG/EM da fração hexânica da partição do EEB de *P. amarus*.

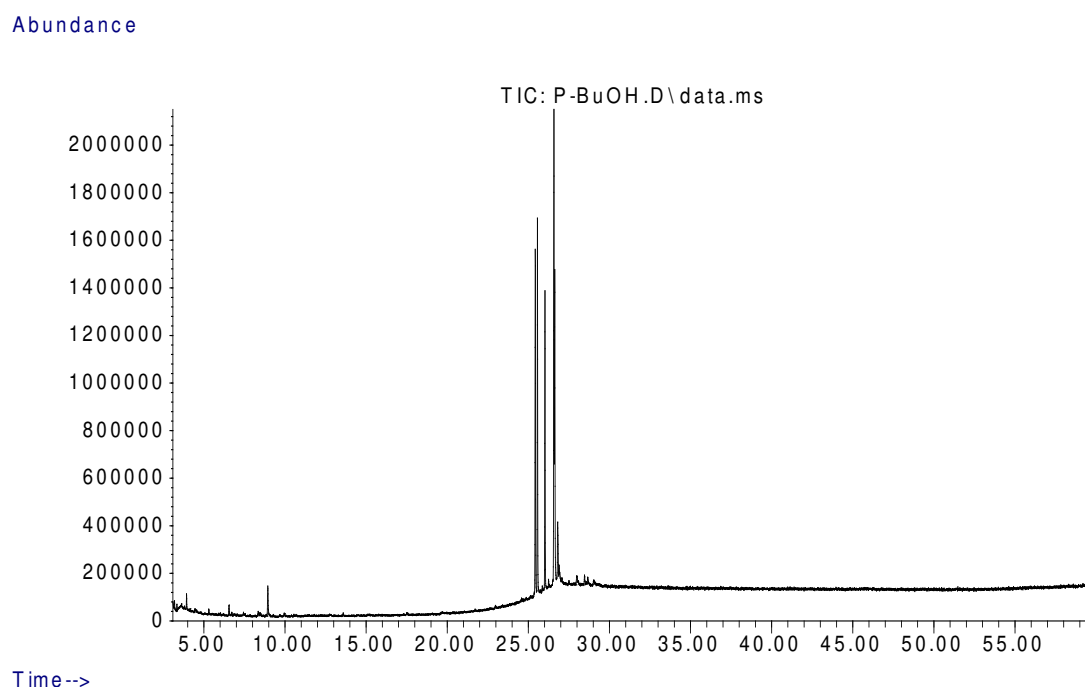
**Tabela 5:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração hexânica da partição do EEB de *P. amarus*.

| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância                                      |
|-------------|-----|------------|---|
| 12,7        | 284 | 0,9        | Hexadecanoato de etila                          |
| 14,8        | 278 | 2,1        | NI  |
| 15,8        | 306 | 1,3        | Éster etílico do ácido 9,12,15-octadecatienoico |
| 25,4        | 418 | 7,4        | Filantina                                       |
| 25,5        | 416 | 7,2        | Filtretalina                                    |
| 26,1        | 430 | 28,6       | Nirtetralina                                    |
| 26,5        | 430 | 15,6       | Hipofilantina                                   |
| 26,6        | 432 | 28,1       | Nirantina                                       |
| 26,8        | 430 | 2,2        | NI  |
| 27,11       | 430 | 1,5        | NI  |
| 29,0        | 430 | 1,7        | NI  |
| 31,9        | 534 | 3,1        | NI  |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção

A FHEX apresentou alta porcentagem relativa em área das lignanas nirtetralina (28,6%) e nirantina (28,1%).

As substâncias presentes na fração butanólica foram identificadas através do cromatogramas da Figura 25 e estão apresentadas na Tabela 6.



**Figura 25:** Análise por CG/EM da fração butanólica da partição do EEB de *P. amarus*.

**Tabela 6:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração butanólica da partição do EEB de *P. amarus*.

| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância    |
|-------------|-----|------------|---------------|
| 8,9         | 196 | 2,2        | NI            |
| 25,4        | 418 | 17,4       | Filantina     |
| 25,5        | 416 | 19,4       | Filtetralina  |
| 26,0        | 430 | 14,4       | Nirtetralina  |
| 26,5        | 430 | 24,5       | Hipofilantina |
| 26,6        | 432 | 17,5       | Nirantina     |
| 26,8        | 466 | 4,3        | NI            |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção

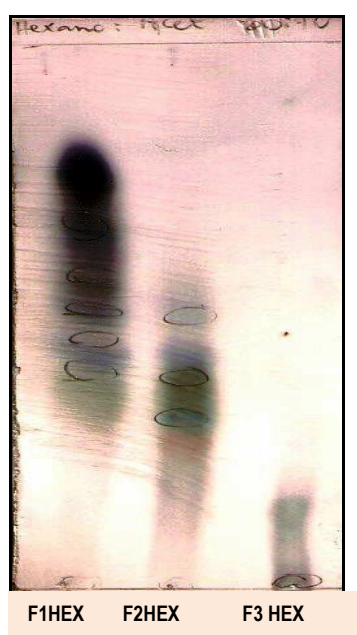
Na FBUOH, das substâncias possíveis de identificação através da CG/EM, detectou-se as lignanas: filantina, filtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina.

#### 4.1.4 Fracionamento das frações hexânica e butanólica por coluna seca

- **Coluna seca da FHEX**

Através da coluna seca da FHEX foram obtidas três frações de diferentes polaridades denominadas fração 1 hexânica (F1HEX), fração 2 hexânica (F2HEX) e fração 3 hexânica (F3HEX) com rendimentos de 43,4%; 38,9% e 14,3%; respectivamente.

Foi feita uma análise por CCD dessas frações, estando apresentada na Figura 26.

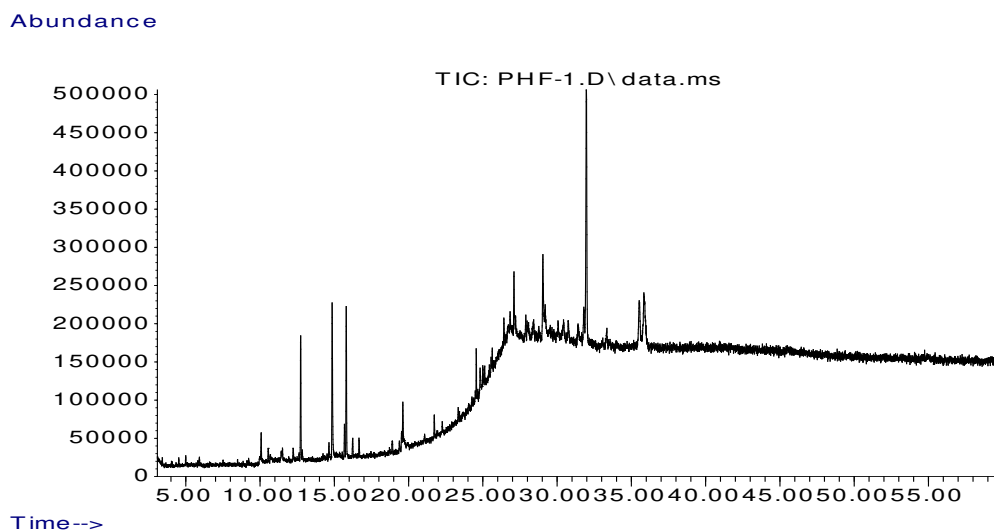


**Figura 26:** CCD das frações 1, 2 e 3 hexânicas da coluna seca da fração hexânica do EEB de *P. amarus*.

#### **CG/EM das frações obtidas da fração hexânica**

➤ **Fração 1 hexânica**

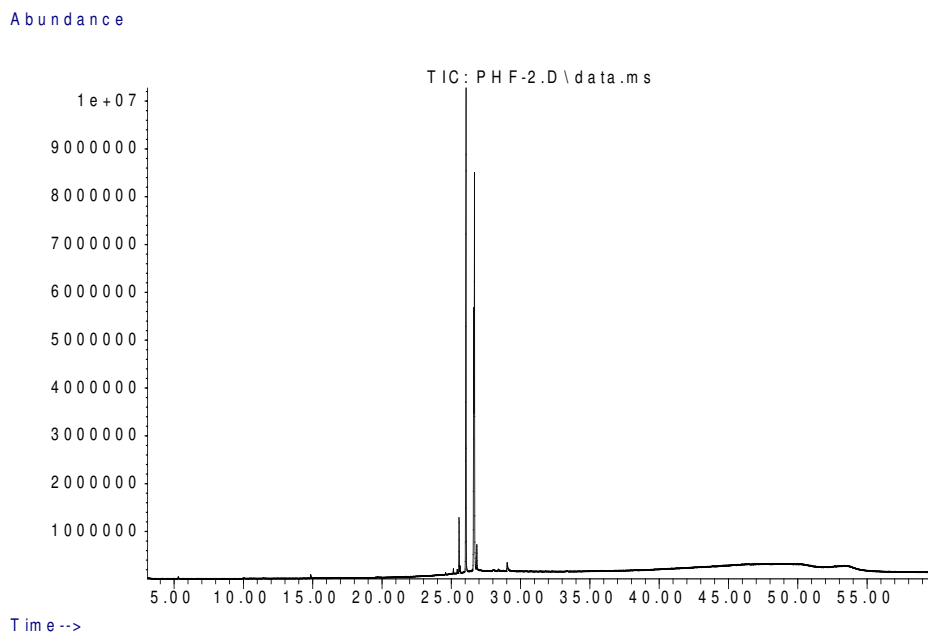
A análise por CG/EM realizada para a F1HEX está apresentada na Figura 27.



**Figura 27:** Análise por CG/EM da fração 1 hexânica da coluna seca da FHEX do EEB de *P. amarus*.

➤ **Fração 2 hexânica**

A análise de CG/EM realizada para a F2HEX está apresentada na Figura 28 e as substâncias identificadas podem ser observadas na Tabela 7. Foram identificadas as lignanas filtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina.



**Figura 28:** Análise por CG/EM da fração 2 hexânica da coluna seca da FHEX do EEB de *P. amarus*.

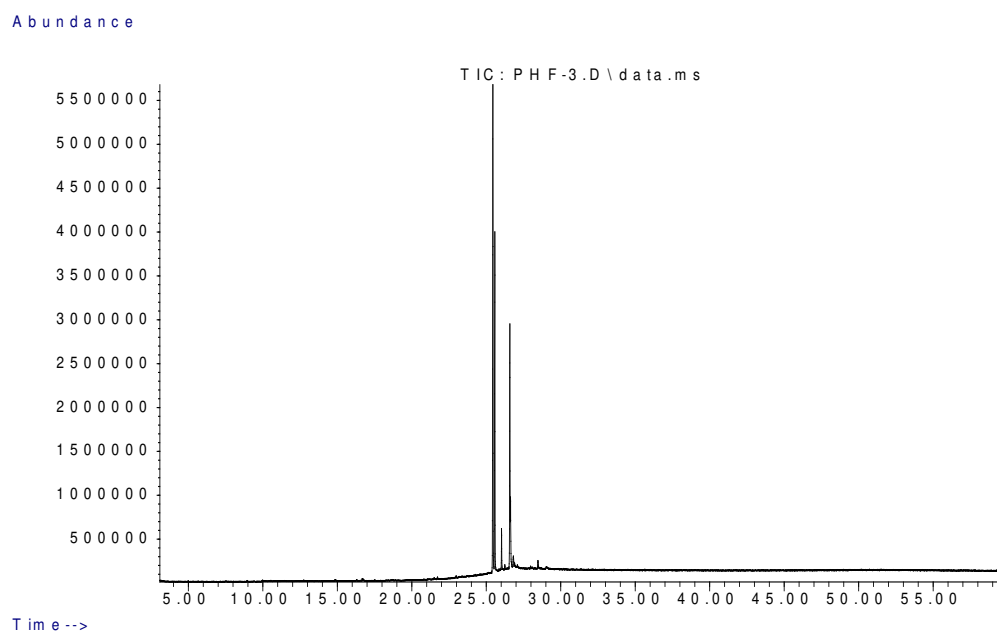
**Tabela 7:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 hexânica.

| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância    |
|-------------|-----|------------|---------------|
| 25,5        | 416 | 3,6        | Filtetralina  |
| 26,0        | 430 | 39,5       | Nirtetralina  |
| 26,6        | 430 | 20,3       | Hipofilantina |
| 26,6        | 432 | 34,3       | Nirantina     |
| 26,8        | 430 | 2,1        | NI            |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção.

### ➤ Fração 3 hexânica

A Figura 29 representa a análise por CG/EM da F3HEX obtida da coluna seca da FHEX do EEB de *P. amarus*. Nessa fração foram identificadas as lignanas filantina, filtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina, Na Tabela 8 estão apresentadas as porcentagens relativas em área das substâncias identificadas na F3HEX.



**Figura 29:** Análise por CG/EM da fração 3 hexânica obtida da coluna seca da FHEX do EEB de *P. amarus*.

**Tabela 8:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 3 hexânica.

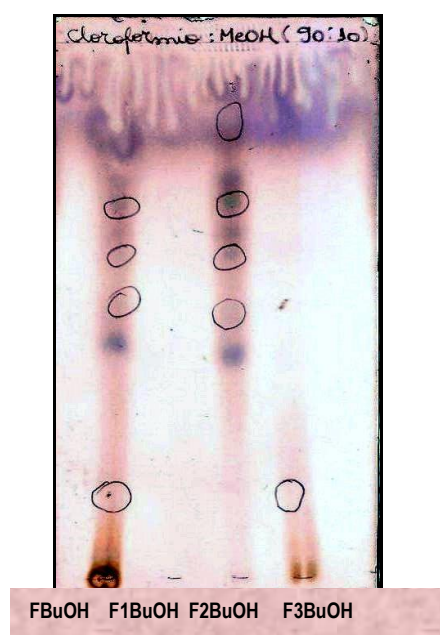
| $t_R$ (min) | MM  | % relativa | Substância    |
|-------------|-----|------------|---------------|
| 25,4        | 418 | 41,1       | Filantina     |
| 25,5        | 416 | 28,4       | Filtetralina  |
| 26,0        | 430 | 3,2        | Nirtetralina  |
| 26,5        | 430 | 20,4       | Hipofilantina |
| 26,6        | 432 | 6,7        | Nirantina     |

Legenda: MM: Massa Molar;  $t_R$ : Tempo de retenção.

### • Coluna seca da Fração Butanólica

A coluna seca da FBUOH forneceu três frações de diferentes polaridades denominadas fração 1 butanólica (F1BUOH), fração 2 butanólica (F2BUOH) e fração 3 butanólica (F3BUOH) com rendimentos de 0,9%; 43,4% e 55,7%; respectivamente.

Todas as frações obtidas no fracionamento dessa coluna seca foram analisadas por CCD (Figura 30), e após essa análise apenas a F2BUOH foi analisada por CG/EM, uma vez que as F1BUOH e F3BUOH apresentaram substâncias de alta polaridade que não seria possível de identificar através da CG/EM.

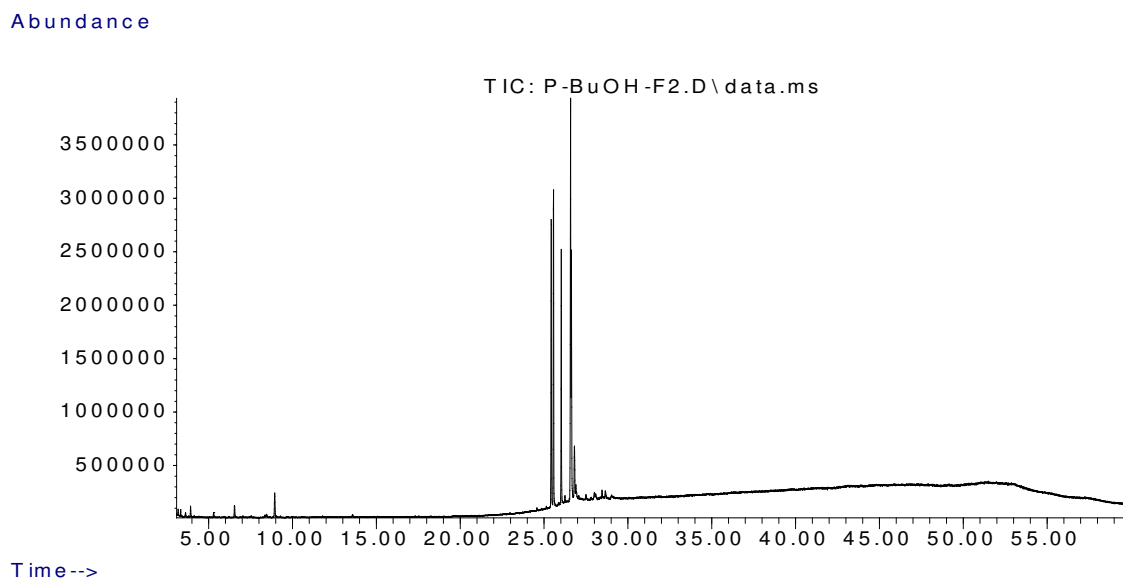


**Figura 30:** Análise por CCD da fração butanólica e frações 1, 2 e 3 butanólicas obtidas do EEB de *P. amarus*.



**CG/EM da fração 2 butanólica**

A análise por CG/EM da F2BuOH pode ser observada na Figura 31. Foram identificadas as lignanas filantina, filtetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina que corresponde em porcentagem relativa em área a 93,6% das substâncias identificadas, conforme pode ser visto na Tabela 9.



**Figura 31:** Análise por CG/EM da fração 2 butanólica da coluna seca da F2BuOH do EEB de *P. amarus*.

**Tabela 9:** Porcentagens relativas em área das substâncias identificadas por CG/EM na fração 2 butanólica.

| <b>t<sub>R</sub> (min)</b> | <b>MM</b> | <b>% relativa</b> | <b>Substância</b> |
|----------------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| 8,9                        | 196       | 2,1               | NI                |
| 25,4                       | 418       | 17,8              | Filantina         |
| 25,5                       | 416       | 19,3              | Filtetralina      |
| 26,0                       | 430       | 14,3              | Nirtetralina      |
| 26,5                       | 430       | 24,7              | Hipofilantina     |
| 26,6                       | 432       | 17,3              | Nirantina         |
| 26,8                       | 474       | 4,2               | NI                |

Legenda: NI: Não Identificado; MM: Massa Molar; t<sub>R</sub>: Tempo de retenção

## 4.2. TESTES *in vitro*

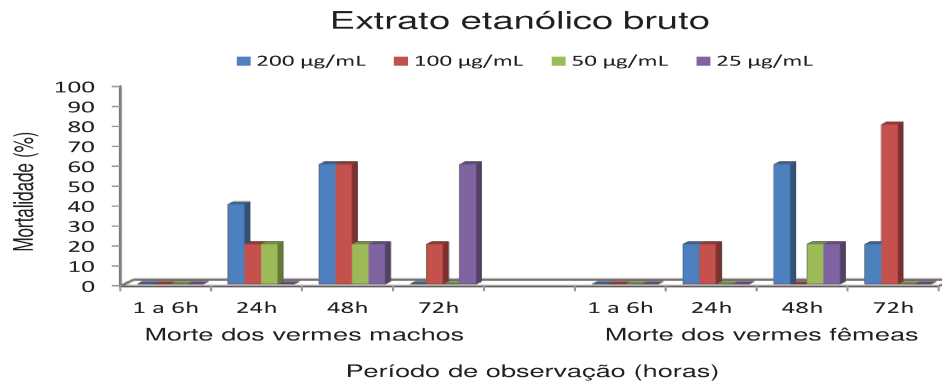
### 4.2.1 Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* durante os testes *in vitro*

O EEB e frações de *P. amarus* causaram alterações na suscetibilidade dos vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni*. Os ensaios realizados mostraram que a morte dos parasitas ocorreu de forma dependente da concentração e do tempo de incubação (Figuras 32 a 48).

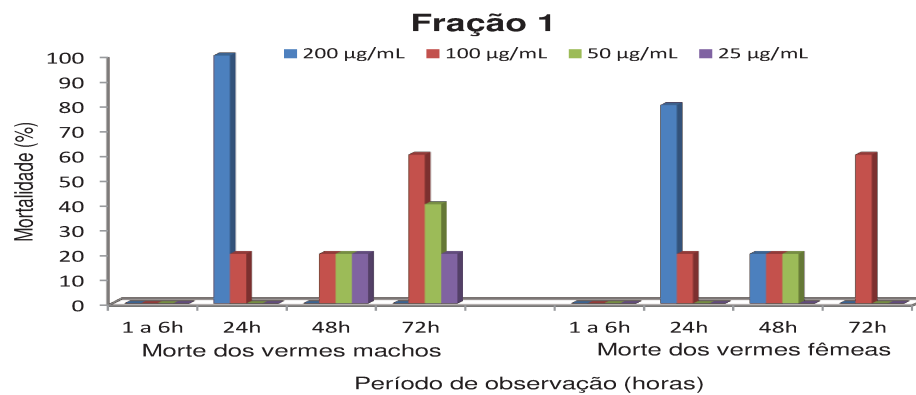
O efeito esquistossomicida foi observado nas primeiras 6 h de incubação com as amostras das Fr 3, FHEX e F2HEX, sendo letais para 100% dos vermes machos e fêmeas, na concentração 200 µg/mL. Após 24 h de experimento foi observado que as amostras Fr 3 (100 e 50 µg/mL), Fr 4 (200 µg/mL), FHEX (100 µg/m), F3HEX (200 µg/mL), FBUOH (200 µg/mL) e F2BUOH (200 e 100 µg/mL) ocasionaram a morte de 100% dos vermes. Em 48 h, as Fr 3 (25 µg/mL), F2HEX (50 µg/mL), F3HEX (100 µg/mL) FBUOH (100 e 50 µg/mL), F2BUOH (50 e 25 µg/mL) e F3BUOH (200 µg/mL) foram 100% letais para os vermes machos e fêmeas. No término do período de incubação, 72 h, a mortalidade de 100% dos parasitas foi ocasionada pelas amostras EEB (100 µg/mL), Fr 1 (100 µg/mL), FHEX (50 µg/mL) e F2HEX (25 µg/mL). Diante desses resultados, percebeu-se que não existiu diferença significativa na taxa de mortalidade entre os vermes machos e fêmeas, ocorrendo a morte desses praticamente no mesmo período de observação.

Os ensaios com as lignanas: nirantina, filantina, hipofilantina e filantina + filtetralina + nirtetralina, não provocaram a morte dos vermes machos e fêmeas de *S. mansoni*, logo não houve nível de significância entre essas as amostras e as demais.

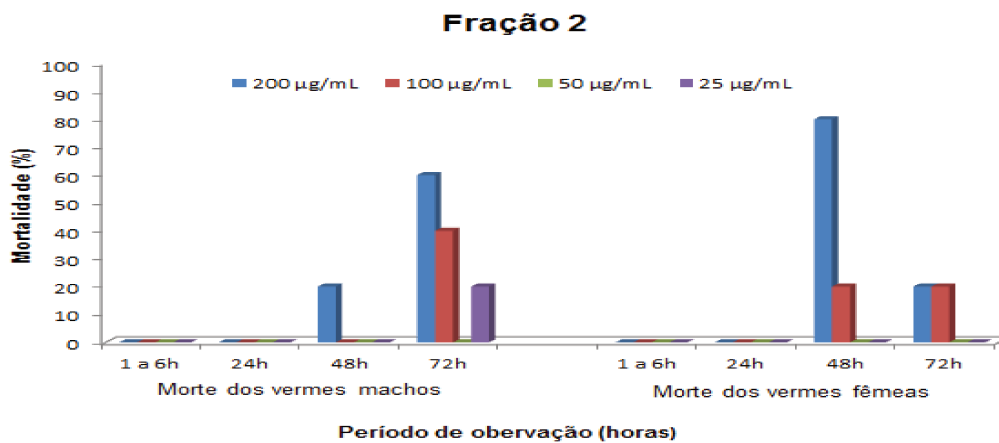
O controle farmacológico positivo com o PZQ 10 µg/mL foi letal para 100% dos vermes machos e fêmeas pós 4 h de exposição. Os vermes do grupo controle negativo, mantidos em meio RPMI 1640 (sem adição de extratos ou fármacos), permaneceram viáveis até o final do experimento, ou seja, 72 h de incubação.



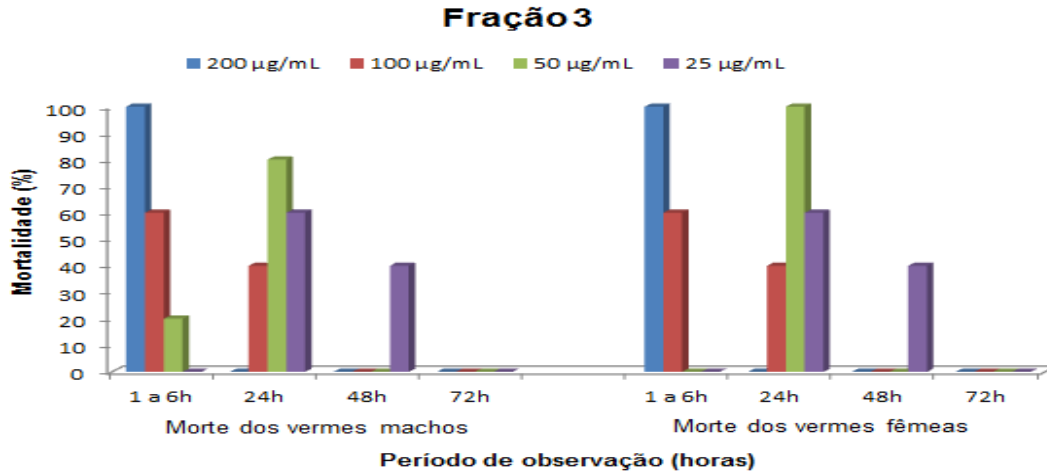
**Figura 32:** Efeito do extrato etanólico bruto (EEB) de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



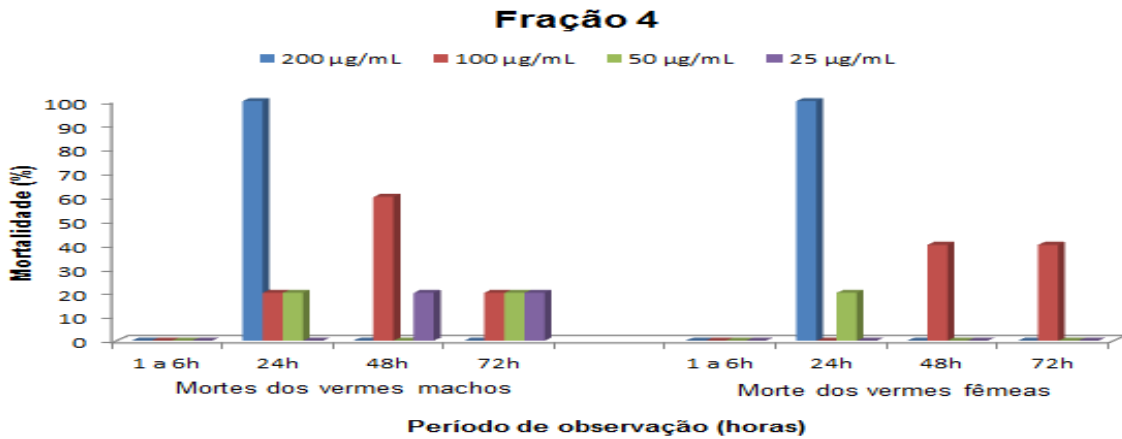
**Figura 33:** Efeito da fração 1 do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



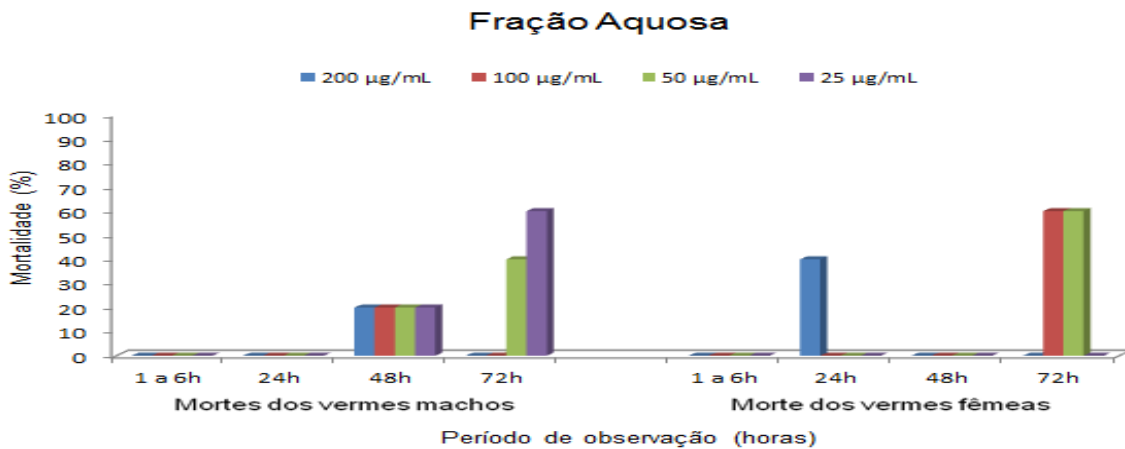
**Figura 34:** Efeito da fração 2 do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



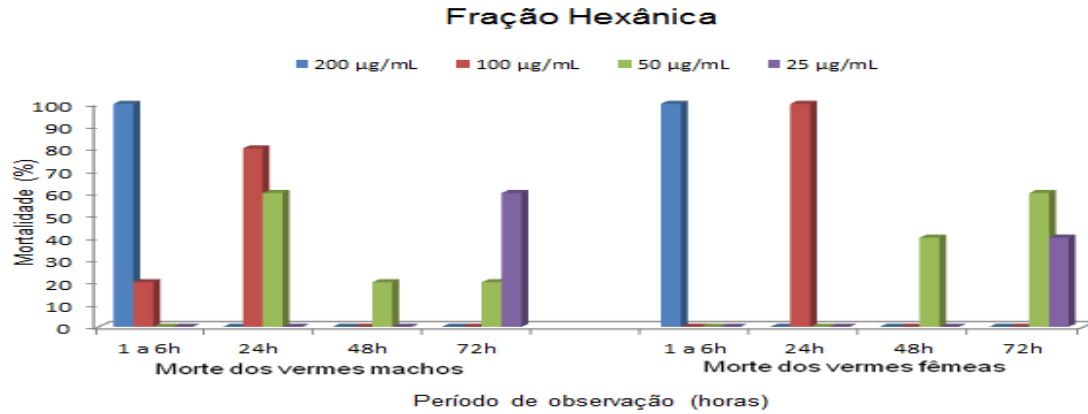
**Figura 35:** Efeito da fração 3 do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



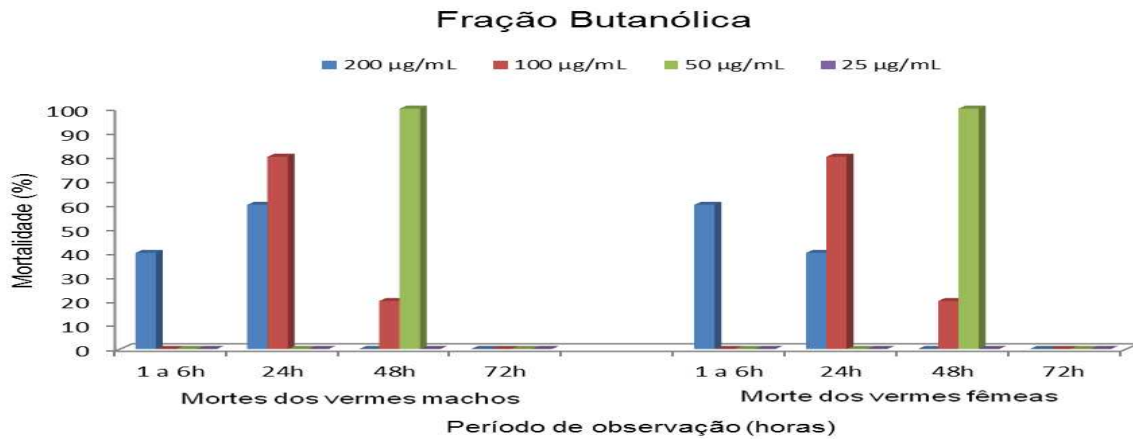
**Figura 36:** Efeito da fração 4 do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



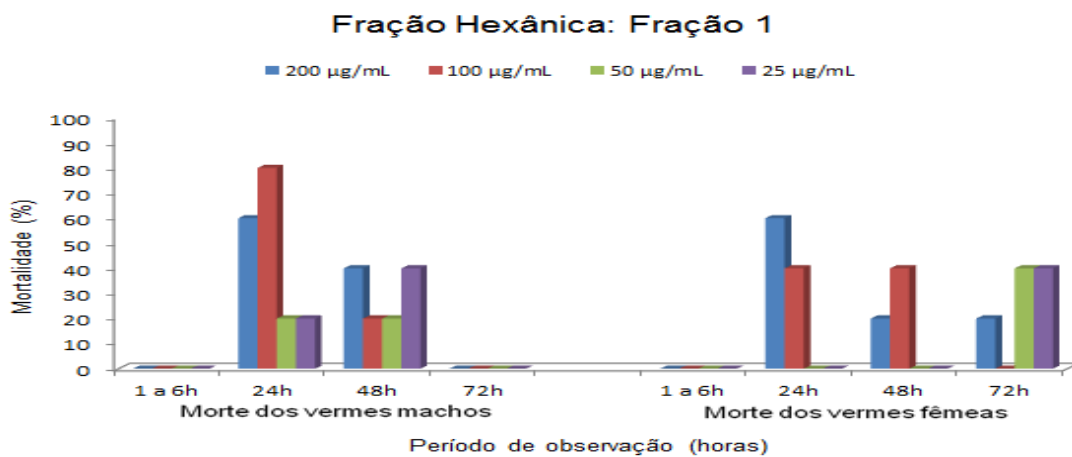
**Figura 37:** Efeito da fração aquosa do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



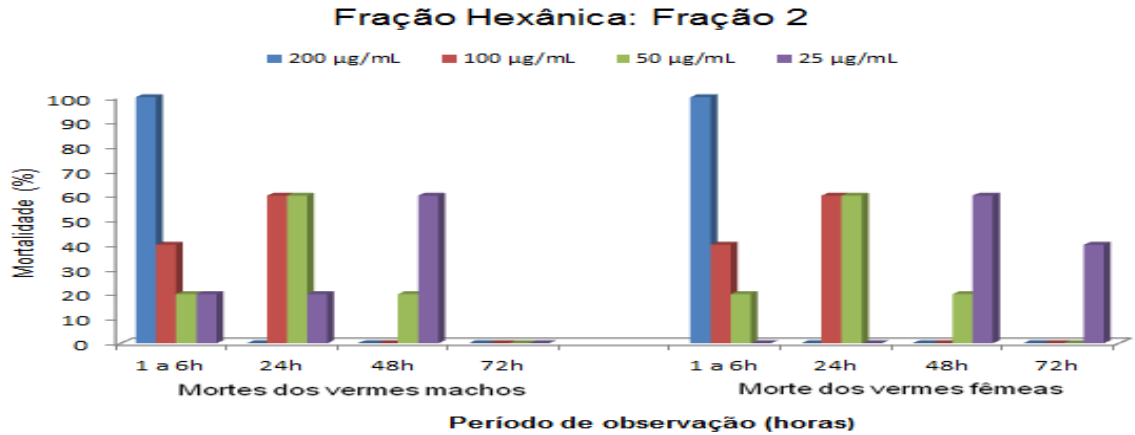
**Figura 38:** Efeito da fração hexânica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



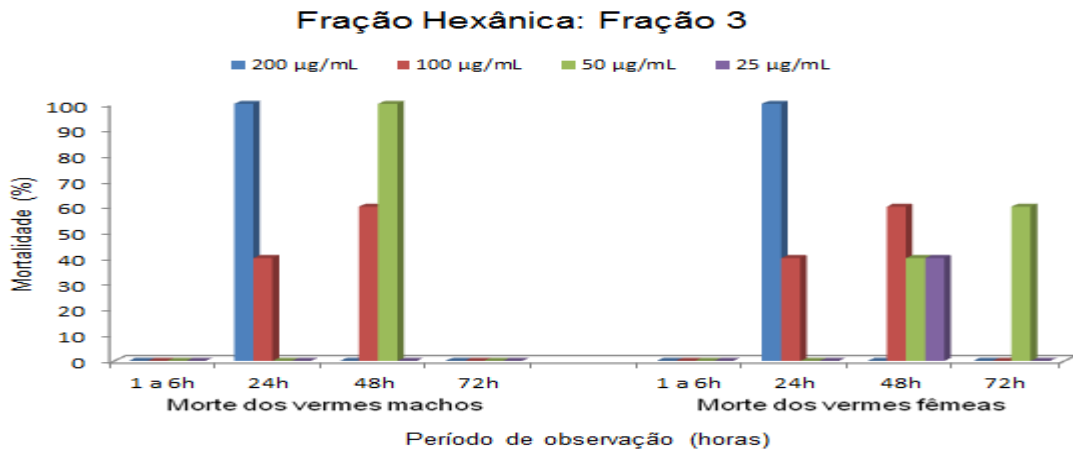
**Figura 39:** Efeito da fração butanólica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



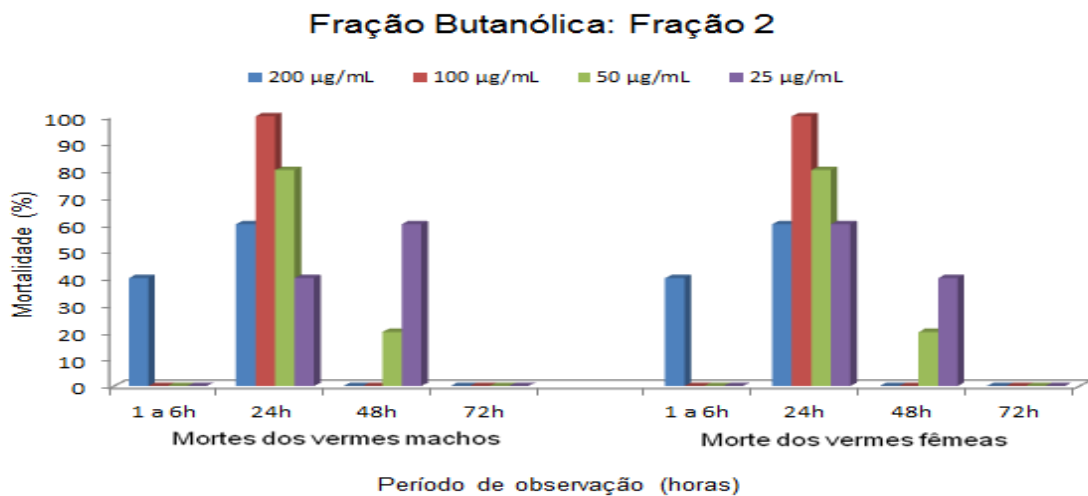
**Figura 40:** Efeito da fração 1 hexânica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



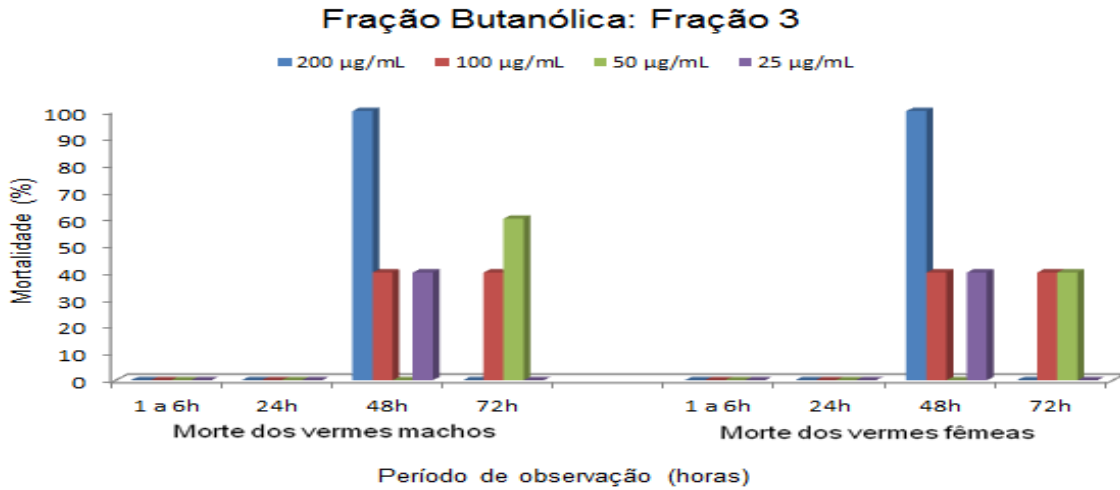
**Figura 41:** Efeito da fração 2 hexânica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



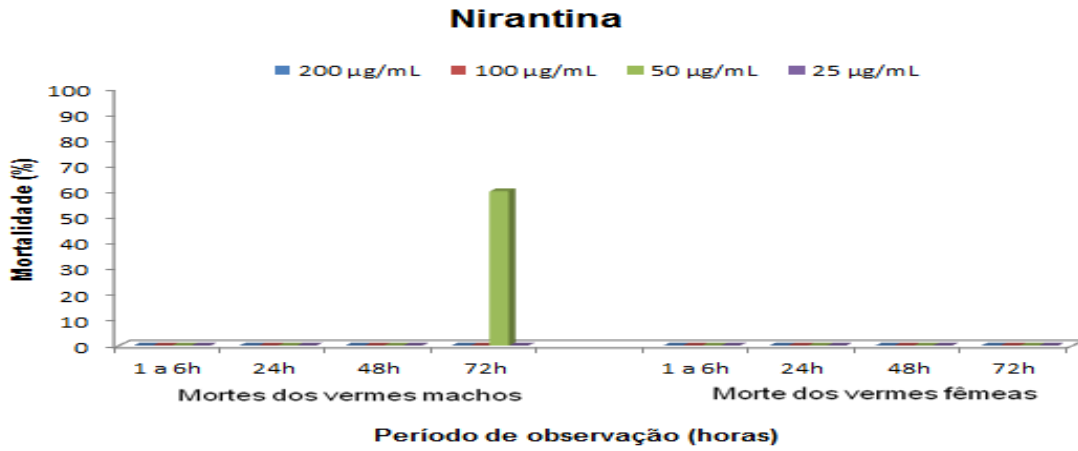
**Figura 42:** Efeito da fração 3 hexânica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



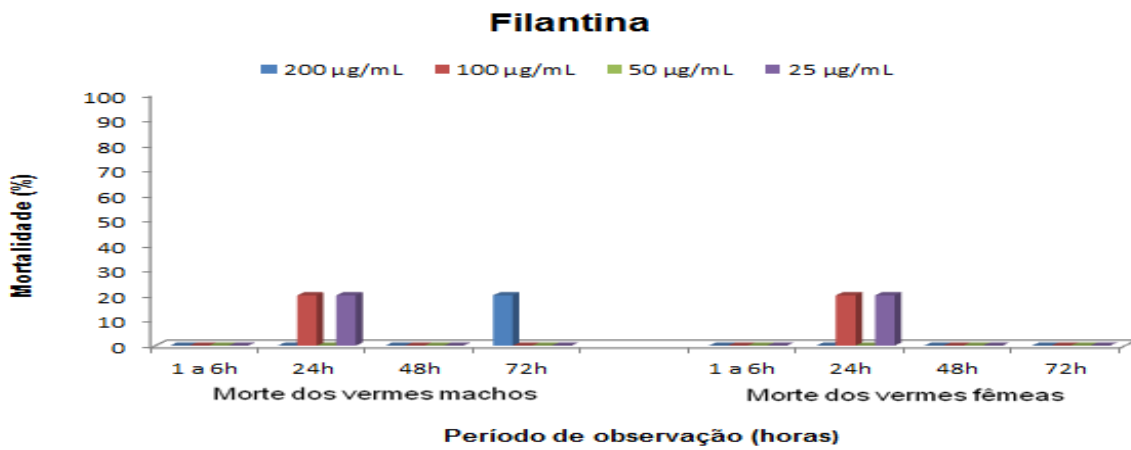
**Figura 43:** Efeito da fração 2 butanólica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



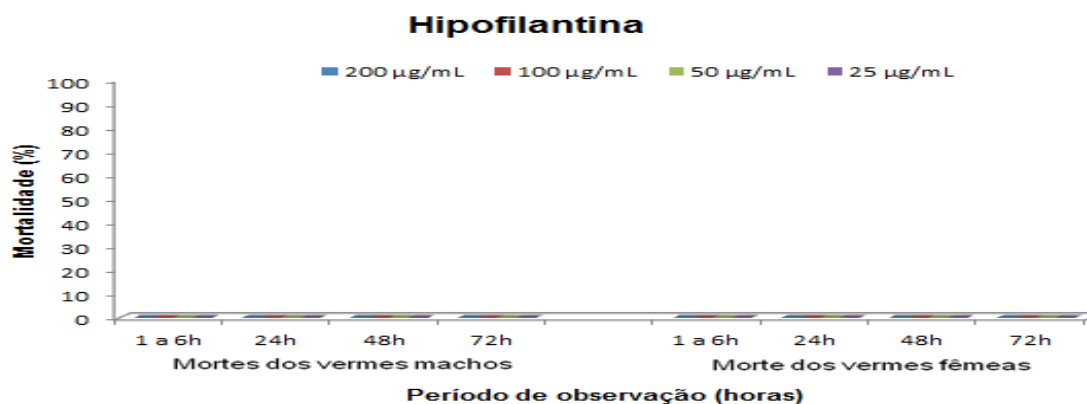
**Figura 44:** Efeito da fração 3 butanólica do EEB de *P. amarus* na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



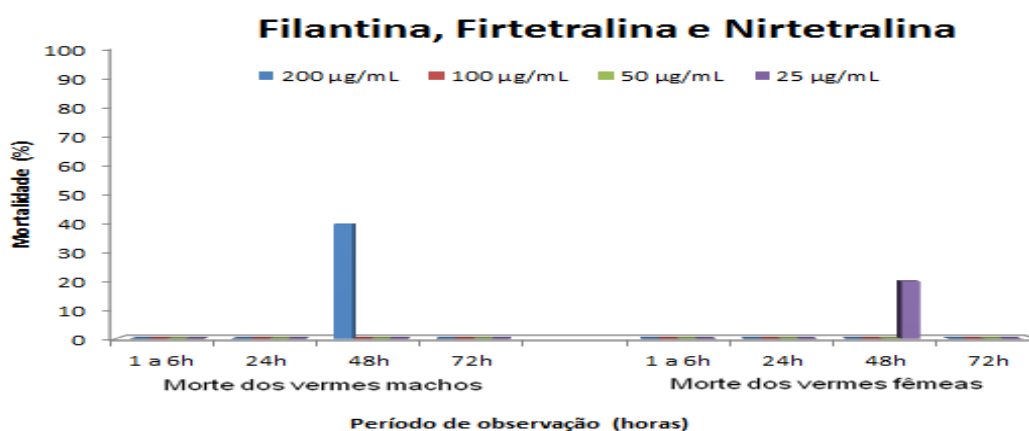
**Figura 45:** Efeito da lignana nirantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



**Figura 46:** Efeito da lignana filantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



**Figura 47:** Efeito da lignana hipofilantina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.



**Figura 48:** Efeito da composição de lignanas filantina + firtetralina + nirtetralina na mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni*.

Diante dos resultados obtidos, verificou-se que as frações Fr 3, F2HEX e F2BuOH conseguiram matar 100% dos vermes em todas as concentrações testadas, em até 72 h de observação como mostra a Tabela 10.



**Tabela 10:** Taxa de mortalidade total dos vermes de *S. mansoni*, quando expostos as amostras obtidas do fracionamento do extrato etanólico bruto de *P. amarus*, após 72 horas de observação.

| <b>MORTALIDADE TOTAL DOS VERMES</b>                |                      |                      |                     |                     |
|--|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Amostras</b>                                    | <b>Concentrações</b> |                      |                     |                     |
|  | <b>200<br/>µg/mL</b> | <b>100<br/>µg/mL</b> | <b>50<br/>µg/mL</b> | <b>25<br/>µg/mL</b> |
| <b>EEB</b>   | 100%                 | 100%                 | 40%                 | 20%                 |
| <b>Fr 1</b>  | 100%                 | 100%                 | 40%                 | 20%                 |
| <b>Fr 2</b>  | 90%                  | 40%                  | 0%                  | 10%                 |
| <b>Fr 3</b>  | <b>100%</b>          | <b>100%</b>          | <b>100%</b>         | <b>100%</b>         |
| <b>Fr 4</b>  | 100%                 | 90%                  | 30%                 | 20%                 |
| <b>FH<sub>2</sub>O</b>                             | 40%                  | 50%                  | 60%                 | 40%                 |
| <b>FHEX</b>  | 100%                 | 100%                 | 100%                | 50%                 |
| <b>FBuOH</b>                                       | 100%                 | 100%                 | 100%                | 0%                  |
| <b>F1HEX</b>                                       | 100%                 | 100%                 | 40%                 | 50%                 |
| <b>F2HEX</b>                                       | <b>100%</b>          | <b>100%</b>          | <b>100%</b>         | <b>100%</b>         |
| <b>F3HEX</b>                                       | 100%                 | 100%                 | 100%                | 20%                 |
| <b>F2BuOH</b>                                      | <b>100%</b>          | <b>100%</b>          | <b>100%</b>         | <b>100%</b>         |
| <b>F3BuOH</b>                                      | 100%                 | 80%                  | 50%                 | 40%                 |
| <b>Nirantina</b>                                   | 0%                   | 0%                   | 30%                 | 0%                  |
| <b>Filantina</b>                                   | 10%                  | 20%                  | 0%                  | 20%                 |
| <b>Hipofilantina</b>                               | 0%                   | 0%                   | 0%                  | 0%                  |
| <b>Filantina + Filtetralina +<br/>Nirtetralina</b> | 20%                  | 0%                   | 0%                  | 10%                 |

OBS: Os vermes do grupo controle negativo, sem adição de extratos ou fármacos, permaneceram viáveis pelas 72 h de observação. O controle farmacológico (PZQ- 10 µg/mL) causou a morte de 100% dos vermes em 4 h.

Nem todas as amostras testadas apresentaram ação esquistossomicida, caso das FH<sub>2</sub>O e lignanas, filantina, nirantina, hipofilantina e filantina + filtetralina + nirtetralina. O tempo em que houve 100% de mortalidade para os vermes também variou conforme a amostra, como pode ser visto na Tabela 11.

**Tabela 11:** Amostras derivadas de *P. amarus* que apresentaram ação esquistossomicida para 100% dos vermes em relação ao tempo.

| 100% DE MORTALIDADE EM HORAS DE OBSERVAÇÃO |          |          |         |         |
|--|----------|----------|---------|---------|
|  | 200µg/ml | 100µg/ml | 50µg/ml | 25µg/ml |
| <b>EEB</b>                                 | 72 h     | 72 h     | -       | -       |
| <b>Fr 1</b>                                | 48 h     | 72 h     | -       | -       |
| <b>Fr 2</b>                                | 72 h     | -        | -       | -       |
| <b>Fr 3</b>                                | 6 h      | 24 h     | 24 h    | 72 h    |
| <b>Fr 4</b>                                | 24 h     | -        | -       | -       |
| <b>FHEX</b>                                | 6 h      | 24 h     | 72 h    | -       |
| <b>FBuOH</b>                               | 24 h     | 48 h     | 48 h    | -       |
| <b>F1HEX</b>                               | 72 h     | 72 h     | -       | -       |
| <b>F2HEX</b>                               | 6 h      | 48 h     | 72 h    | 72 h    |
| <b>F3HEX</b>                               | 24 h     | 48 h     | 72 h    | -       |
| <b>F2BuOH</b>                              | 24 h     | 24 h     | 48 h    | 48 h    |
| <b>F3BuOH</b>                              | 48 h     | -        | -       | -       |

#### 4.2.2 Cálculo da DL<sub>50</sub>

A dose letal mediana ou DL<sub>50</sub> é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste. A sua determinação foi feita expondo vermes adultos de *S. mansoni* a diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 µg/mL) das substâncias, testadas por 72 h. Os valores das DL<sub>50</sub> foram calculadas estatisticamente com o auxílio do programa Origin 7 e a partir dos dados obtidos experimentalmente os valores das DL<sub>50</sub> foram obtidos como mostra a Tabela 12.

**Tabela 12:** Valores das DL<sub>50</sub> das amostras de *P. amarus* testadas *in vitro*.

| Amostras                                | DL <sub>50</sub> (µg/mL) |
|---|--------------------------|
| EEB                                     | 39,31                    |
| Fr 1                                    | 57,41                    |
| Fr 2                                    | 111,7                    |
| Fr 3                                    | < 25                     |
| Fr 4                                    | 59,28                    |
| FH2O                                    | -                        |
| FHEX                                    | 25                       |
| FBuOH                                   | 43,53                    |
| F1HEX                                   | 41,07                    |
| F2HEX                                   | < 25                     |
| F3HEX                                   | 26,02                    |
| F2BuOH                                  | < 25                     |
| F3BuOH                                  | 39,45                    |
| Nirantina                               | -                        |
| Filantina                               | -                        |
| Hipofilantina                           | >200                     |
| Filantina + Filtetralina + Nirtetralina | >200                     |

#### **4.2.3 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados na separação dos vermes adultos de *S. mansoni* durante os testes *in vitro***

A fim de avaliar a capacidade reprodutiva dos vermes adultos de *S. mansoni* quando expostos ao EEB, frações e compostos isolados, o acasalamento dos vermes foi continuamente monitorado por um período total de 72 horas.

As amostras testadas apresentaram ação sobre o acasalamento dos vermes. Ao término dos experimentos a porcentagem de vermes separados dos grupos expostos às amostras foi superior a do grupo controle negativo (Tabela 13). Para o EEB e frações a maior parte das concentrações separou em torno de 60 a 100%, já nas primeiras 6 h de observação. As lignanas nirantina e filantina foram as que apresentaram maior taxa de separação, praticamente 100% em todas as concentrações, porém a separação aconteceu em 24 h de análise. Entre todas as amostras testadas a hipofilantina foi a que apresentou menor taxa de separação dos casais, em torno de 40%.

O grupo controle farmacológico positivo com PZQ não alterou o acasalamento e o controle negativo (sem adição de fármacos ou extratos) não apresentou separação dos casais ou apresentou separação em torno de 25% dos casais.

**Tabela 13:** Efeito das amostras obtidas do extrato etanólico bruto de *P. amarus* sobre a separação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após 72 horas de observação.

| SEPARAÇÃO DOS VERMES                               |               |              |             |             |      |
|--|---------------|--------------|-------------|-------------|------|
| Amostras   | Concentrações |              |             |             | CTRL |
|  | 200<br>µg/mL  | 100<br>µg/mL | 50<br>µg/mL | 25<br>µg/mL |      |
| <b>EEB</b>   | 80%           | 100%         | 0%          | 80%         | 25%  |
| <b>Fr 1</b>  | 20%           | 100%         | 80%         | 60%         | 25%  |
| <b>Fr 2</b>  | 100%          | 80%          | 100%        | 80%         | 0%   |
| <b>Fr 3</b>  | 100%          | 60%          | 80%         | 60%         | 0%   |
| <b>Fr 4</b>  | 100%          | 100%         | 80%         | 40%         | 25%  |
| <b>FH<sub>2</sub>O</b>                             | 40%           | 60%          | 100%        | 80%         | 0%   |
| <b>FHEX</b>  | 100%          | 60%          | 80%         | 100%        | 0%   |
| <b>F1HEX</b>                                       | 80%           | 100%         | 40%         | 80%         | 0%   |
| <b>F2HEX</b>                                       | 80%           | 60%          | 100%        | 80%         | 25%  |
| <b>F3HEX</b>                                       | 80%           | 100%         | 80%         | 40%         | 0%   |
| <b>FBuOH</b>                                       | 80%           | 100%         | 80%         | 60%         | 25%  |
| <b>F2BuOH</b>                                      | 100%          | 80%          | 80%         | 80%         | 25%  |
| <b>F3BuOH</b>                                      | 80%           | 80%          | 80%         | 80%         | 25%  |
| <b>Nirantina</b>                                   | 100%          | 100%         | 100%        | 100%        | 0%   |
| <b>Filantina</b>                                   | 100%          | 100%         | 60%         | 80%         | 25%  |
| <b>Hipofilantina</b>                               | 40%           | 40%          | 40%         | 20%         | 25%  |
| <b>Filantina + Filtetralina +<br/>Nirtetralina</b> | 80%           | 60%          | 60%         | 20%         | 0%   |

Porcentagem em relação a 5 casais de vermes para os grupos que receberam substâncias ativas e 4 casais de vermes para os grupos controle.

CTRL: grupo controle negativo, sem adição de substâncias, apenas com meio de cultura RPMI 1640.

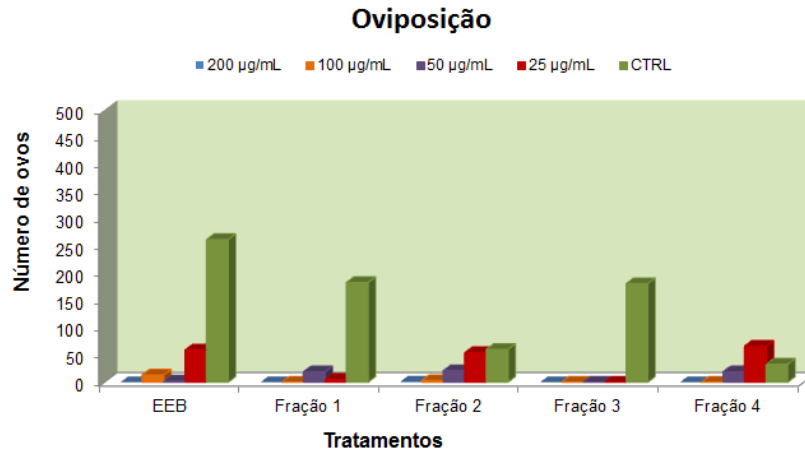
#### **4.2.4 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados na oviposição dos vermes adultos de *S. mansoni* durante os testes *in vitro***

A avaliação da oviposição de *S. mansoni* também teve como objetivo medir a capacidade de reprodução do parasita após a exposição às amostras do EEB, frações e compostos isolados de *P. amarus*. A contagem de ovos eliminados pelas fêmeas foi monitorada diariamente por um período total de 72 h, e comparado com o grupo controle negativo.

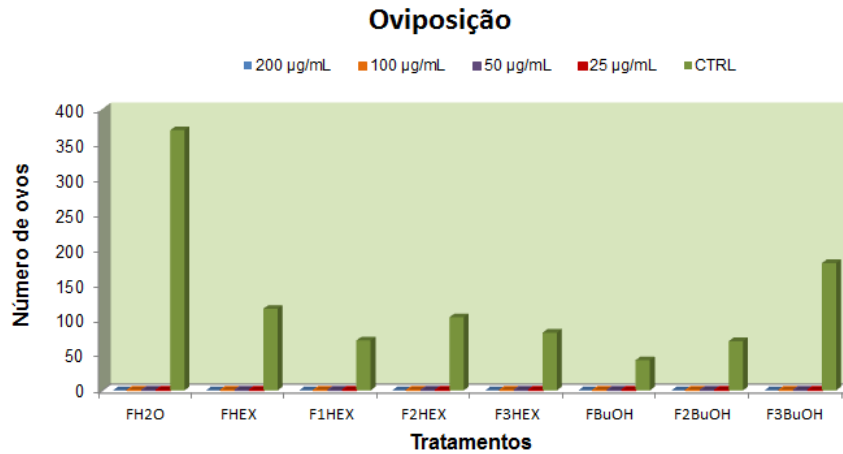
Os ensaios com as amostras da Fr 3, FH<sub>2</sub>O, FBuOH, F2BuOH, F3BuOH, PHEX, F1HEX, F2HEX, F3HEX e nirantina, não apresentaram oviposição em nenhuma das concentrações testadas. O EEB inibiu a oviposição na C1 (200 µg/mL), e as Fr 1, Fr 4, filantina e filantina + filtetralina + nirtetralina nas C1 (200 µg/mL) e C2 (100 µg/mL). Em contraste, os vermes expostos a hipofilantina tiveram uma oviposição em quantidade igual ou até superior ao encontrado no respectivo grupo controle negativo, em todas as concentrações utilizadas. Isso pode estar relacionado ao fato de que para essa mesma amostra a porcentagem de separação dos casais foi baixa, permanecendo a maioria dos vermes acasalados, favorecendo assim o processo reprodutivo.

No grupo controle positivo com o PZQ 10 µg/mL não houve oviposição, uma vez que o efeito esquistossomicida ocorreu primeiro, em 4 h de observação.

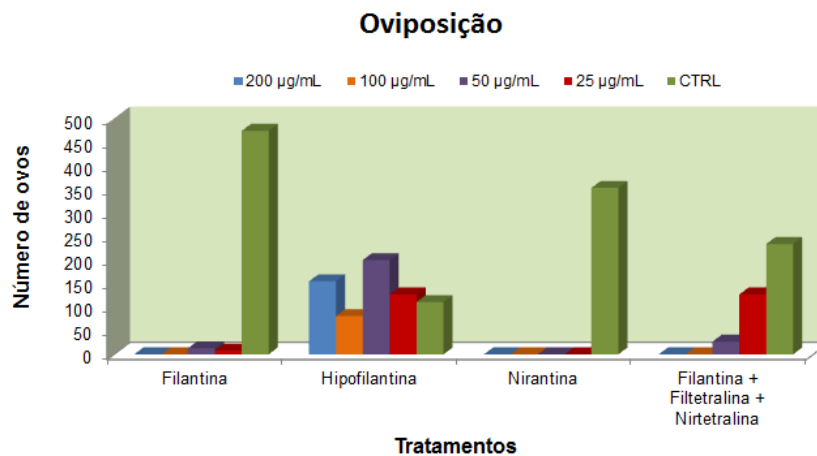
As contagens de ovos eliminados pelas fêmeas de *S. mansoni* nas culturas contendo o EEB, frações e lignanas, em diferentes concentrações, são mostradas nas Figuras 49, 50 e 51.



**Figura 49:** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto, frações 1, 2, 3 e 4 de *P. amarus* na postura de ovos de vermes de *Schistosoma mansoni in vitro*.



**Figura 50:** Efeito de diferentes concentrações das partições aquosa, hexânica, butanólica e respectivas frações na postura de ovos de vermes de *Schistosoma mansoni in vitro*.



**Figura 51:** Efeito de diferentes concentrações das lignanas filantina, hipofilantina, nirantina e filantina + filtetralina + nirtetralina na postura de ovos de vermes de *Schistosoma mansoni in vitro*.

#### **4.2.5 Efeito do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* durante os testes *in vitro***

O efeito das substâncias testadas no tegumento de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* foi avaliada qualitativamente através do microscópio óptico invertido. Em geral, os vermes machos foram mais afetados, apresentando danos tegumentares que variaram de moderado a intenso. Os vermes fêmeas em sua maioria não sofreu alteração tegumentar ou foram vistas lesões leves.

As porcentagens da quantidade de vermes com alterações tegumentares podem ser vistas na Tabela 14.

O grupo controle positivo exposto ao PZQ (10 µg/mL), apresentou 100% dos vermes machos com alterações morfológicas, já nas fêmeas não foi possível observar se houve alteração, uma vez que não houve separação dos casais de vermes, estando os vermes machos mais expostos. No grupo controle negativo, sem adição de extratos, nenhuma alteração tegumentar foi visualizada nos vermes machos e fêmeas.



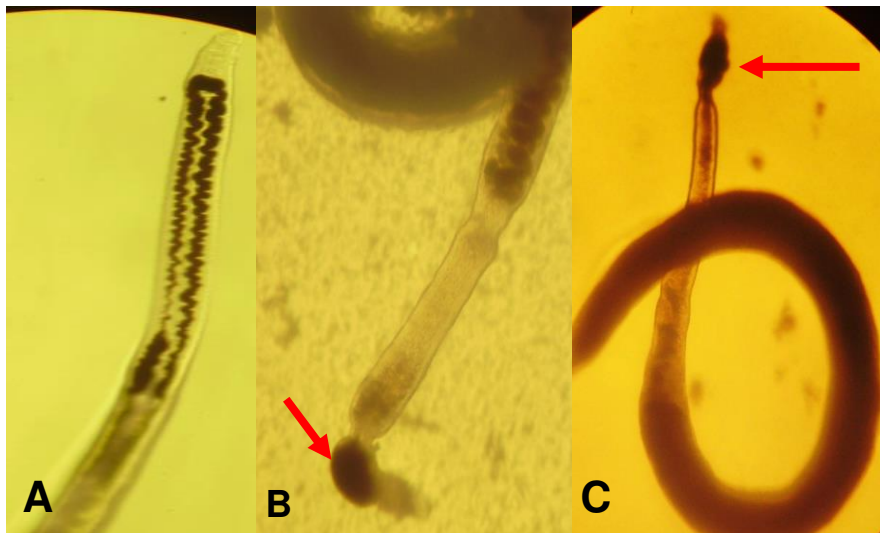
**Tabela 14:** Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* após a exposição às amostras de *P. amarus* em período de incubação de 72 horas.

| Alterações tegumentares <sup>(a)</sup> |           |           |                      |           |           |
|--|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| Grupo                                  | Macho (%) | Fêmea (%) | Grupo                | Macho (%) | Fêmea (%) |
| <b>EEB</b>                             |           |           | <b>F2HEX</b>         |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 40        | 200 µg/mL            | 100       | 60        |
| 100 µg/mL                              | 100       | 0         | 100 µg/mL            | 100       | 40        |
| 50 µg/mL                               | 100       | 0         | 50 µg/mL             | 100       | 40        |
| 25 µg/mL                               | 100       | 0         | 25 µg/mL             | 100       | 80        |
| <b>Fr 1</b>                            |           |           | <b>F3HEX</b>         |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 80        | 200 µg/mL            | 100       | 0         |
| 100 µg/mL                              | 100       | 60        | 100 µg/mL            | 100       | 0         |
| 50 µg/mL                               | 100       | 0         | 50 µg/mL             | 100       | 40        |
| 25 µg/mL                               | 100       | 0         | 25 µg/mL             | 40        | 20        |
| <b>Fr 2</b>                            |           |           | <b>F2BuOH</b>        |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 20        | 200 µg/mL            | 100       | 20        |
| 100 µg/mL                              | 100       | 60        | 100 µg/mL            | 100       | 40        |
| 50 µg/mL                               | 60        | 40        | 50 µg/mL             | 100       | 0         |
| 25 µg/mL                               | 80        | 20        | 25 µg/mL             | 60        | 20        |
| <b>Fr 3</b>                            |           |           | <b>F3BuOH</b>        |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 20        | 200 µg/mL            | 100       | 60        |
| 100 µg/mL                              | 100       | 40        | 100 µg/mL            | 80        | 40        |
| 50 µg/mL                               | 100       | 80        | 50 µg/mL             | 100       | 40        |
| 25 µg/mL                               | 100       | 0         | 25 µg/mL             | 80        | 0         |
| <b>Fr 4</b>                            |           |           | <b>Nirantina</b>     |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 0         | 200 µg/mL            | 80        | 80        |
| 100 µg/mL                              | 100       | 20        | 100 µg/mL            | 100       | 80        |
| 50 µg/mL                               | 80        | 20        | 50 µg/mL             | 100       | 80        |
| 25 µg/mL                               | 40        | 20        | 25 µg/mL             | 100       | 60        |
| <b>FH<sub>2</sub>O</b>                 |           |           | <b>Filantina</b>     |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 0         | 200 µg/mL            | 100       | 40        |
| 100 µg/mL                              | 60        | 20        | 100 µg/mL            | 60        | 20        |
| 50 µg/mL                               | 100       | 0         | 50 µg/mL             | 80        | 40        |
| 25 µg/mL                               | 80        | 20        | 25 µg/mL             | 40        | 40        |
| <b>FHEX</b>                            |           |           | <b>Hipofilantina</b> |           |           |
| 200 µg/mL                              | 100       | 0         | 200 µg/mL            | 60        | 20        |
| 100 µg/mL                              | 100       | 60        | 100 µg/mL            | 60        | 0         |
| 50 µg/mL                               | 100       | 80        | 50 µg/mL             | 100       | 0         |
| 25 µg/mL                               | 40        | 20        | 25 µg/mL             | 40        | 0         |
| <b>FBuOH</b>                           |           |           | <b>F + F + N</b>     |           |           |
| 200 µg/mL                              | 80        | 0         | 200 µg/mL            | 100       | 20        |
| 100 µg/mL                              | 80        | 20        | 100 µg/mL            | 80        | 0         |
| 50 µg/mL                               | 100       | 40        | 50 µg/mL             | 60        | 40        |
| 25 µg/mL                               | 80        | 0         | 25 µg/mL             | 60        | 0         |
| <b>F1HEX</b>                           |           |           |                      |           |           |
| 200 µg/mL                              | 80        | 40        |                      |           |           |
| 100 µg/mL                              | 100       | 20        |                      |           |           |
| 50 µg/mL                               | 40        | 0         |                      |           |           |
| 25 µg/mL                               | 60        | 20        |                      |           |           |

<sup>a</sup> Porcentagem relativa a 5 pares de vermes.

Durante o experimento realizado com nirantina, um fato que chamou a atenção foi a formação de protuberâncias semelhante a uma “vesícula de sangue”, na região das ventosas oral e ventral (Figura 52). Essa protuberância foi detectada entre 24 e 48 h de observação, em 65% dos 20 vermes fêmeas da placa de cultura exposta à nirantina. Dos vermes que formaram a “vesícula”, 15% estavam expostos às C1 (200 µg/mL), 15% a C2 (100 µg/mL), 25% a C3 (50 µg/mL) e 10% a C4 (25 µg/mL). Foi possível averiguar que o aparecimento dessas vesículas não influenciou na taxa de mortalidade dos vermes, uma vez que em contato com essa amostra, os mesmos permaneceram vivos durante todo o período de incubação. Nesse ensaio também não foi detectado a oviposição. Todo o grupo controle negativo se manteve íntegro ao fim das observações.

A lignana nirantina pode ter ocasionado alteração na digestão do sangue nos vermes fêmea e assim o aparecimento dessas “vesículas de sangue”. Outro fator que pode ser também levado em consideração é que Kassuya et al., 2006, demonstrou que essa lignana tem capacidade de interagir com o fator de agregação plaquetário (PAF).



**Figura 52:** Vermes fêmeas de *S. mansoni*. A) Fêmea do grupo controle negativo (sem adição de substâncias). B e C) Vermes fêmeas expostas à lignana nirantina. A seta em vermelho aponta para a “vesícula de sangue” formada na região das ventosas.

## 4.3 Análises dos ensaios *in vivo*

### **4.3 Testes *in vivo***

#### **4.3.1 Escolha das amostras para realização dos testes *in vivo***

O parâmetro da sobrevivência dos vermes foi utilizado como critério para avaliar as amostras quanto à atividade antiparasitária (*S. mansoni*) *in vitro*, e assim definir quais amostras seriam testadas *in vivo*. Os ensaios realizados *in vitro* mostraram que a F2BuOH foi 100% letal para os vermes em todas as concentrações testadas em menor tempo (48 h). Logo essa fração foi selecionada para a realização dos testes *in vivo*. A análise CG/EM da F2BuOH mostrou que ela possui lignanas (hipofilantina, filtetralina, filantina, nirantina e nirtetralina), então algumas dessas foram também testadas *in vivo*, porque a ação esquistossomicida encontrada na F2BuOH pode estar ligada a uma delas ou de um sinergismo entre elas. As lignanas testadas foram filantina + filtetralina + nirtetralina (F+F+N), filantina + nirantina (F+N) e nirantina.

#### **4.3.2 Ação da F2BuOH e lignanas sobre os vermes adultos de *S. mansoni***

Para os tratamentos realizados no 45º dia de infecção, o efeito da F2BuOH e lignanas sobre os vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliado por meio da administração oral dessas amostras (F2BuOH 100 e 200 mg/kg dose única e 100 mg/kg administrados em 3 dias consecutivos; filantina + filtetralina + nirtetralina, filantina + nirantina e nirantina, administradas em dose única na concentração de 100 mg/kg) em camundongos Balb/c, comparando-os com os controles positivo (PZQ 40 mg/kg) e negativo infectado e não tratado.

Nesse período de tratamento foi possível observar que houve diferença significativa no total de vermes recuperados do sistema porta-hepático e na quantidade de vermes encontrados acasalados dos grupos tratados com as lignanas em relação aos grupos controles negativo e positivo (PZQ). Conforme mostra a Tabela 14, o total de vermes recuperados/camundongo das lignanas foi: 17,1 (F + F + N), 13,3 (F + N) e 12,8 (nirantina), enquanto que o grupo controle negativo apresentou 29,6 vermes/camundongo e o PZQ 23 vermes/camundongo ( $p = 0,0003$ ). A quantidade de vermes recuperados ainda acasalados foi maior no grupo controle negativo (11,1

vermes) e positivo PZQ (8,6), já a quantidade de vermes acasalados encontrados no grupo das lignanas foi 6,4 (F + F + N), 4,8 (F + N) e 5,2 (nirantina) foi significativamente menor ( $p = 0,0064$ ).

No tratamento realizado no 60° dia de infecção, as amostras utilizadas foram as mesmas citadas anteriormente, mas a F2BuOH foi testada em uma única concentração de 100 mg/kg, administrados em dose única. A quantidade total de vermes recuperados da perfusão do sistema porta-hepático dos camundongos apresentou nível de significância estatística ( $p < 0,0001$ ), onde os grupos tratados com a F + N, F2BuOH apresentaram a menor quantidade de vermes recuperados, com média de 20,8 e 22,6 vermes/camundongo respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo recuperou média de 42,5 vermes/camundongo e o controle positivo (PZQ) 23,3 vermes/camundongo, como mostra a Tabela 16. O número de vermes encontrados acasalados foi significativamente maior para o grupo tratado com nirantina (17,5 vermes acasalados;  $p = 0,0004$ ), do que para os demais grupos tratados (F + F + N e F + N = 8,8; PZQ = 8,5 casais) e controle negativo (13 casais de vermes). A quantidade de vermes machos e fêmeas recuperados separados foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle negativo ( $p < 0,0001$ ). No grupo controle foram recuperados em média 9,6 machos e 6,9 fêmeas/camundongo, enquanto que com os grupos tratados com F2BuOH, F + N, nirantina e PZQ foram recuperados 1; 1,3; 1,3; 3,6 machos/camundongo e 1,3; 1,7; 1,3; 2,3 fêmeas/camundongo, respectivamente.

A partir do total de vermes e de vermes fêmeas encontradas acasaladas ou não, do grupo controle negativo e grupos tratados, foi possível calcular a taxa de redução do número de vermes e a taxa de redução do número de vermes fêmeas, e assim verificar qual amostra foi mais eficiente para este parâmetro.

Em relação ao número de vermes fêmeas recuperados dos grupos tratados no 45° dia de infecção, foi possível observar uma redução expressiva na quantidade de vermes fêmeas com as lignanas F + F + N (46,5%), F + N (56%) e nirantina (58,5%), quando comparadas ao grupo controle negativo (Figura 53). Nos tratamentos realizados no 60° dia de infecção, a redução do número de vermes fêmeas foi mais expressiva para o grupo tratado com F + N, que apresentou redução de 47,2%, em relação ao controle negativo como mostra a Figura 54.

As taxas de redução do número total de vermes dos grupos tratados no 45º dia de infecção variaram de 9,8 a 56,7%, como pode ser visto na Figura 55, sendo a maior porcentagem obtida com a nirantina (56,7%), seguido da filantina + nirantina (55%), F + F + N (42,2%). No 60º dia de infecção, as taxas de redução do número total de vermes variaram entre 11 e 50,8%, sendo que o grupo tratado com a filantina + nirantina (50,8%) foi o que apresentou maior taxa de redução, seguido do grupo tratado com a F2BUOH 100mg/kg (46,7%), como mostra a Figura 56.

**Tabela 15:** Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, recuperados do sistema porta-hepático. Tratamento aos 45 dias de infecção.

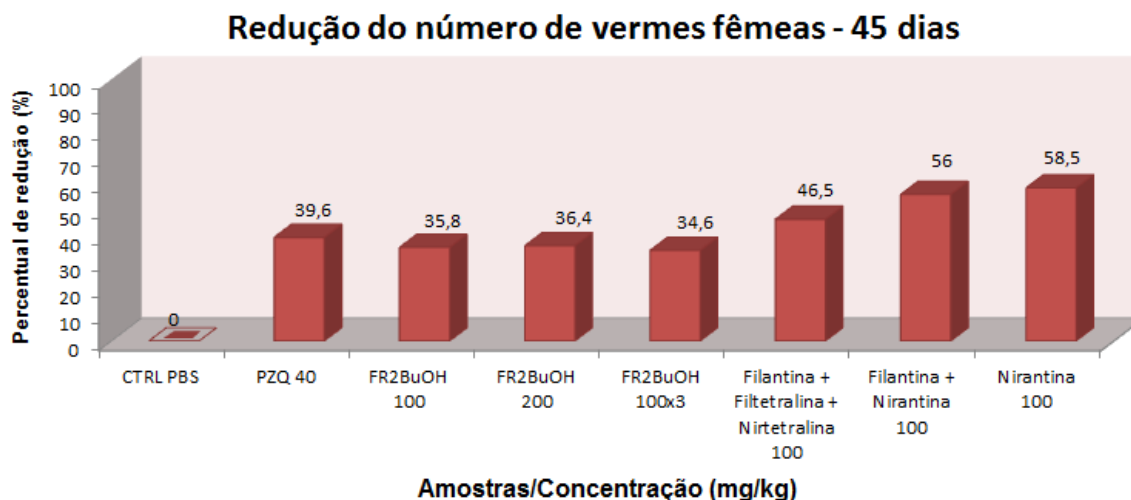
| 45 dias                         | Animais                  |                        |           |           |                         |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|-----------|-------------------------|
|                                 | tratados/<br>autopsiados | Casal                  | Macho     | Fêmea     | Total                   |
| Amostra/Concentração<br>(mg/kg) | n                        | $\bar{X}$              | $\bar{X}$ | $\bar{X}$ | $\bar{X}$               |
| CTRL PBS                        | 10/8                     | 11,1±1,94              | 2,5±0,90  | 4,8±1,70  | 29,6±5,06               |
| PZQ 40                          | 10/9                     | 8,6±1,29               | 4,6±1,29  | 1±0,44    | 23±2,74                 |
| F2BuOH 100                      | 10/10                    | 7,7±1,36               | 8,8±1,38  | 2,5±0,74  | 26,7±2,42               |
| F2BuOH 200                      | 10/10                    | 7,2±0,82               | 2,3±0,61  | 2,9±0,83  | 19,6±2,49               |
| F2BuOH 100x3                    | 10/9                     | 7,6±0,89               | 2±0,94    | 2,8±0,88  | 20,2±2,99               |
| F + F + N 100                   | 10/9                     | 6,4 <sup>a</sup> ±0,81 | 2,1±0,93  | 2,1±0,61  | 17,1 <sup>b</sup> ±2,74 |
| F + N 100                       | 10/10                    | 4,8 <sup>a</sup> ±0,80 | 1,5±0,50  | 2,2±0,94  | 13,3 <sup>b</sup> ±1,93 |
| Nirantina 100                   | 10/10                    | 5,2 <sup>a</sup> ±0,66 | 1±0,33    | 1,4±0,54  | 12,8 <sup>b</sup> ±1,20 |

Valores expressos em média ( $\bar{X}$ ) ± EP (erro padrão). CTRL: grupo controle negativo. PZQ: praziquantel. F2BuOH: fração 2 butanólica. F + F + N: Filantina + Filtetralina + Nirtetralina. F + N: Filantina + Nirantina. Diferença significativa entre o controle negativo e as amostras: <sup>a</sup>(p=0,0064); <sup>b</sup>(p = 0,0003).

**Tabela 16:** Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, recuperados do sistema porta-hepático. Tratamento aos 60 dias de infecção.

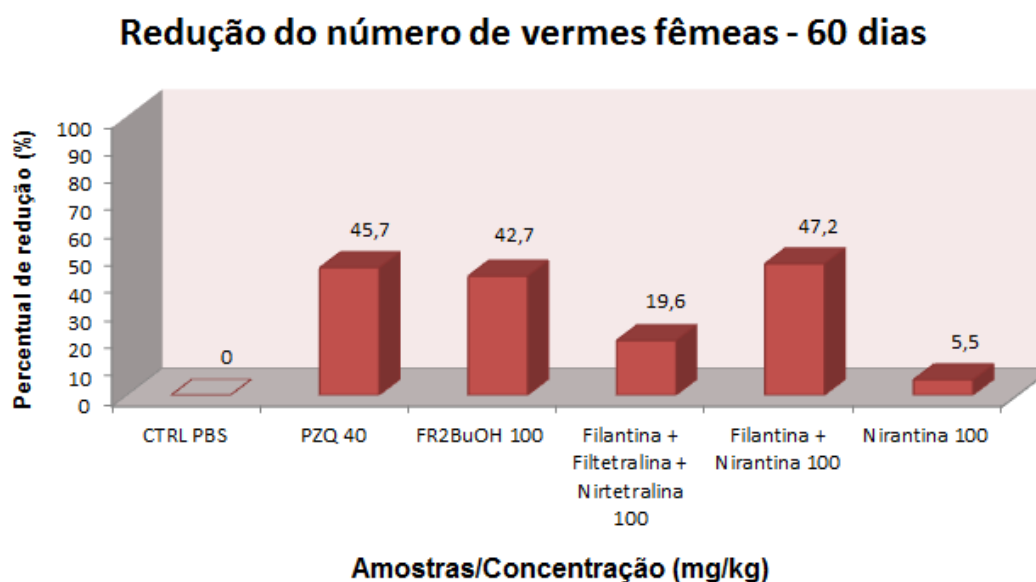
| 60 dias                         | Animais                  |                        |                        |                        |                         |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                                 | tratados/<br>autopsiados | Casal                  | Macho                  | Fêmea                  | Total                   |
| Amostra/Concentração<br>(mg/kg) | n                        | $\bar{X}$              | $\bar{X}$              | $\bar{X}$              | $\bar{X}$               |
| CTRL PBS                        | 10/10                    | 13±1,91                | 9,6±1,32               | 6,9±1,27               | 42,5±4,36               |
| PZQ 40                          | 10/8                     | 8,5 <sup>a</sup> ±0,77 | 3,6 <sup>b</sup> ±0,90 | 2,3 <sup>b</sup> ±0,80 | 23,3 <sup>b</sup> ±2,08 |
| F2BuOH 100                      | 10/8                     | 10,1±1,04              | 1 <sup>b</sup> ±0,37   | 1,3 <sup>b</sup> ±0,41 | 22,6 <sup>b</sup> ±1,68 |
| F + F + N 100                   | 10/8                     | 8,8 <sup>a</sup> ±1,30 | 6,2±0,79               | 7,2±1,16               | 31,2±3,43               |
| F + N 100                       | 10/8                     | 8,8 <sup>a</sup> ±0,93 | 1,3 <sup>b</sup> ±0,37 | 1,7 <sup>b</sup> ±0,49 | 20,8 <sup>b</sup> ±2,15 |
| Nirantina 100                   | 10/6                     | 17,5±1,33              | 1,5 <sup>b</sup> ±0,84 | 1,3 <sup>b</sup> ±0,71 | 37,8±2,95               |

Valores expressos em média ( $\bar{X}$ ) ± EP (erro padrão). CTRL: grupo controle negativo. PZQ: praziquantel. F2BuOH: fração 2 butanólica. F + F + N: Filantina + Filtetralina + Nirtetralina. F + N: Filantina + Nirantina. Diferença significativa entre o controle negativo e as amostras: <sup>a</sup>(p=0,0004); <sup>b</sup>(p<0,0001).



**Figura 53:** Taxa de redução do número de vermes fêmeas recuperadas do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.

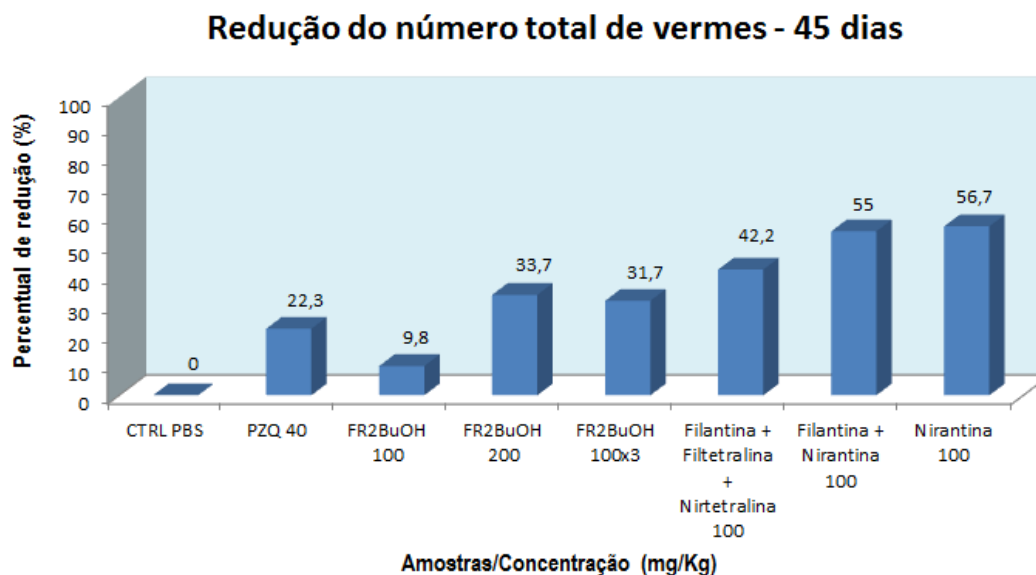
\* Para o cálculo da redução do número de vermes fêmea foi somado o número de vermes fêmeas encontradas acasaladas e não acasaladas, dos grupos tratados e não tratados.



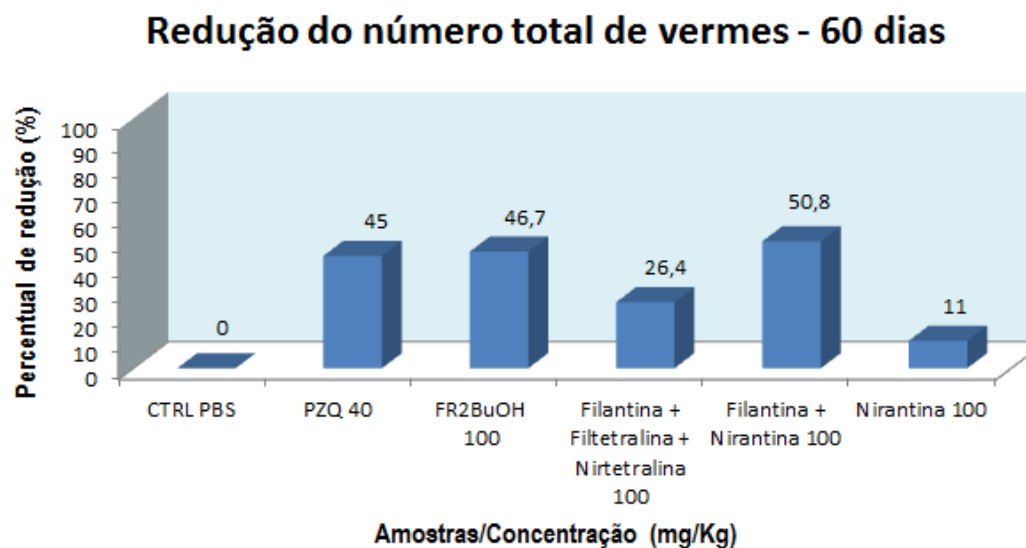
**Figura 54:** Taxa de redução do número de vermes fêmeas recuperadas do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.

\* Para o cálculo da redução do número de vermes fêmea foi somado o número de vermes fêmeas encontradas acasaladas e não acasaladas, dos grupos tratados e não tratados.





**Figura 55:** Taxa de redução do número total de vermes recuperados do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.



**Figura 56:** Taxa de redução do número total de vermes recuperados do sistema porta-hepático, em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.

### **4.3.3 Ação da F2BuOH e lignanas sobre a oviposição dos vermes adultos de *S. mansoni***

O efeito da F2BuOH e lignanas sobre a oviposição de *S. mansoni* foi avaliada pela quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) utilizando-se a técnica de Kato-Katz e pelo método do oograma, que permite a contagem e classificação dos estágios de desenvolvimento dos ovos encontrados em porção intestinal do camundongo. Esses dados foram relacionados com o fármaco padrão para o tratamento da esquistossomose, o PZQ 40 mg/kg, e grupo controle negativo não tratado.

Em relação à OPG dos grupos tratados aos 45 dias de infecção, todos os tratamentos realizados diferiram estatisticamente do grupo controle negativo (1116,2 ovos/grama de fezes;  $p=0,0003$ ) e positivo tratado com o PZQ 40 mg/kg (1364,1 ovos/grama de fezes). Os grupos tratados com as lignanas nirantina (108,4 ovos/grama de fezes), F+F+N (230 ovos/grama de fezes) e F+N (403,8 ovos/grama de fezes) foram os que apresentaram menor quantidade de ovos por grama de fezes em relação ao grupo controle negativo, nessa ordem, conforme mostra a Tabela 17.

Nos grupos tratados aos 60 dias de infecção, a significância estatística também foi observada entre todos os grupos tratados e o grupo controle negativo. O efeito mais acentuado foi obtido nos animais tratados com a F2BuOH e F+N, uma vez que a quantidade de ovos/grama de fezes encontrada foi de 51 e 396,2 ( $p=0,0004$ ), respectivamente, enquanto que o controle negativo apresentou 3182,6 ovos/grama de fezes (Tabela 17).

De acordo com o número de ovos contados através do método Kato-Katz, nos grupos tratados e controles negativo e positivo, foi possível calcular a taxa de redução do número de ovos e assim verificar a eficiência dos tratamentos realizados em relação a postura de ovos pelos animais. Nos grupos tratados aos 45 dias de infecção as taxas de redução de ovos variaram de 41,1 a 90,3%, sendo os resultados mais significativos obtidos com a nirantina (90,3%), F+F+N (79,4%) e F+N (63,8%), em contraste o PZQ não apresentou redução no número de ovos, conforme mostra a Figura 57. Já para os animais tratados aos 60 dias de infecção, a taxa de redução do número de ovos variou entre 61,4% e 98,3%, como pode ser visualizado na Figura 58. O grupo tratado com a F2BuOH (98,3%) foi o que apresentou maior eficiência para esse parâmetro, seguido

da F+N (87,5%), nirantina (77,8%) e F+F+N (61,4%), enquanto que o PZQ apresentou taxa de redução de ovos de 53,5%.

A análise dos oogramas realizada nos camundongos submetidos à tratamento no 45º dia de infecção, mostrou que apenas o estágio de desenvolvimento de ovos imaturos apresentou diferença significativa entre o grupo controle negativo (111,6 ovos;  $p < 0,0001$ ), PZQ (86,7 ovos) e grupos tratados com F2BuOH 200 mg/kg (35,9 ovos), F2BuOH 100mg/kg/3 dias (23,4 ovos), F+N (31,2 ovos), F+F+N (21,7 ovos) e nirantina (14 ovos), como mostra a Figura 59.

Apenas o tratamento feito com a F2BuOH 100mg/kg não diferiu significativamente do grupo controle negativo para o número de ovos imaturos no oograma, nesse período. Em relação ao oograma dos grupos tratados no 60º dia de infecção houve diferença significativa para todos os estágios de desenvolvimento dos ovos entre os grupos tratados e o controle negativo. Para a quantidade de ovos imaturos houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) dos grupos controle negativo (132,8 ovos) e positivo tratado com PZQ 40 mg/kg (81,1 ovos) com os grupos tratados com a F2BuOH (26,6 ovos), F+N (28 ovos), F+F+N (30 ovos) e nirantina (42 ovos), conforme se ver na Figura 60. Analisando o número de ovos maduros encontrados nos grupos desse período de tratamento, percebeu-se que os grupos tratados com F+N (28,13 ovos) e F2BuOH (28 ovos) apresentaram a menor quantidade de ovos maduros em relação ao controle negativo (65,3 ovos) e positivo tratado com o PZQ (75,1 ovos), ( $p < 0,0001$ ). Comparando-se os diferentes tratamentos na quantidade de ovos mortos, foi constatado que o grupo tratado com nirantina apresentou maior quantidade de ovos mortos (26,3 ovos;  $p < 0,0001$ ), enquanto que o grupo controle negativo e o PZQ tiveram apenas 3,6 e 7,5 ovos mortos, respectivamente.

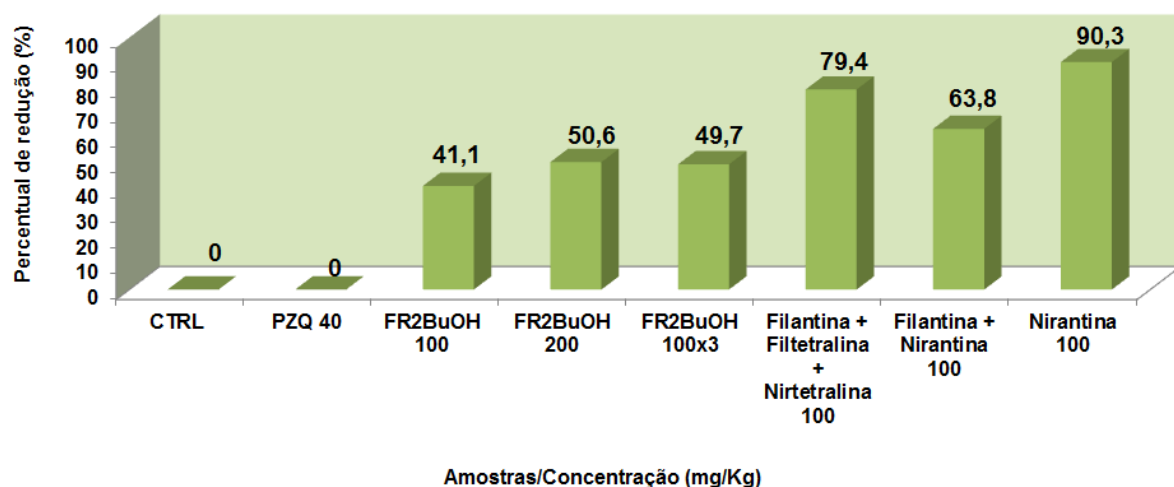
Fazendo a relação entre os dois períodos de tratamento (45 e 60 dias após a infecção) para o parâmetro do oograma, percebeu-se que apenas a variável ovos mortos, mostrou-se significativamente diferente entre as substâncias testadas.

**Tabela 17:** Efeito da F2BuOH e lignanas sobre a quantidade de ovos eliminados nas fezes de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 e 60 dias de infecção.

| 45 dias                         | OPG                | 60 dias                         | OPG                 |
|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------|
| Amostra/Concentração<br>(mg/kg) | $\bar{X}$          | Amostra/Concentração<br>(mg/kg) | $\bar{X}$           |
| CTRL                            | 1116,2             | CTRL                            | 3182,6              |
| PZQ 40                          | 1364,1             | PZQ 40                          | 1478,1 <sup>b</sup> |
| F2BuOH 100                      | 656,9              | F2BuOH 100                      | 51 <sup>b</sup>     |
| F2BuOH 200                      | 551,5 <sup>a</sup> | F + F + N 100                   | 1226,3 <sup>b</sup> |
| F2BuOH 100x3                    | 561,3 <sup>a</sup> | F + N 100                       | 396,2 <sup>b</sup>  |
| F + F + N 100                   | 230 <sup>a</sup>   | Nirantina 100                   | 704,7 <sup>b</sup>  |
| F + N 100                       | 403,8 <sup>a</sup> |                                 |                     |
| Nirantina 100                   | 108,4 <sup>a</sup> |                                 |                     |

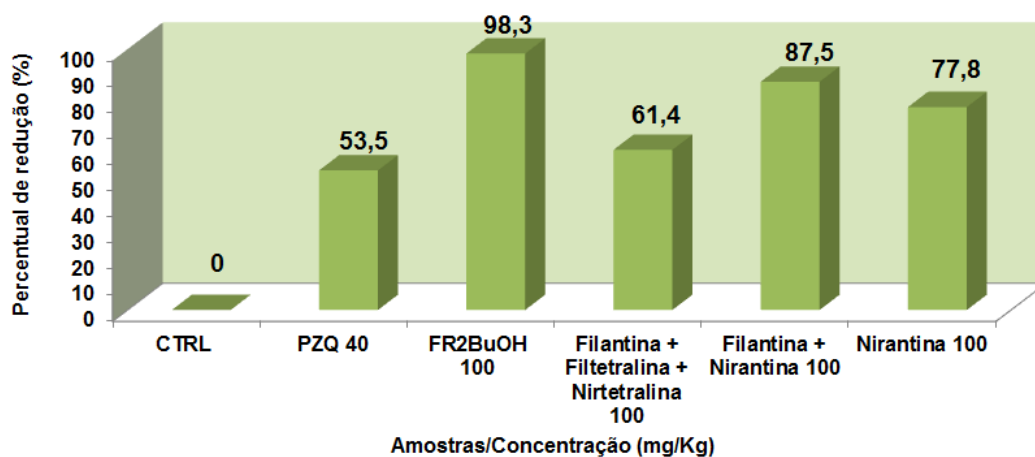
OPG: ovos por grama de fezes.  $\bar{X}$  : média. CTRL: grupo controle negativo. PZQ: praziquantel. F2BuOH: fração 2 butanólica. F + F + N: Filantina + Filtetralina + Nirtetralina. F + N: Filantina + Nirantina. Diferença significativa entre o controle negativo e as amostras: <sup>a</sup>(p=0,0003); <sup>b</sup>(p=0,0004).

### Redução do número de ovos - 45 dias

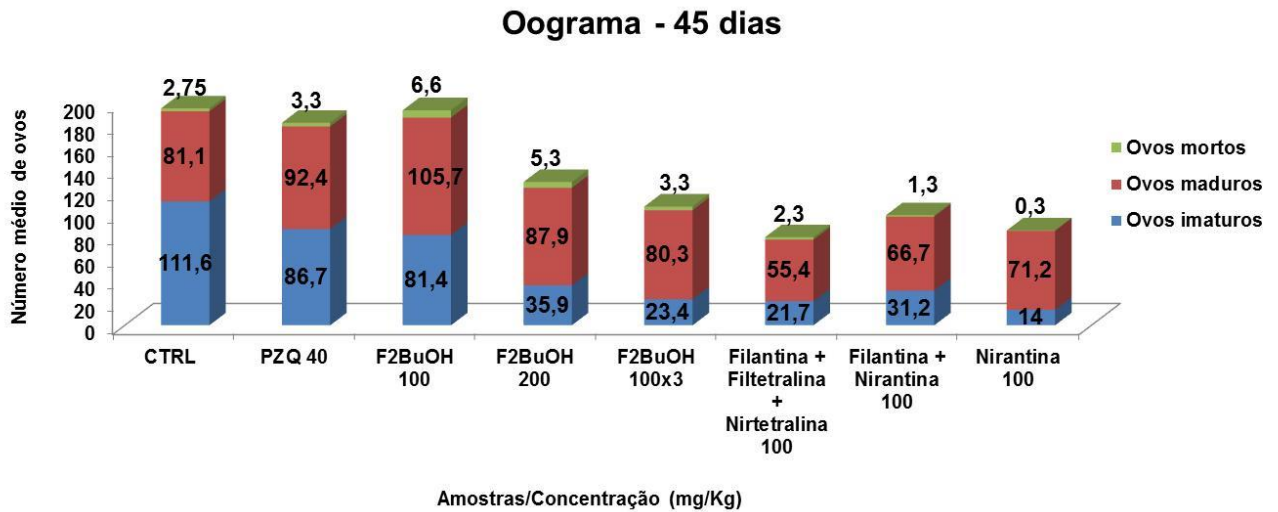


**Figura 57:** Taxa de redução do número de ovos em relação ao grupo controle negativo, após 45 dias de infecção.

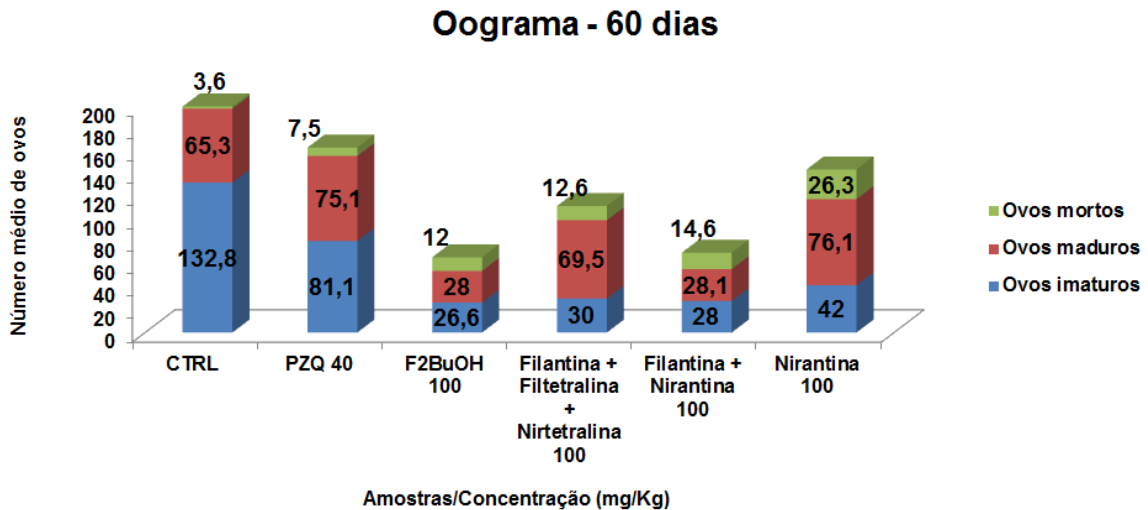
### Redução do número de ovos - 60 dias



**Figura 58:** Taxa de redução do número de ovos em relação ao grupo controle negativo, após 60 dias de infecção.



**Figura 59:** Avaliação da ação da F2BuOH e lignanas sobre a viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, comparadas com a do grupo controle negativo (não tratado) e com o praziquantel. Tratamento realizado no 45° dia de infecção.



**Figura 60:** Avaliação da ação da F2BuOH e lignanas sobre a viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, comparadas com a do grupo controle negativo (não tratado) e com o praziquantel. Tratamento realizado no 60° dia de infecção.

#### 4.3.4 Ação da F2BuOH e lignanas sobre os granulomas hepáticos

As reações granulomatosas hepáticas, produzidas ao redor dos ovos de *S. mansoni* retidos no tecido hepático foram avaliadas através de cortes histológicos.

Observou-se que no tratamento realizado no 45° dia de infecção, as lignanas F+N (36 granulomas) e nirantina (38 granulomas) foram as lignanas que diferiram significativamente ( $p < 0,0003$ ) na quantidade de granulomas em relação aos grupos controle negativo (84 granulomas) e positivo PZQ (74 granulomas), como mostra a Tabela 18. Já nos grupos tratados no 60° dia de infecção, o tratamento feito com F+N (70 granulomas) foi o mais efetivo em relação ao controle negativo (125 granulomas;  $p < 0,0002$ ), não havendo diferença significativa dessa amostra com o controle positivo PZQ (80 granulomas).

Em relação às medidas dos diâmetros maior e menor dos granulomas, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados e os controles negativo (PBS) e positivo (PZQ), nos dois períodos de tratamento em questão (45 e 60 dias após a infecção).

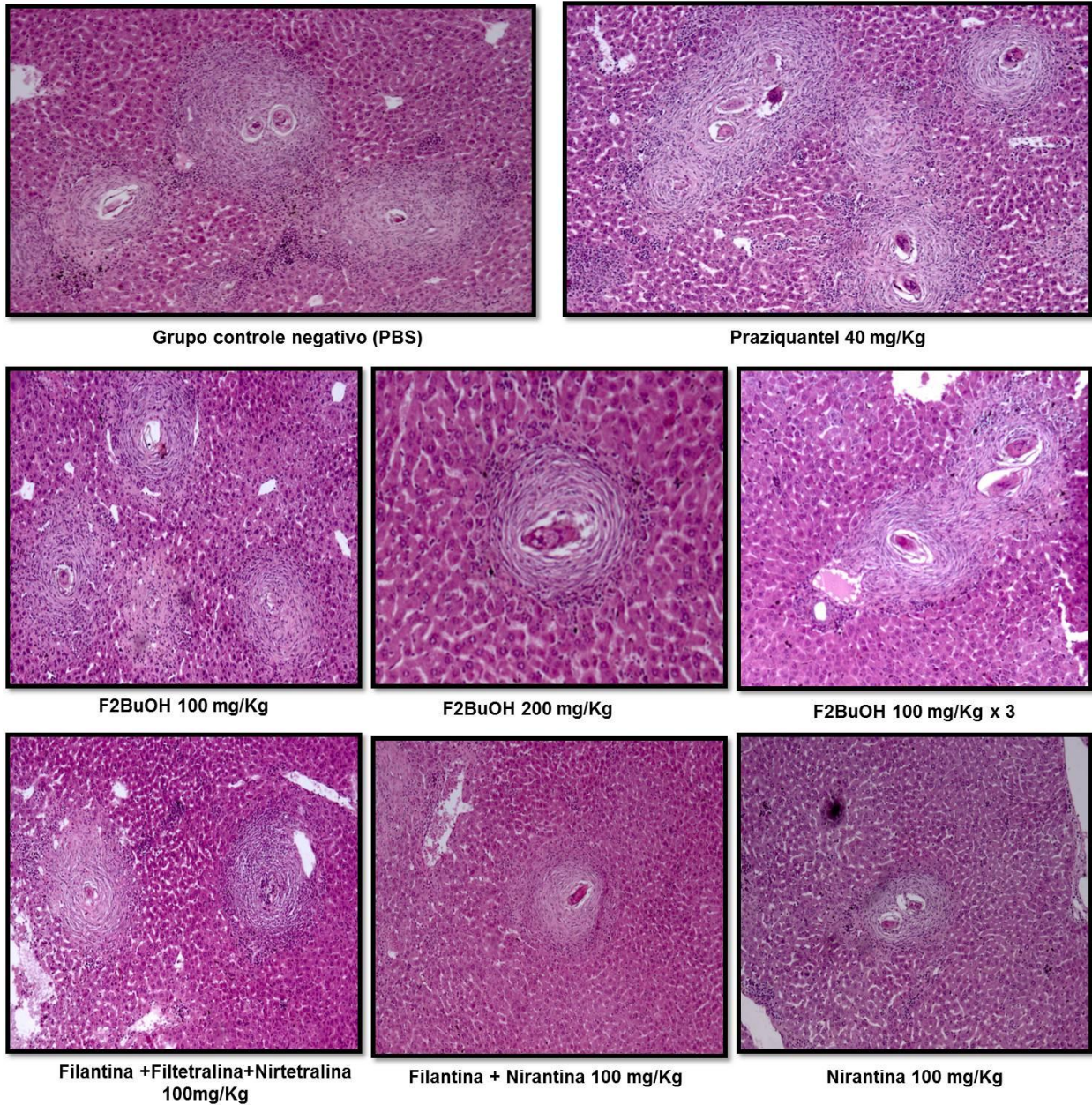
Nos dois períodos de tratamento foi possível observar na maioria dos cortes histológicos formação de granulomas com vários ovos na região central, conforme pode ser visto nas Figuras 61 e 62.

**Tabela 18:** Ação da F2BuOH e lignanas no tamanho dos granulomas hepáticos.

| Amostra/<br>Concentração<br>(mg/kg) | 45 dias                        |  |  | 60 dias                             |                                |  |  |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|--|-------------------------------------|--------------------------------|--|--|
|                                     | Quantidade<br>de<br>granulomas | Diâmetro<br>maior<br>( $\mu\text{m}$ ) | Diâmetro<br>menor<br>( $\mu\text{m}$ ) | Amostra/<br>Concentração<br>(mg/kg) | Quantidade<br>de<br>granulomas | Diâmetro<br>maior<br>( $\mu\text{m}$ ) | Diâmetro<br>menor<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|                                     |                                | $\bar{X}$                              | $\bar{X}$                              |                                     |                                | $\bar{X}$                              | $\bar{X}$                              |
| <b>CTRL</b>                         | 84                             | 319,7                                  | 245,2                                  | <b>CTRL</b>                         | 125                            | 273,8                                  | 218,1                                  |
| <b>PZQ 40</b>                       | 74                             | 327                                    | 268,5                                  | <b>PZQ 40</b>                       | 80                             | 277,3                                  | 240,9                                  |
| <b>F2BuOH 100</b>                   | 74                             | 324,5                                  | 255,8                                  | <b>F2BuOH 100</b>                   | 102                            | 286,5                                  | 221,8                                  |
| <b>F2BuOH 200</b>                   | 48                             | 298,8                                  | 255,3                                  | <b>F + F + N 100</b>                | 103                            | 292,1                                  | 229,8                                  |
| <b>F2BuOH 100x3</b>                 | 59                             | 318,6                                  | 238,5                                  | <b>F + N 100</b>                    | 70                             | 289,8                                  | 222,6                                  |
| <b>F + F + N 100</b>                | 60                             | 308,7                                  | 250,4                                  | <b>Nirantina 100</b>                | 96                             | 276,1                                  | 215,8                                  |
| <b>F + N 100</b>                    | 36                             | 287,7                                  | 245,9                                  |                                     |                                |  |  |
| <b>Nirantina 100</b>                | 38                             | 271,7                                  | 215,4                                  |                                     |                                |  |  |

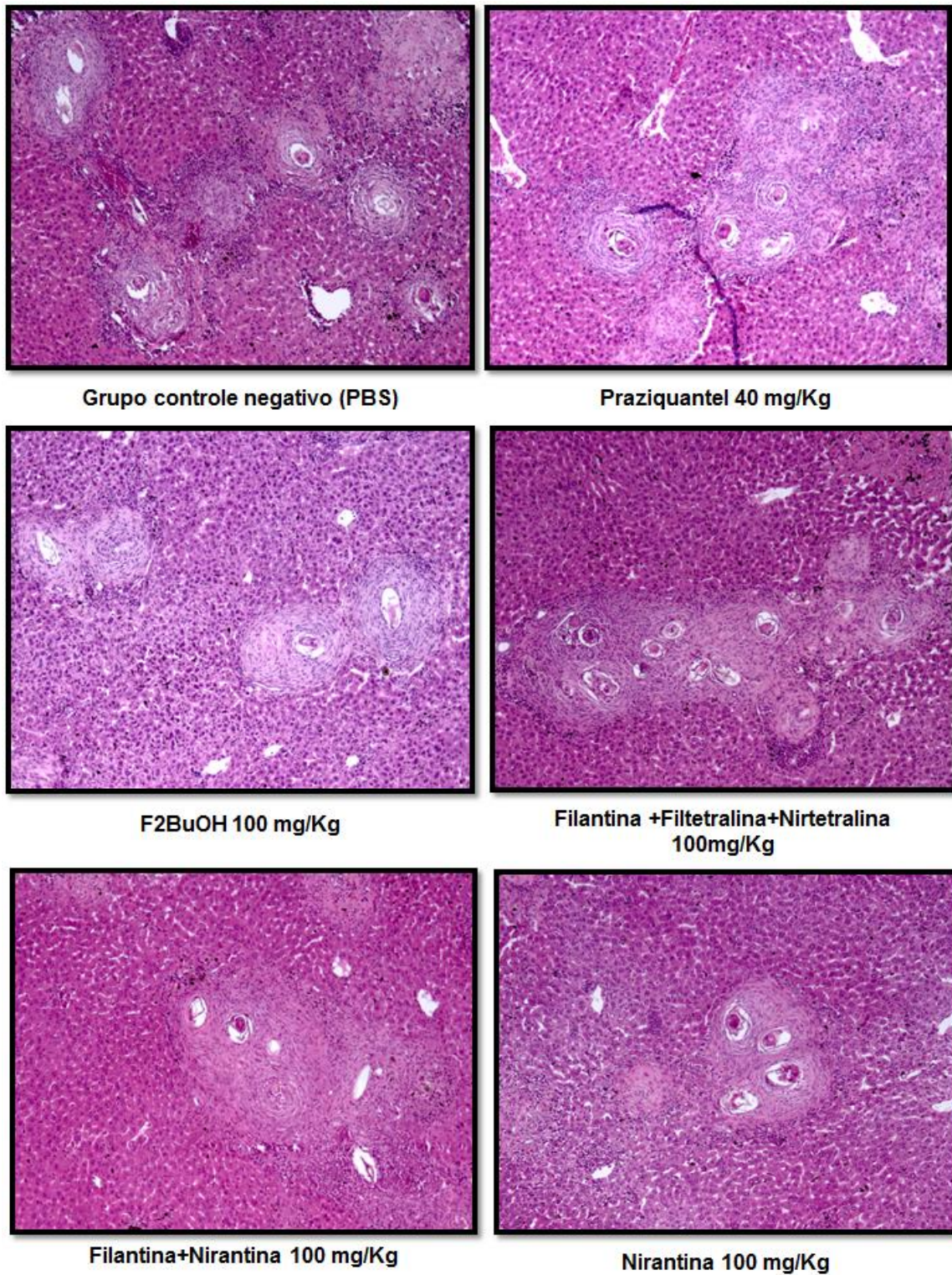
$\bar{X}$  : média. CTRL: grupo controle negativo. PZQ: praziquantel. F2BuOH: fração 2 butanólica. F + F + N: Filantina+Filtetralina+Nirtetralina. F+N:Filantina+Nirantina.





**Figura 61:** Granulomas hepáticos dos tratamentos realizados no 45º dia de infecção com as amostras da F2BuOH 100 mg/kg, F2BuOH 200 mg/kg, F2BuOH 100 mg/kg/3 dias consecutivos, F+F+N 100 mg/kg, F+N 100 mg/kg, Nirantina 100 mg/kg e os grupos controle negativo (PBS) e positivo tratado com PZQ. Escala: 100 µm. Coloração HE. Aumento: 10X.





**Figura 62:** Granulomas hepáticos dos tratamentos realizados no 60º dia de infecção com as amostras da F2BuOH 100 mg/kg, F+F+N 100 mg/kg, F+N 100 mg/kg, Nirantina 100 mg/kg e os grupos controle negativo (PBS) e positivo tratado com PZQ. Escala: 100 µm. Coloração HE. Aumento: 10x.

#### **4.3.5 Ação da F2BuOH e lignanas sobre o tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* após os ensaios *in vivo***

A ação das amostras sobre o tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV foi realizada nos vermes coletados dos camundongos tratados no 45º dia de infecção. As imagens obtidas foram comparadas com as dos vermes recuperados de animais do grupo controle negativo não tratado e grupo controle positivo tratado com PZQ 40 mg/kg. As alterações tegumentares foram vistas em todos os vermes machos dos grupos tratados, enquanto que nos vermes fêmeas apenas o grupo tratado com a F2BuOH na concentração de 200 mg/kg apresentou algum tipo de alteração.

No grupo controle negativo, percebe-se que o verme macho adulto é mais largo, menor e possui o tegumento mais complexo do que o verme fêmea, que é mais fina, maior e apresenta um tegumento mais simples (Figura 63 – A). O verme macho possui uma fenda longitudinal em seu corpo, canal ginecóforo, onde a fêmea fica acasalada durante a cópula (Figura 63 – B). A superfície dorsal do verme fêmea é recoberta por espinhos (Figura 63 – C), enquanto que o tegumento do verme macho possui numerosas protuberâncias, denominadas de tubérculos recobertos de espinhos (Figuras 63 – B; D). A região anterior de ambos os sexos de *S. mansoni* são semelhantes, sendo caracterizadas pela presença de uma ventosa oral e ventral (Figuras 63 – E; F).

A Figura 64 A-D retrata a MEV dos vermes recuperados de animais tratados com a F2BuOH 100 mg/kg, mostrando que houve o enrugamento da ventosa ventral (Figura 64 – A), e uma extensa área do tegumento com descamação, destruição de tubérculos e perda de seus espinhos também foi visível nessa área (Figuras 64 – A,B, D). Entre os tubérculos pôde-se perceber a formação de inúmeras vesículas, conforme mostra a Figura 64 – C.

Conforme pode ser visto na Figura 65 – A, os vermes machos recuperados de animais tratados com a F2BuOH 200 mg/kg tiveram toda a camada tegumentar destruída, havendo erosões por todo o tegumento. A figura 65 – B mostra a imagem ampliada de tubérculos que sofreram rompimento e perda de espinhos. Além disso, também houve a formação de pequenas vesículas na região entre as ventosas, Figura

65 – C. Os vermes fêmeas desse grupo apresentaram alteração, como o enrugamento do tegumento na região anterior e perda de espinhos (Figura 65 – D).

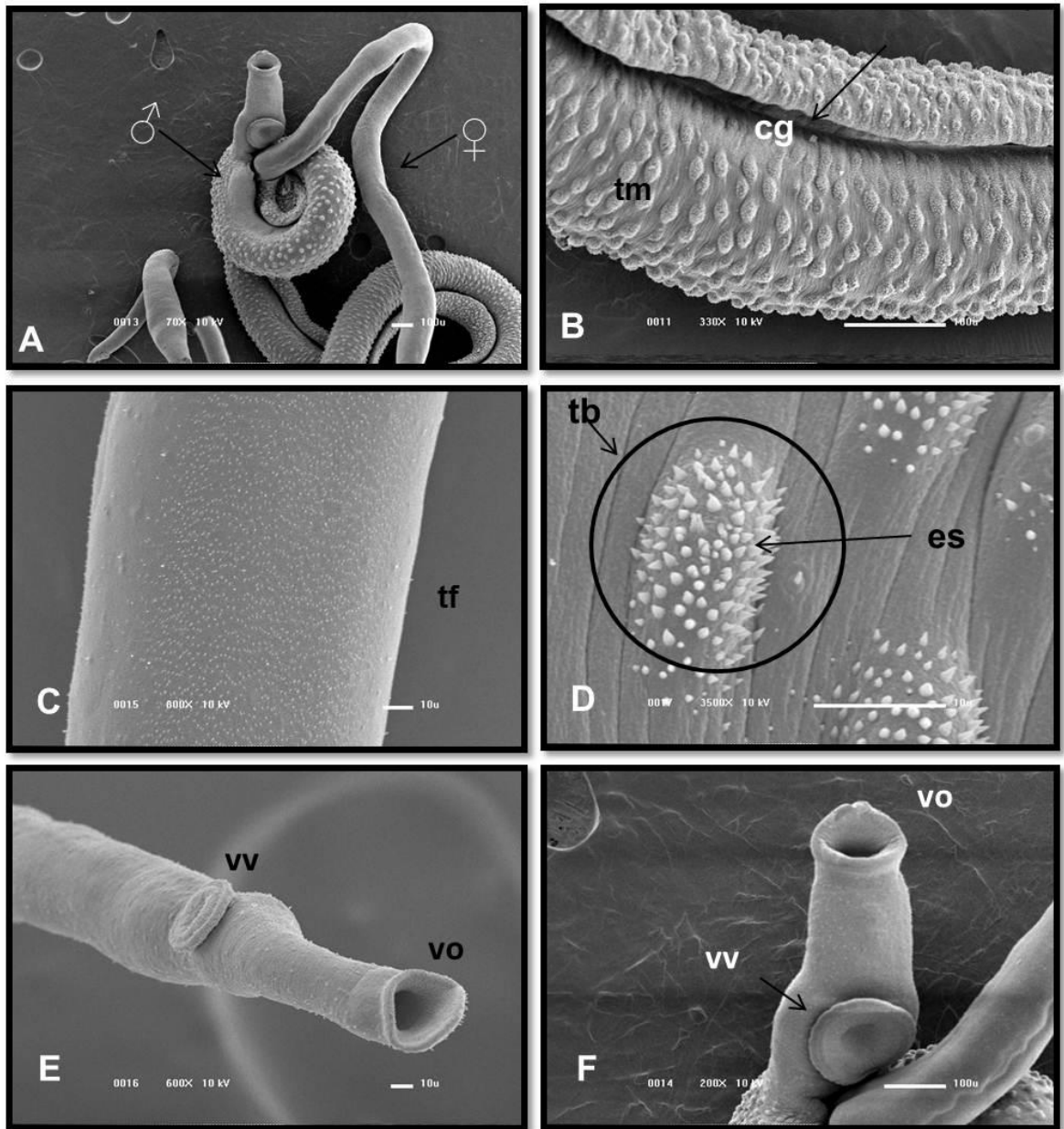
A Figura 66 (A-F) mostra a ação da F2BuOH 100 mg/kg/ 3 dias consecutivos nos vermes machos recolhidos de camundongos tratados com essa fração. A região do canal ginecóforo apresentou perfurações (Figura 66 – A) e a região dorsal do tegumento sofreu descamação, havendo destruição e rompimento de tubérculos (Figura 66 B, C), além da formação de um grande número de vesículas e deformação tegumentar com o aparecimento de protuberâncias (Figura 66 – D, E). Na região das ventosas foi visível um inchaço e contração da ventosa ventral como pode ser visto na Figura 66 – F.

O grupo tratado com F+N 100 mg/kg no 45° dia de infecção, apresentou no tegumento dos vermes machos a formação de protuberâncias, além de numerosas vesículas entre os tubérculos e na região da ventosa ventral, a qual sofreu contração (Figuras 67 – A, B, C). A Figura 67 – D, E, F, mostra as alterações sofridas pelos vermes do grupo tratado com F+F+N 100 mg/kg no 45° dia de infecção. Foi possível observar a contração das ventosas oral e ventral (Figura 67 – D), perfurações, descamação e formação de inúmeras vesículas foram visualizadas nessa região (Figura 67 – E), essas mesmas vesículas também foram encontradas na região dorsal do tegumento do verme macho (Figura 67 – F).

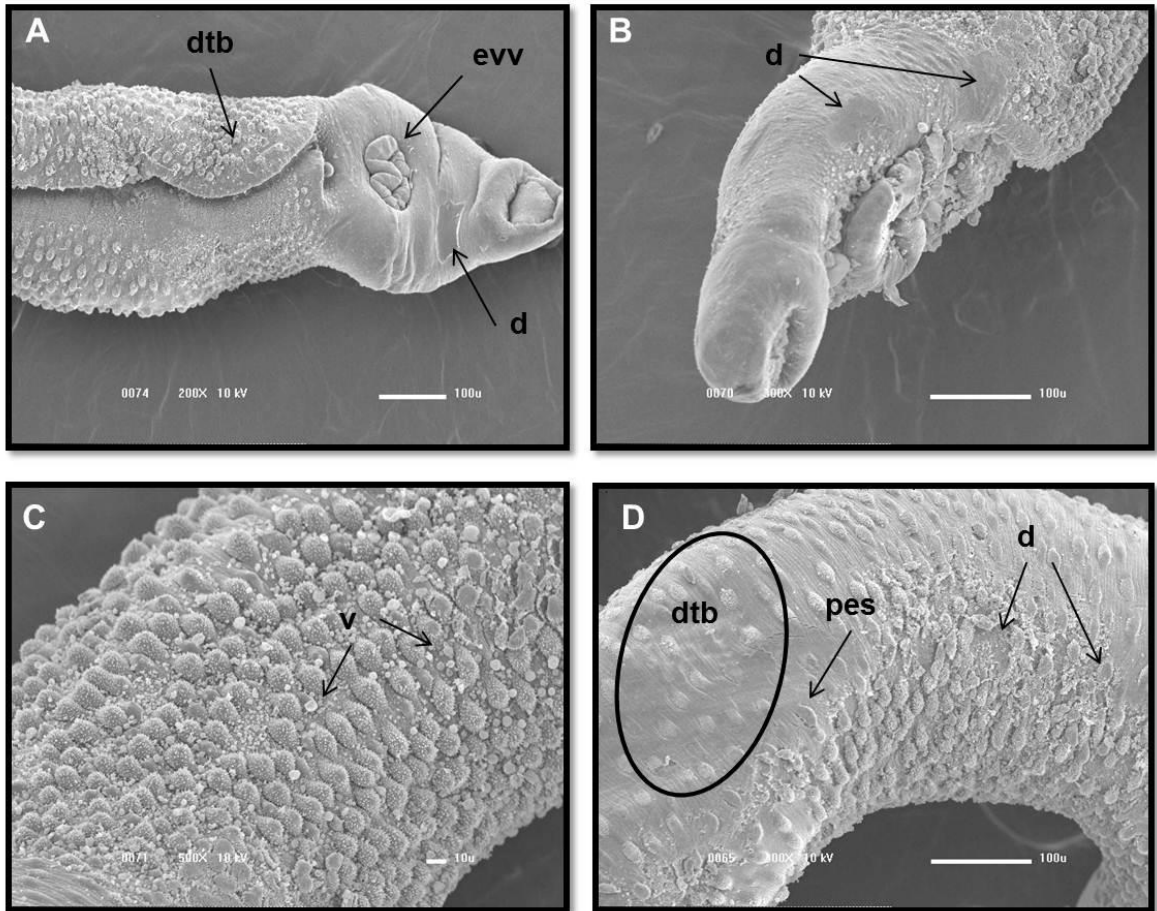
Os vermes machos do grupo tratado com nirantina 100 mg/kg no 45° dia de infecção apresentaram descamação na porção final da região anterior do verme (Figura 68 – A). A região do canal ginecóforo apresentou tubérculos com perda de espinhos e enrugamento do tegumento (Figura 68 – B). Houve formação de vesículas entre os tubérculos e percebeu-se inchaço e contração da ventosa oral (Figura 68 – C, D). A Figura 68 – E, mostra verme fêmea sem alterações, com a região das ventosas totalmente íntegra, sem formação de “vesículas” como foi visualizado nos testes *in vitro*.

Ação do PZQ sobre o tegumento dos vermes machos adultos de *S. mansoni* não foi tão severa como visto anteriormente com os demais tratamentos, podendo ser visto apenas alguns tubérculos com perda de espinhos e leucócitos do hospedeiro aderidos ao tegumento do verme (Figura 69).

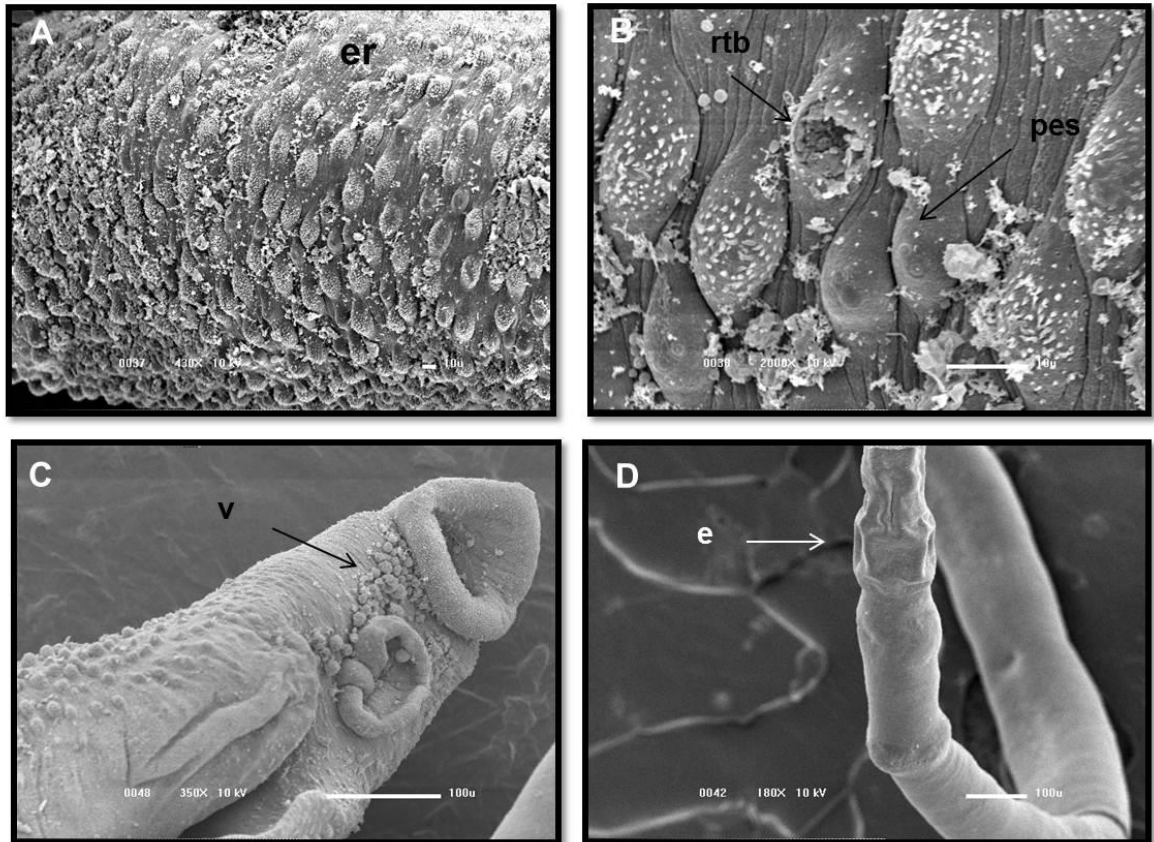




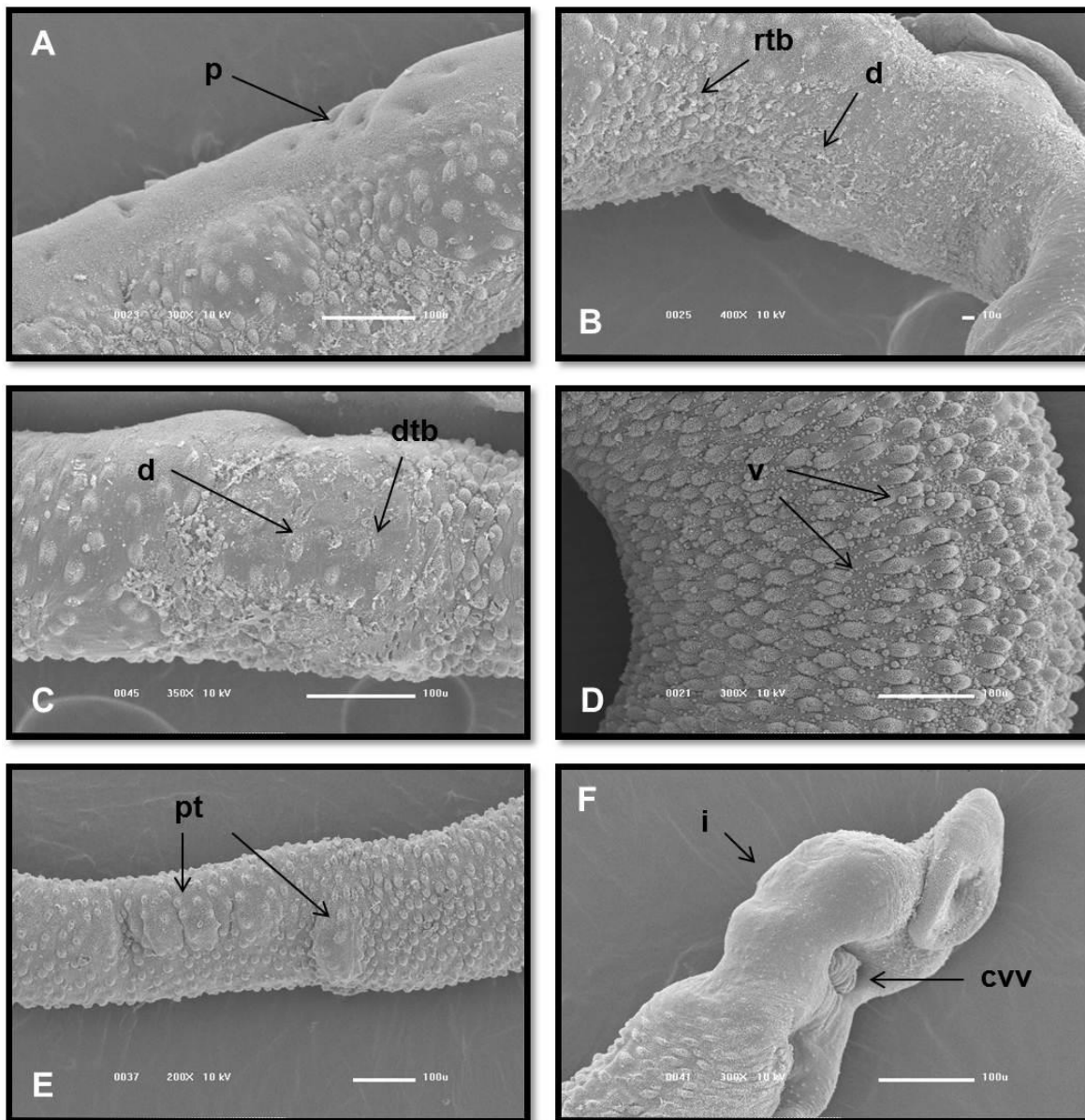
**Figura 63:** Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle negativo não tratado. (A-F) Grupo controle negativo não tratado. (A) vermes macho e fêmea acasalados. (B) (cg) - canal ginecóforo do verme macho; (tm) tegumento íntegro do verme macho. (es) espinhos presentes nos tubérculos. (C) tegumento do verme fêmea (tf). (D) tubérculo do tegumento do verme macho (tb) – imagem ampliada; (E) ventosas oral (vo) e ventral (vv) do verme fêmea. (F) ventosas oral (vo) e ventral (vv) do verme macho.



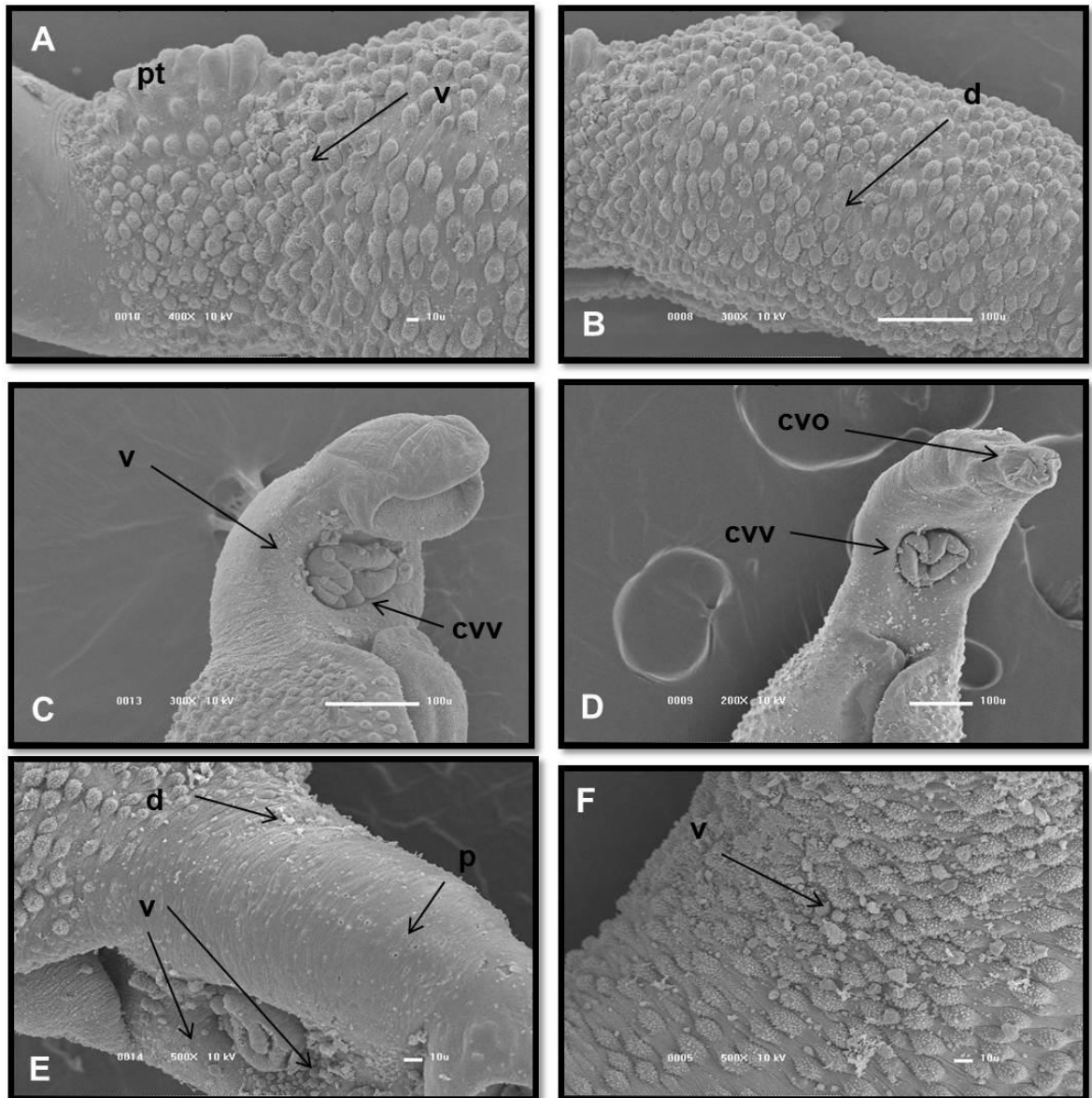
**Figura 64:** Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com a F2BuOH 100mg/kg no 45º dia de infecção. (A) verme macho apresentando destruição de tubérculos (dtb), enrugamento da ventosa ventral (evv) e descamação (d) do tegumento na região entre as ventosas. (B) verme macho com descamação (d) do tegumento. (C) pode ser observada formação de vesículas (v) entre os tubérculos. (D) tegumento do verme macho com destruição de tubérculos (dtb), perda de espinhos (pes) e descamação (d).



**Figura 65:** Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com a F2BuOH 200 mg/kg no 45º dia de infecção. (A) tegumento do verme macho com erosões (er). (B) tegumento do verme macho com rompimento de tubérculos (rtb) e perda de espinhos (pes). (C) formação de vesículas (v) na região das ventosas. (D) enrugamento (e) do tegumento do verme fêmea e perda de espinhos.

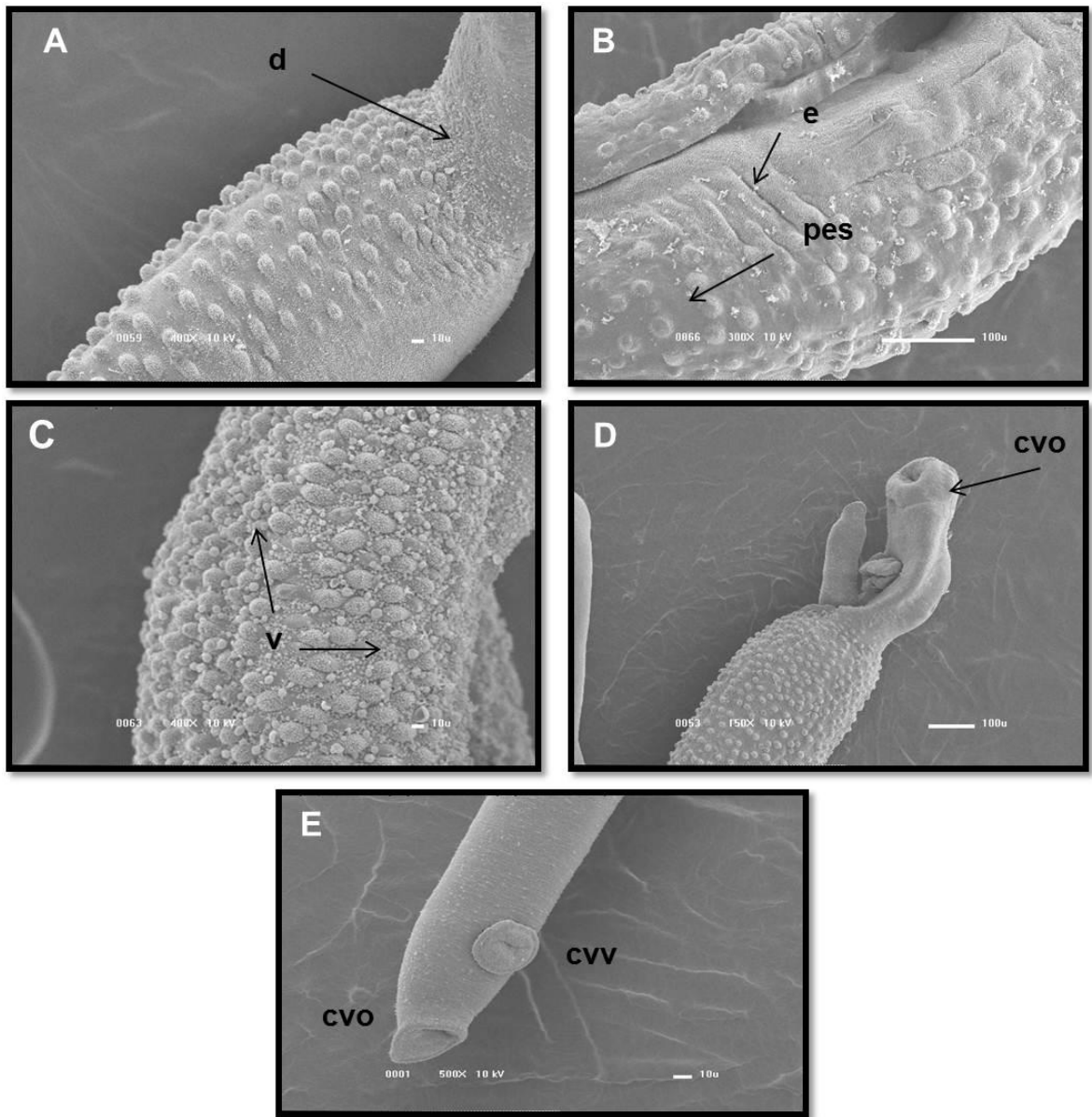


**Figura 66:** Microscopia eletrônica de varredura do grupo tratado com F2BuOH 100 mg/kg/ 3 dias consecutivos no 45º dia de infecção. (A) região do canal ginecóforo apresentando perfurações (p). (B) rompimento de tubérculos (rtb) e descamação (d) no tegumento do verme macho. (C) descamação (d) e destruição de tubérculos (dtb). (D) pode ser observada formação de inúmeras vesículas (v). (E) formação de protuberâncias (pt) no tegumento. (F) contração da ventosa ventral (cvv) e inchaço (i) da região das ventosas.

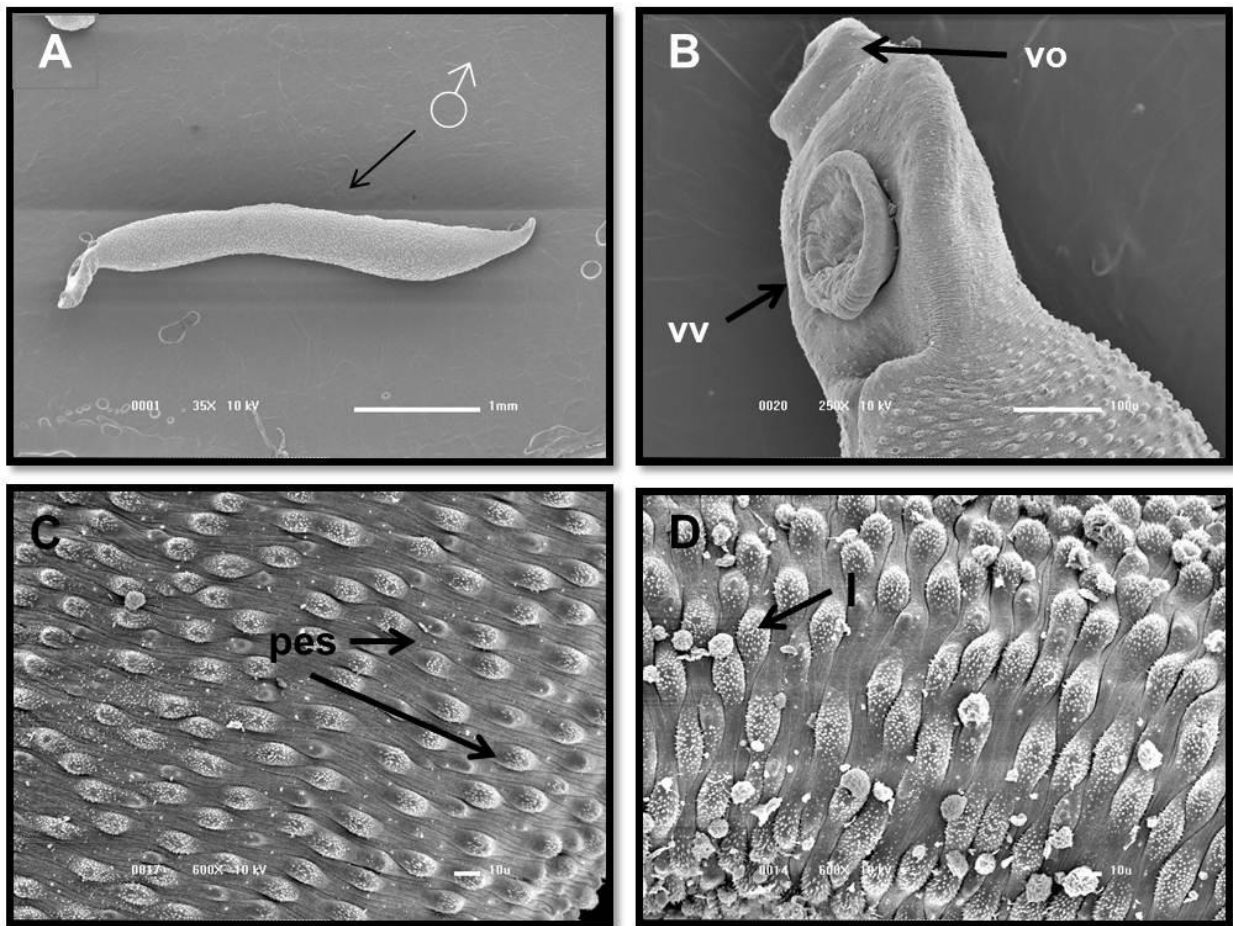


**Figura 67:** Microscopia eletrônica de varredura dos grupos tratados com filantina+nirantina 100 mg/kg e filantina + fildetralina + nirtetralina 100mg/kg no 45º dia de infecção. (A-C) Grupo tratado com filantina + nirantina 100mg/Kg no 45º dia de infecção. (A) formação de várias vesículas (v) entre os tubérculos e formação de protuberâncias (pt). (B) descamação (d) do tegumento do verme macho. (C) contração da ventosa ventral (cvv) e formação de vesículas (v). (D-F) Grupo tratado com filantina + fildetralina + nirtetralina 100mg/Kg no 45º dia de infecção. (D) Contração das ventosas oral (cvo) e ventral (cvv). (E) pode ser observada formação de inúmeras vesículas (v), perfurações (p) e descamação (d), na região das ventosas. (F) formação de vesículas na região dorsal do tegumento do verme macho.





**Figura 68:** Microscopia eletrônica de varredura dos grupo tratado com nirantina 100 mg/kg no 45° dia de infecção. (A) descamação (d). (B) região do canal ginecóforo apresentando tubérculos com perda de espinhos (pes) e enrugamento do tegumento. (C) formação de inúmeras vesículas (v). (D) contração da ventosa oral (cvo). (E) Verme fêmea íntegra na região das ventosas, sem formação de bolhas como foi visto nos testes *in vitro*.



**Figura 69:** Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle positivo tratado com PZQ 40 mg/kg no 45º dia de infecção. (A) verme macho íntegro. (B) ventosas oral (vo) e ventral (vv) do verme macho. (C) tegumento do verme macho apresentando tubérculos com perda de espinhos (pes). (D) (l) - leucócitos do hospedeiro aderidos ao tegumento do verme macho.

#### **4.3.6 Síntese dos tratamentos realizados *in vivo***

Este tópico foi criado com o intuito de sintetizar o resultado obtido *in vivo* com as amostras de *P. amarus* para uma melhor visualização geral. Para tanto foi feita uma avaliação entre as taxas de redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas nos dois períodos (45 e 60 dias após a infecção), em relação ao grupo controle negativo não tratado.

Na avaliação dos tratamentos realizados no 45º dia de infecção, os grupos tratados as lignanas F+N (1:1m/m) e nirantina foram os mais efetivos, uma vez que apresentaram taxas de redução significativas para todos os parâmetros avaliados (Tabela 19). No tratamento realizado no 60º dia de infecção, mais uma vez a F+N se mostrou a mais eficaz diante de todos os parâmetros avaliados (Tabela 20). Porém, vale ressaltar que a F2BuOH 100 mg/kg apresentou resultados expressivos para redução do número total de vermes, de vermes fêmeas e de ovos, não mostrando efetividade apenas na redução do número de granulomas.

**Tabela 19:** Avaliação das taxas de redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas em relação ao controle negativo (PBS), dos tratamentos efetuados no 45º dia de infecção.

| 45 dias                      |        |         |        |        |
|------------------------------|--------|---------|--------|--------|
| Amostra/Concentração (mg/kg) | RV (%) | RVF (%) | RO (%) | RG (%) |
| PZQ 40                       | 22,3   | 39,6    | 0      | 12     |
| F2BuOH 100                   | 9,8    | 35,8    | 41,1   | 12     |
| F2BuOH 200                   | 33,7   | 36,4    | 50,6   | 42,8   |
| F2BuOH 100x3                 | 31,7   | 34,6    | 71,7   | 29,7   |
| F + F + N 100                | 42,2   | 46,5    | 79,4   | 28,5   |
| F + N 100                    | 55     | 56      | 63,8   | 57,1   |
| Nirantina 100                | 56,7   | 58,5    | 90,3   | 54,8   |

RV: redução do número total de vermes; RVF: redução do número de vermes fêmeas; RO: redução do número de ovos; RG: redução do número de granulomas. PZQ: praziquantel; F+F+N: filantina + fíltetralina + nirtetralina; F+N: filantina+ nirantina.

**Tabela 20:** Avaliação das taxas de redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas em relação ao controle negativo (PBS), dos tratamentos efetuados no 60º dia de infecção.

| 60 dias                      |        |         |        |        |
|------------------------------|--------|---------|--------|--------|
| Amostra/Concentração (mg/kg) | RV (%) | RVF (%) | RO (%) | RG (%) |
| PZQ 40                       | 45     | 45,7    | 53,5   | 36     |
| F2BuOH 100                   | 46,7   | 42,7    | 98,3   | 18,4   |
| F + F + N 100                | 26,4   | 19,6    | 61,4   | 17,6   |
| F + N 100                    | 50,8   | 47,2    | 87,5   | 44     |
| Nirantina 100                | 11     | 5,5     | 77,8   | 23,2   |

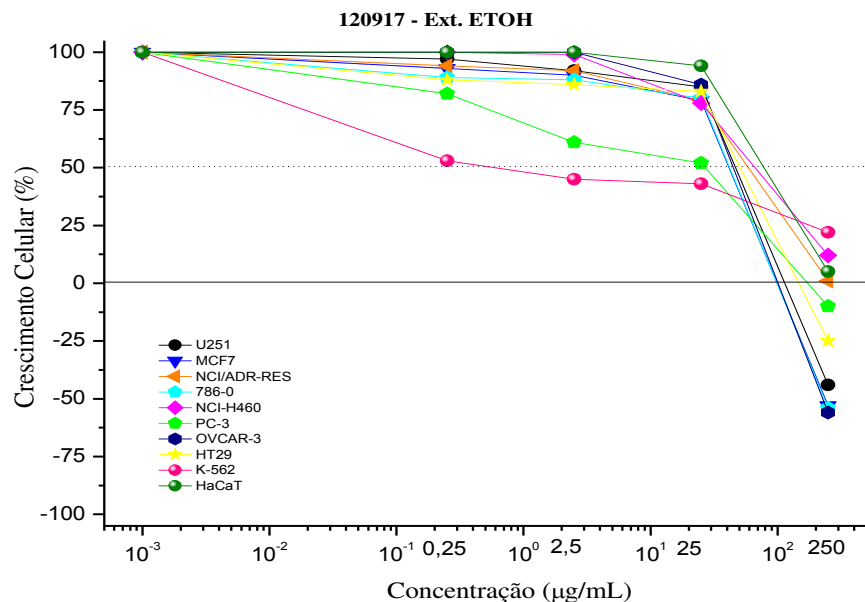
RV: redução do número total de vermes; RVF: redução do número de vermes fêmeas; RO: redução do número de ovos; RG: redução do número de granulomas. PZQ: praziquantel; F+F+N: filantina + fíltetralina + nirtetralina; F+N: filantina+ nirantina.

## 4.4 Ensaaios de citotoxicidade

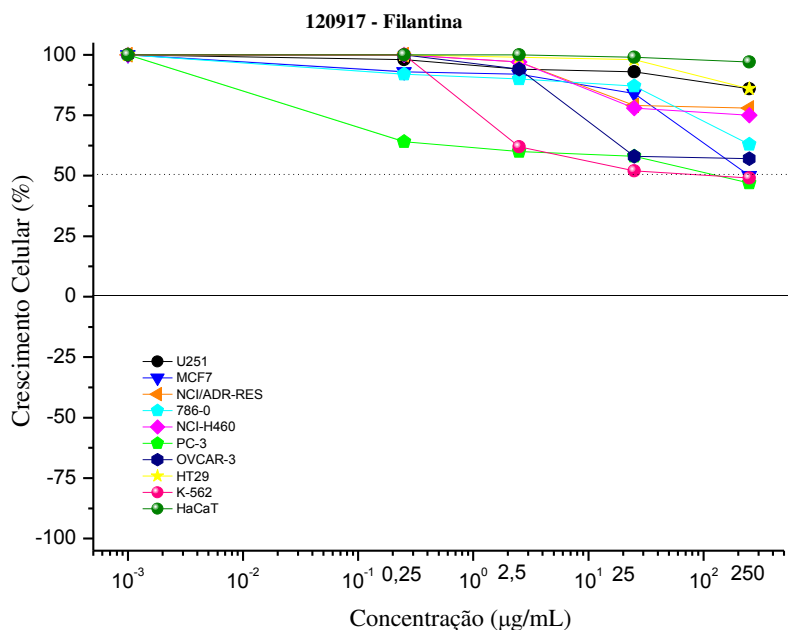
#### 4.4 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as células tumorais, U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorectal); K562 (leucemia) e a célula humana normal HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

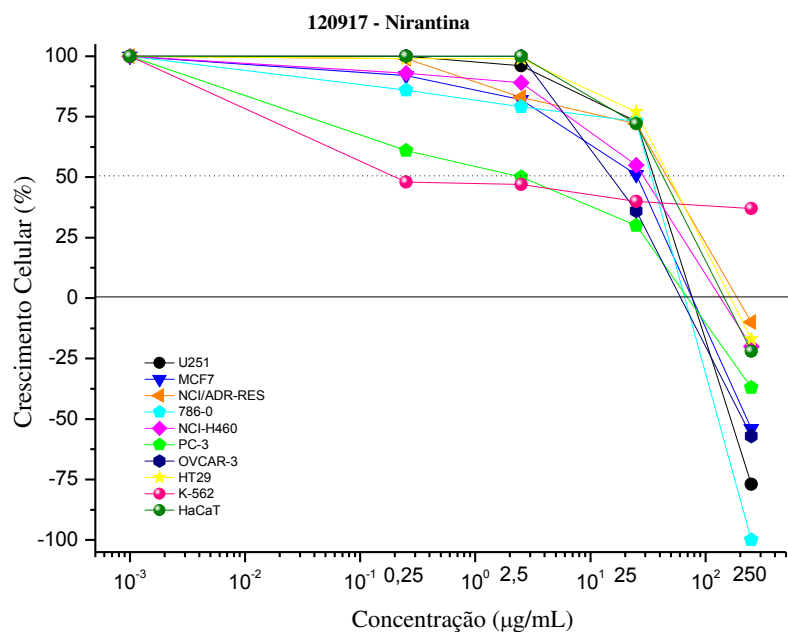
De acordo com os valores médios de absorbância para cada concentração das amostras do EEB e das lignanas filantina e nirantina, o crescimento celular foi calculado. A partir desses valores foram gerados gráficos, conforme mostram as Figuras 70, 71 e 72, da porcentagem de crescimento celular em função da concentração das amostras testadas. Com esses gráficos e o auxílio do software Origin 8.0 foi possível calcular o *Total Growth Inhibition* (TGI), que é a concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular. O valor encontrado do TGI para o EEB, filantina e nirantina, foi mais elevado (> 250 µg/mL) do que o observado para as células mais sensíveis (células tumorais), o que pode sugerir uma baixa toxicidade para as células normais HaCaT (Tabela 21).



**Figura 70:** Porcentagem de crescimento celular para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto.



**Figura 71:** Porcentagem de crescimento celular para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações da lignana filantina.



**Figura 72:** Porcentagem de crescimento para cada linhagem de células na presença de diferentes concentrações da lignana nirantina.

**Tabela 21:** Valores do *Total Growth Inhibition* (TGI) ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o EEB e as lignanas filantina e nirantina em cada linhagem testada.

|                  | <b>2</b> | <b>m</b> | <b>a</b> | <b>7</b> | <b>4</b> | <b>p</b> | <b>o</b> | <b>h</b> | <b>k</b> | <b>q</b> |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Filantina</b> | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     | >250     |
| <b>Nirantina</b> | 74,8     | 73,6     | 200,1    | 43,1     | 141,7    | 55,7     | 60,0     | 179,6    | >250     | >250     |
| <b>Ext EtOH</b>  | 132,4    | 109,3    | >250     | 109,3    | >250     | 206,0    | 117,3    | 164,1    | >250     | >250     |

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (coloretal); k = K562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).



## 5. Discussão

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos fitoquímicos

Nos recentes anos, um interesse substancial tem sido colocado nas propriedades químicas e farmacológicas das plantas do gênero *Phyllanthus* (CALIXTO et al., 1998). A espécie *Phyllanthus amarus* é uma importante planta medicinal, amplamente utilizada na medicina fitoterápica tradicional por possuir uma grande variedade de propriedades benéficas ao homem. Uma triagem de compostos obtidos dessa planta determinou inúmeras atividades farmacológicas como hepatoprotetora, anti-diabética, analgésica, anti-inflamatória, diurética, além de outras (JOSEPH & RAJ, 2011; KIRAN et al., 2011).

As plantas medicinais são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos orgânicos de baixo peso molecular, denominados de metabólitos secundários que são indispensáveis para a sobrevivência das plantas, uma vez que muitos destes metabólitos têm importantes funções ecológicas como resistência contra doenças e herbívoros.

A biossíntese dos metabólitos secundários varia entre as plantas e fatores ambientais tais como precipitação, temperatura média, solo, velocidade do vento, comprimento da vegetação, período e intensidade da radiação têm sido relatados como responsáveis por diferenças existentes entre as espécies do gênero *Phyllanthus* e até mesmo pelas variações intraespecíficas (KHAN et al., 2010; KHAN et al., 2011).

Um grande número de compostos fitoquímicos têm sido encontrados em plantas do gênero *Phyllanthus*, sendo os extratos desse gênero ricos em metabólitos secundários, como glicosídeos, flavonoides, alcalóides, elagitaninos, fenilpropanóides e principalmente lignanas que estão presentes em várias partes da planta (folhas, caule e raiz) (JOSEPH & RAJ, 2011; KIRAN et al., 2011; KOMURIAH et al., 2009). Os resultados encontrados nesse trabalho através da técnica de CG/EM também mostraram a presença de lignanas nas frações avaliadas.

As lignanas são uma importante classe de compostos ativos naturais que ocorrem nas plantas, conhecidas por possuírem uma variedade de efeitos atuando como anti-inflamatório, antitumoral, antimetabólico e antiviral (Kassuya et al., 2005). Assim sendo, por as lignanas estarem presentes na maioria das frações e por ter efeitos

benéficos já cientificamente comprovados, decidiu-se testá-las *in vivo*, mesmo não obtendo resultados significativos *in vitro*.

No trabalho em questão as lignanas encontradas foram filantina, faltetralina, nirtetralina, hipofilantina e nirantina, estes resultados estão de acordo com Kassuya et al. (2003) que mostraram através de estudos fitoquímicos que essas são as lignanas constituintes da *P. amarus*.

Estudo realizado por Khan et al. (2011), avaliaram 19 amostras de *P. amarus* coletadas de diferentes regiões geográficas da Índia e avaliaram a diversidade fitoquímica encontrada nas várias partes da planta como raiz, folhas, caule e sementes. Verificaram que a maior parte dos constituintes químicos da espécie *P. amarus* estão presentes nas folhas da planta, o que comprova que usamos corretamente a parte da planta mais rica em compostos. Outro fator observado nesse estudo foi que em todas as amostras de *P. amarus* foi encontrada a lignana filantina, fato este também encontrado em nosso estudo em todos os fracionamentos realizados.

Em vista das importantes propriedades farmacológicas, numerosos estudos têm sido realizados, em uma tentativa de obter um melhor conhecimento dos eventos biológicos ligados à biossíntese e ao acúmulo de lignanas nas espécies de *Phyllanthus*.

## 5.2 Ensaio *in vitro*

Recentemente, o desenvolvimento de novos compostos a partir de produtos naturais para as chamadas doenças negligenciadas, incluindo esquistossomose, tem sido amplamente explorado e estimulado. Para avaliar a bioatividade desses compostos naturais, os ensaios *in vitro* têm desempenhado um papel central no início dos estudos pré-clínicos, por ser uma técnica sensível e facilmente reproduzível (JACKSON & COPP, 2000; VERAS et al., 2012). Através dessa triagem inicial, vários parâmetros como sobrevivência, acasalamento, oviposição e lesões tegumentares são frequentemente avaliados como indicadores de atividade biológica durante a cultura *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2009, 2010; MORAES et al., 2011; PENIDO et al., 2008; SANDERSON et al., 2002; XIAO et al., 2007).

Em relação ao ensaio esquistossomicida *in vitro*, o efeito do EEB, frações e lignanas na sobrevivência dos vermes adultos de *S. mansoni* foi analisado considerando-se a concentração da amostra (200, 100, 50 e 25 µg/mL) e o tempo de incubação (até 72 horas). Deve-se ressaltar que nenhuma avaliação esquistossomicida com a planta *P. amarus* foi realizada por outros grupos de pesquisa. Nesse estudo os resultados mostraram que os efeitos ocorreram de maneira dose dependentes, sendo a concentração de 200 µg/mL a mais efetiva para a maioria das amostras testadas. Entre as amostras avaliadas, as Fr 3, F2BuOH 200, 100 e 50 µg/mL e F2HEX 200 e 100 µg/mL, foram letais para 100% dos vermes machos e fêmeas após 24 horas de incubação. Os demais vermes morreram após 48 e 72 horas, respectivamente. Em ensaios *in vitro* utilizando a mesma linhagem BH e outros produtos naturais, como a piplartina (amida isolado da *Piper tuberculatum*) 100% dos vermes morreram na concentração 472,7 µM após 2 horas. Nas concentrações de 15,8; 12,6 e 9,5 µM o efeito da piplartina também foi letal para 100% dos vermes depois de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (MORAES et al., 2011a). Testando a Epiisopiloturina (alcalóide imidazólico extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus*) com as concentrações 100, 150 e 200 µg/mL, a mortalidade dos vermes foi de 100% em 120 horas de observação para as duas últimas concentrações (VERAS et al., 2012). O ensaio com a Dermaseptina 01 (peptídeo antimicrobiano encontrado na secreção da pele de sapos) revelou que todos os vermes morreram em 24 horas de incubação com 200 µg/mL do

peptídeo e em 48 e 120 horas respectivamente, com 100 e 50 µg/mL do peptídeo (MORAES et al., 2011b). Em testes com uma linhagem diferente (LE), o óleo essencial de *Ageratum conizoides* apresentou taxa de mortalidade dos vermes de 50 e 75%, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente (MELO et al., 2011b). Já para o óleo essencial da *Baccharis dracunculifolia*, a taxa de mortalidade dos vermes foi de 100% em 24 horas nas concentrações 10, 50 e 100 µg/mL (PARREIRA et al., 2010).

Em ensaios *in vitro* testando o PZQ, fármaco de referência para o tratamento da esquistossomose, com o objetivo de avaliar a sobrevivência dos vermes, Picca-Mattoccia & Cioli (2004) demonstraram índices de mortalidade de 25% com 40 e 80 µg/mL para a linhagem de Porto Rico. Já Melo et al. (2011b) testando o óleo essencial de *Ageratum conizoides* na linhagem LE, apresentou taxa de mortalidade de 100% e 75% para vermes machos e fêmeas em contato com o PZQ 100 µg/mL e com o PZQ 10 µg/mL a mortalidade foi de 100%. Em testes com o PZQ e a linhagem BH realizado por Moraes et al. (2011a) a letalidade desse fármaco na concentração 10 µM foi de 100% para o total de vermes. No presente trabalho, PZQ 10 µg/mL utilizado como grupo controle positivo foi letal para 100% dos vermes em 4 h de observação.

Comparando-se os resultados obtidos com outras plantas medicinais descritas anteriormente, foi possível perceber que a F3, F2HEX e F2BuOH da *P. amarus* apresentaram taxas de mortalidade significativas (100%) para linhagem BH em todas as concentrações testadas, após 72 horas de observação.

Disparidades na susceptibilidade de amostras entre vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* têm sido previamente reportadas em várias triagens *in vitro* com outros produtos naturais. Entre eles, por exemplo, Sanderson et al. (2002) relataram que os vermes machos são mais suscetíveis que as fêmeas quando em presença de extratos de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre), resultados semelhantes a esse foram obtidos por Liang et al. (2001) e Picca-Mattoccia e Cioli (2004) quando testaram o PZQ e por Melo et al. (2011b) quando testaram o óleo essencial de *Ageratum conizoides*. Em contraste, Mitsui et al. (2009) relataram que as fêmeas foram mais suscetíveis nos experimentos com artesunato (derivado da artemisinina e extraído de *Artemisia annua*) nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg/L, para a linhagem Porto Rico. Diferentemente dos resultados relatados acima, os ensaios realizados com as

amostras de *P. amarus* não exibiram diferença na sensibilidade entre vermes machos e fêmeas. Esses resultados corroboraram com o de outros autores como Magalhães et al. (2009), Moraes et al. (2011a, b), Miranda et al. (2012) e Veras et al. (2012).

Com o intuito de avaliar os efeitos *in vitro* do EEB, frações e lignanas na capacidade reprodutiva do *S. mansoni*, a habilidade dessas amostras em promover a separação dos casais de vermes adultos, em machos e fêmeas, e a inibição da oviposição também foram investigados. Assim sendo, foi possível observar que as amostras de *P. amarus* promoveram a separação dos casais de maneira proporcional às concentrações testadas e antes da ação esquistossomicida. Esse resultado está de acordo com Moraes et al. (2011a) e Magalhães et al. (2009) que testaram a piplartina e curcumina, respectivamente, uma vez que a separação dos vermes ocorreu antes da ação esquistossomicida. Melo et al. (2011b) avaliaram o óleo essencial de *Ageratum conizoides* e mostraram que 50 e 75% dos casais de vermes se separaram nas concentrações 50 e 100 µg/mL. Outro resultado que corrobora com estes acima é o ensaio realizado por Miranda et al. (2012) que avaliaram um alcalóide esteroidal extraído da fruta *Solanum lycocarpum*, em que este ocasionou a separação de 100% dos vermes em 24 horas, nas concentrações 20, 32 e 50 µM.

Nos testes do grupo controle positivo realizados com o PZQ a separação dos casais de vermes ficou em torno de 20%, não acontecendo de maneira acentuada como ocorreu com as amostras testadas, resultado semelhante foram obtidos por Magalhães et al. (2009, 2010) e Veras et al. (2012).

Ocasionar a separação entre os vermes machos e fêmeas de *Schistosoma* é um resultado significativo uma vez que, o verme adulto de *Schistosoma* é entre os parasitas trematódeos, o único a apresentar dimorfismo sexual com co-dependência essencial. A fêmea se aloja e vive em um sulco, canal ginecóforo, na região ventral do macho (BASCH & BASCH, 1984). Esse pareamento físico (não a transferência de esperma) é uma associação íntima, necessária entre os vermes para que ocorra o desenvolvimento e a maturação sexual da fêmea (GREVELDING et al., 1997; KUNZ, 2001; POPIEL & BASCH, 1984; POPIEL et al., 1984). Um fato interessante observado é que fêmeas que cresceram na ausência de macho, diferem consideravelmente daquelas recuperadas de infecções mistas (fêmeas pareadas com os machos), uma

vez que tem seu desenvolvimento atrofiado, exibindo ovário e vitelário subdesenvolvidos, iniciando um processo de regressão reprodutiva tornando-se imaturas e incapazes de ovipor. No entanto, se tais fêmeas forem colocadas novamente em contato com vermes machos, a capacidade reprodutiva volta a atividade normal, meses depois da regressão. Em contraste, o desenvolvimento reprodutivo do macho não é influenciado pela presença da fêmea (ERASMUS, 1973).

Relativo à oviposição dos vermes adultos de *S. mansoni*, alguns constituintes extraídos de plantas têm mostrado efeito na liberação de ovos pelos vermes, provocando inibição da oviposição. Por exemplo, curcumina extraída da *Curcuma longa* (Magalhães et al., 2009), alguns floroglucínóis, como ácido flavaspídico e desaspídina obtidos de rizoma de samambaias do gênero *Dryopteris* (Magalhães et al., 2010) e a amida piplartina isolada da *Piper tuberculatum* (Moraes et al., 2011a) inibiram 100% a postura de ovos dos vermes. Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados com a Fr 3, FH<sub>2</sub>O, FBUOH, F2BUOH, F3BUOH, PHEX, F1HEX, F2HEX, F3HEX e a lignana nirantina, extraídos da *P. amarum* foram capazes de inibir a oviposição em todas as concentrações testadas. Nestes casos, entretanto, esse efeito poderia ser uma consequência da grande quantidade de casais de vermes separados ou mortos. Outro fator que pode confirmar a afirmação acima é que em ensaios com amostras como a hipofilantina, que não apresentou letalidade para os vermes e que as taxas de separação dos casais foi considerada baixa em relação às outras amostras, a oviposição encontrada foi em sua maior parte superior ao grupo controle negativo.

Em relação ao controle farmacológico positivo PZQ, os resultados mostraram ausência de oviposição em todas as concentrações testadas, devido a mortalidade dos vermes em 4 h de observação.

Em adição a avaliação da taxa de mortalidade, separação dos casais e oviposição dos vermes adultos de *S. mansoni*, as alterações morfológicas no tegumento dos parasitos induzidas pelas amostras testadas também foram avaliadas.

A avaliação *in vitro* da ação de novos candidatos a fármacos esquistossomicidas sobre o tegumento de vermes de *S. mansoni* é um critério qualitativo e subjetivo, no qual as alterações morfológicas do tegumento são avaliadas através de análise microscópica. Apesar disso, esse método de avaliação vem sendo empregado por

diversos autores por ser um passo importante na tentativa de compreender a ação de novos candidatos a fármacos (BRAGUINE et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; MORAES et al., 2011a,b; PARREIRA et al., 2010).

Muitas funções e características do tegumento do *S. mansoni* tem levantado a importância de estudá-lo. Está envolvido em funções que são importantes para o verme, como a absorção de nutrientes, funções secretórias e proteção do parasita contra o ataque do sistema imune do hospedeiro. Além disso, o tegumento é a interface entre o parasita e o ambiente do hospedeiro. Sendo assim, esta estrutura é um importante alvo na descoberta de novos fármacos esquistossomicidas (LIMA et al., 2011; SHUHUA et al., 2000; XIAO et al., 2002).

O presente trabalho demonstrou que a alteração tegumentar foi detectada em todas as amostras testadas, sendo a ação mais acentuada nos vermes machos do que nas fêmeas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Moraes et al. (2011a,b) quando testaram a piplartina e a dermaseptina 01, obtendo uma ação mais pronunciada no tegumento dos vermes machos do que nas fêmeas. Além disso, Mitsui et al. (2009) também relataram danos (formação de vesículas) no tegumento dos vermes machos com concentrações de 20 e 40 mg/L de artesunato.

A nirantina e o PZQ foram exceções à ação relatada acima uma vez que o tegumento dos vermes machos e fêmeas foi afetado na mesma proporção. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Miranda et al. (2012) quando testaram extrato alcalóidico e compostos isolados da *Solanum lycocarpum*. O autor citado acima e Shuhua et al. (2000) testaram também o PZQ e tiveram 100% dos vermes com alterações tegumentares.

A análise por microscopia de luz não permite detalhar os danos apresentados pelos vermes, por isso foram feitas análises do tegumento dos vermes recuperados da perfusão dos camundongos submetidos ao tratamento *in vivo* com as amostras de *P. amarus*, através da Microscopia Eletrônica de Varredura. Este dado será discutido mais criteriosamente na análise dos ensaios *in vivo*.



### 5.3 Ensaios *in vivo*

A esquistossomose é uma doença negligenciada que tem apenas um fármaco de escolha, o PZQ. Por causa disto e pelo aparecimento de vermes resistentes a este fármaco, o “The Special Program for Research and Training in Tropical Disease” (Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais), promovido pela WHO, incentiva a pesquisa, o desenvolvimento e a descoberta de novos compostos anti-esquistossomicidas (BERTÃO et al., 2012; NEVES et al., 2011).

A descoberta de novos fármacos é um processo complexo, intimamente ligado à química, mas que também é cada vez mais impulsionada pelas ciências biológicas. Uma grande parte das pesquisas de novos candidatos a fármacos contra o *Schistosoma* é dependente de avaliações parasitárias *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* têm vantagens e desvantagens em relação aos modelos *in vivo*. Uma das vantagens é que os testes *in vitro* permitem testar várias substâncias e/ou associações delas em diferentes concentrações de uma forma mais rápida, com menor custo e uso de uma menor quantidade de animais (RAMIREZ et al., 2007). Por outro lado, nos ensaios *in vitro*, as substâncias não passam pelos mesmos sistemas presentes nos modelos animais dos testes *in vivo*, fazendo com que não haja correlação entre a eficácia da atividade esquistossomicida *in vitro* (*S. mansoni*) e a eficácia da atividade *in vivo* (camundongos) de vários fármacos, como descreve Katz (2008b), em que os diaminodifenoxialcanos apresentaram baixa ação *in vitro* e alta atividade *in vivo*. Relata ainda que o contrário aconteceu com a glucosamina, que apresentou alta atividade *in vitro* e baixa *in vivo*. A hycantona e o UK 3883 (que originou a oxaminiquina) não apresentam atividade *in vitro*, porém, quando foram administradas *in vivo* à camundongos e humanos originaram metabólitos hidroximetilados ativos que passaram a ter ação contra os vermes *in vitro* (CIOLI et al., 1995; KATZ, 2008b; RAMIREZ et al., 2007).

O estudo em questão testou *in vitro* e *in vivo* diferentes frações e compostos isolados da planta *P. amarus*. Os testes *in vitro* revelaram que a F2BuOH foi a mais efetiva contra os vermes adultos de *S. mansoni*, fazendo com que a mesma fosse pré selecionada para a realização dos testes *in vivo*. Mas, analisando quimicamente por CG/EM a F2BuOH, percebeu-se que a mesma era composta em sua maioria por

lignanas que também foram testadas *in vitro*, porém não apresentaram atividade esquistossomicida satisfatória. Como descrito acima, nem sempre os resultados encontrados *in vitro* se reproduzem *in vivo*, então, isso fez com que algumas lignanas como a: nirantina, filantina + nirantina (1:1) e filantina+filtetralina+nirtetralina fossem também selecionadas para a realização dos ensaios *in vivo*, uma vez que essas lignanas fazem parte da composição da F2BuOH, e esta por sua vez se mostrou ativa *in vitro*.

Para a avaliação de agentes anti-*S. mansoni* ou eficácia de fármacos em camundongos infectados com *S. mansoni*, é importante avaliar vários critérios relacionados a intensidade parasitária, estágios e distribuição nos tecidos do hospedeiro (REDA et al., 2012). Neste trabalho foram seguidos alguns critérios propostos por Pellegrino et al. (1962) e Pellegrino & Katz (1968) como: quantidade de vermes recuperados nos animais tratados, alterações na distribuição dos vermes no sistema porta hepático, proporção entre machos e fêmeas, número de ovos eliminados nas fezes e retidos no intestino (oograma), além da observação da presença de granulomas no fígado e os seus tamanhos, uma vez que, segundo esses autores, tais critérios são fundamentais para avaliar a atividade terapêutica esquistossomicida de um novo fármaco.

Em relação à quantidade de vermes recuperados nos dois períodos de tratamentos realizados (45 e 60 dias após a infecção) com as amostras de *P. amarus*, pôde-se perceber que os vermes foram recolhidos em sua maioria acasalados nas veias mesentéricas, observando ainda que existiu um equilíbrio entre a quantidade de vermes machos e fêmeas recuperadas. Após atingir a maturidade sexual, a maior parte dos vermes adultos de *S. mansoni* migram acasalados da região hepática para as veias mesentéricas, estando normalmente, 60 a 70% dos vermes aí localizados, explicando assim o fato de ter encontrado maior quantidade de vermes nas veias mesentéricas (MACHADO e SILVA et al., 1993; PELLEGRINO & KATZ, 1968). Machado e Silva et al. (1993), afirmam ainda que, a distribuição dos vermes adultos no sistema porta hepático depende da quantidade de vermes machos e fêmeas encontrados na infecção, havendo um maior número de vermes no fígado quando existe na infecção a predominância de um dos sexos. E quando existe um equilíbrio

numérico entre os sexos, a migração para as veias mesentéricas é mais eficiente, como foi visto neste trabalho.

A questão da ação de fármacos sobre a proporção de vermes machos e fêmeas é controversa, mas os dados encontrados nesse trabalho com *P. amarus* corroboram com Gonnert & Andrews (1977), Pellegrino et al. (1977) e Mehlhorn et al. (1981) que afirmaram que doses subcurativas do PZQ atuam na mesma proporção em vermes machos e fêmeas, matando-os igualmente. Drescher et al. (1993), utilizando o PZQ 50 mg/kg durante 5 dias, também não detectaram diferença na susceptibilidade entre os sexos. No entanto, Botros et al. (2005) e Picca-Mattoccia & Cioli (2004) relatam em seus estudos que os esquistossomos machos são mais sensíveis ao PZQ, do que as fêmeas, relacionando o fato de vermes machos em infecções bissexuais serem mais sensíveis ao PZQ que as fêmeas. Delgado et al. (1992), observaram pela primeira vez que o PZQ agiu preferencialmente em vermes fêmeas, sendo que este resultado foi mais evidente com doses mais elevadas do PZQ (250 mg/kg). El-Lakkany et al. (2004) e Lescano et al. (2004) ao testar o efeito do artemether nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg sobre *S. mansoni* constataram que os vermes fêmeas são mais suscetíveis à ação do artemether do que os vermes machos. A hipótese que poderia explicar essa divergência entre esses autores seria a linhagem de *S. mansoni* utilizada, já que se sabe que linhagens diferentes apresentam respostas divergentes ao mesmo tratamento, havendo influência na susceptibilidade da infecção, na fecundidade e consequentemente na produção de ovos (INCANI et al., 2001; YOSHIOKA et al., 2002).

De acordo com Pellegrino & Katz (1968) é importante também que o fármaco testado provoque a separação dos casais de *S. mansoni*, uma vez que a separação de vermes acasalados tem como consequência uma rápida mudança fisiológica e bioquímica na fêmea, levando a mudanças regressivas no ovário, a completa regressão da glândula vitelínica e uma redução no tamanho. Esse fato não foi observado no estudo com as amostras de *P. amarus*, uma vez que a maioria dos vermes foi recuperada acasalada.

Em resumo, os resultados obtidos *in vivo* com as amostras de *P. amarus* mostraram que não houve ação preferencial por machos ou fêmeas, estando estes resultados de acordo com os adquiridos com os testes *in vitro*, em que houve uma

igualdade de ação para ambos os sexos. Em contraste, nos testes *in vivo* houve uma recuperação maior de vermes acasalados, enquanto que nos ensaios *in vitro*, as amostras atuaram na separação dos casais.

A atividade da F2BuOH e lignanas contra o *S. mansoni* foi avaliada de acordo com os dados obtidos sobre a redução do número total de vermes e de vermes fêmeas no grupo teste em relação ao grupo controle infectado e não tratado, sendo estes dados considerado por Pellegrino & Katz (1968) um critério de fundamental importância na avaliação terapêutica de um fármaco.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que as lignanas F+N e nirantina 100 mg/kg apresentaram as melhores taxas de redução do número total de vermes (55 e 56,7%) e de vermes fêmeas (56 e 58,5%) no tratamento realizado 45 dias após a infecção. Nos grupos tratados 60 dias após a infecção, a F2BuOH e a associação de lignanas F+N 100 mg/kg se destacaram, pois apresentaram taxa de redução do número total de vermes de 46,7 e 50,8% e redução de vermes fêmeas de 42,7 e 47,2%, respectivamente. Resultados semelhantes a esses foram relatados por Kamel et al. (2011), quando testaram a ação esquistossomicida (*S. mansoni*) do extrato metanólico das plantas *Chenopodium ambrosoides* (1250 mg/kg/dose única), *Conyza dioscorides* (1000 mg/kg/2 dias consecutivos) e *Sebania sesban* (1000 mg/kg/2 dias consecutivos) e obtiveram redução do número total de vermes de 53,7%, 40,9% e 54,4% e redução do número de vermes fêmeas de 42,7%, 53,2% e 58,3%, respectivamente. Allam (2009), testando a curcumina 400 mg/kg (2 injeções/semana, durante 8 semanas) contra o *S. mansoni* linhagem egípcia, apresentou taxa de redução do total de vermes e de vermes fêmeas de 44, 4% e 44,5%, nessa ordem. Já nos testes realizados por Melo et al. (2011a) com Cramol 1,4 lectina em *S. mansoni* linhagem BH, os resultados foram um pouco melhor apresentando redução do total de vermes de 71% (50 mg/kg dose única) e 79% (7 mg/kg/7 dias consecutivos) e para a quantidade de vermes fêmeas encontradas a taxa de redução foi de 69,2% e 80,7%, sendo os tratamento realizados 40 dias após a infecção. Jatsa et al. (2009), testaram o extrato aquoso da planta *Clerodendrum umbellatum* em camundongos infectados com *S. mansoni* linhagem camaroniana, obtendo taxas de redução do número total de

vermes de 73,62%, 88,74% e 100%, quando testada nas concentrações de 40, 80 e 160 mg/kg/14 dias, administradas 60 dias após a infecção.

O ensaio *in vivo* realizado com o óleo do *Allium sativum* e do *Allium cepa* (5 ml/kg; dose única/8semanas), também apresentaram redução do número total de vermes de *S. mansoni* (linhagem egípcia) em relação ao grupo controle, sendo as taxas encontradas de 67,96% e 75,97%, respectivamente (METWALLY, 2006). Outro ensaio *in vivo* com o *S. mansoni* linhagem egípcia realizado por Mantawy et al. (2011), também testaram o *Allium sativum* e o *Allium cepa*, mas agora como extrato seco na dosagem de 2g/100g durante 45 dias consecutivos e obtiveram taxas de redução de 73,41% e 66,29%.

As diferenças existentes entre os resultados citados acima, alguns até melhores aos encontrados com a *P. amarus* podem ser explicadas por diversos fatores, que entre eles podemos citar: tipo de amostra testada (se composto isolado ou extrato bruto), diferentes linhagens que respondem de maneira divergente a tratamentos, período que o animal recebeu o tratamento, bem como a concentração e o tempo de duração do tratamento.

Outro critério de avaliação terapêutica de agentes esquistossomicidas é através do número de ovos eliminados nas fezes e retidos no intestino (oograma) dos animais tratados. Esse critério tem o intuito de verificar se a administração da substância provoca redução no número de ovos produzidos pelos vermes do grupo tratado em relação aos do grupo controle não tratado, uma vez que fármacos ativos contra o *S. mansoni* provocam diminuição ou completa cessação da postura de ovos nos animais tratados (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

No presente trabalho realizado com amostras extraídas da planta *P. amarus*, foi possível verificar que nos tratamentos realizados após 45 dias de infecção, todos os grupos tratados apresentaram taxas de redução do número de ovos significativas em relação ao grupo controle negativo, variando de 41,1 a 90,3%. Ressaltando ainda que os grupos tratados com as lignanas F+N (63,8%), F+F+N (79,4%) e nirantina (90,3%), foram os mais eficazes nesse período de tratamento para esse parâmetro. Nos grupos tratados no 60º dia de infecção, a redução do número de ovos variou de 61,4 a 98,3%, sendo o melhor resultado encontrado no tratamento feito com a F2BuOH 100 mg/kg.

De acordo com os resultados, pôde-se perceber que a redução do número de ovos foi decorrente da redução do número de vermes.

A significativa redução do número de ovos encontrados *in vivo* é importante, uma vez, que Pellegrino et al. (1962) afirmaram que camundongos infectados com *S. mansoni* têm o início da postura de ovos por volta do 30º dia de infecção, então nos tratamentos realizados no 45º e 60º dias de infecção, os vermes estariam no seu período de oviposição mais acentuado. Ainda, Segundo Martinez et al. (2003) o padrão de eliminação dos ovos se inicia com uma baixa oviposição, havendo um aumento progressivo entre 45 e 72 dias após a infecção, reforçando ainda mais a efetividade das amostras testadas em relação a oviposição, uma vez que a diminuição da quantidade de ovos foi alcançada no período de aumento da oviposição.

Outros estudos *in vivo* com plantas medicinais mostraram que testes realizados com a linhagem BH de *S. mansoni* e o composto Cramoll 1,4 lectina (extraído da planta *Cratylia mollis*) nas doses 50 mg/kg (administrada em dose única) e 7 mg/kg (administrada em dose diária/7dias), apresentou redução da quantidade de ovos de 79% e 80%, respectivamente, para as duas dosagens em questão (MELO et al., 2011a).

Os óleos essenciais extraídos da *Allium sativum* (alho) e *Allium cepa* (cebola), testados na linhagem egípcia de *S. mansoni* na concentração 5 mg/kg (administrada 24 horas após a infecção/5 dias consecutivos), demonstraram reduções de oviposição de 74,4% e 82,15%, respectivamente. (METWALLY, 2006).

O extrato aquoso de *Clerodendrum umbellatum* nas concentrações 40, 80 e 160 mg/kg administrados 60 dias após a infecção/ 14 dias consecutivos, mostraram índice de redução de ovos de 13,23%, 75,4% e 85,14% para essas concentrações respectivamente. Esse ensaio foi realizado em camundongos infectados com linhagem oriunda de Camarões. (JATSA et al., 2009).

O exame parasitológico Kato-Katz é bastante empregado na detecção de ovos das duas espécies hepato-intestinais de esquistossomose, o *S. mansoni* e *S. japonicum*, porém, de acordo com Chaves et al. (1979) e Cunha et al. (1987) que realizaram estudos comparativos de métodos coprológicos, existe uma divergência nos resultados ao comparar diferentes métodos, existindo uma maior sensibilidade do método de

Kato-Katz em relação aos demais. Por essa razão para se fazer uma avaliação experimental segura do tratamento da esquistossomose, é sempre bom dispor de dois recursos: o exame parasitológico de fezes e o oograma que identifica a viabilidade dos ovos.

A viabilidade dos ovos foi avaliada através do estudo do oograma que consiste em classificar e contar as diferentes fases evolutivas dos ovos de *S. mansoni* (ovos imaturos, maduros e mortos) em material recolhido de uma porção do intestino, fornecendo critério, sobretudo qualitativo, sendo um dos métodos de maior fidedignidade para avaliar a eficácia terapêutica de agentes esquistossomicidas (CUNHA, 1992; CUNHA & CARVALHO, 1966). É um método fácil, seguro e confiável, cuja eficácia ou ineficácia pode ser definida poucos dias após o tratamento (CANÇADO et al., 1965; CUNHA & CARVALHO, 1966).

Uma vez que existe normalmente uma continuidade no processo de postura dos ovos pelas fêmeas, o primeiro resultado de um fármaco ativo é causar a interrupção ou diminuição da oviposição na parede intestinal, apresentando uma mudança progressiva na porcentagem de ovos viáveis nos diferentes estágios de desenvolvimento (PELLEGRINO & KATZ 1968).

Assim sendo, foi possível observar que nos ensaios realizados com as amostras de *P. amarus* no 45° dia de infecção houve uma alteração na quantidade de ovos viáveis em relação ao grupo controle negativo. Nesse período os grupos tratados apresentaram uma maior quantidade de ovos maduros do que imaturos com a F2BuOH 200mg/kg (27,9% de ovos imaturos e 68% de ovos maduros), F2BuOH 100 mg/kg/ 3dias (21,9% de ovos imaturos e 75% de ovos maduros), F+F+N (27,3% de ovos imaturos e 69,7% de ovos maduros), F+N (31,4% de ovos imaturos e 67,3% de ovos maduros) e nirantina (16,4% de ovos imaturos e 83,3% de ovos maduros). Já nos oogramas dos grupos tratados no 60° dia de infecção observou-se que apenas o grupo tratado com F+F+N apresentou uma quantidade maior de ovos maduros (62%) em relação aos imaturos (27%). Nesse período de tratamento ainda observou-se que a quantidade de ovos mortos nos grupos tratados, principalmente com nirantina (23%), foi bem maior do que a quantidade encontrada nos grupos controle negativo (1,7%) e positivo (4,5%).

O encontro de uma maior quantidade de ovos maduros é um resultado significativo, uma vez que segundo Prata (1957), os ovos maduros permanecem viáveis no intestino por cerca de doze dias, portanto, se a oviposição diminuir com a administração do fármaco, o oograma deverá apresentar maior quantidade de ovos maduros que de ovos imaturos, em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento.

El-Shenawy et al. (2008), quando testaram o extrato aquoso do alho (125 mg/kg/28 dias consecutivos) e o óleo da *Nigela sativa* (0,2 mg/kg/28 dias consecutivos) também apresentaram alterações nos seus respectivos oogramas em relação ao controle, porém foi encontrada uma maior quantidade de ovos imaturos do que de ovos maduros.

Mantawy et al. (2011), testando o *Allium sativum* e o *Allium cepa* na dosagem de 2g/100g durante 45 dias consecutivos, *in vivo* com a linhagem egípcia, mostrou alterações nos oogramas, sendo visualizada uma maior quantidade de ovos mortos, do que ovos imaturos e maduros nos dois tratamentos realizados. O *Allium sativum* apresentou 15,8% de ovos imaturos, 7,5% maduros e 76,7% mortos e o *Allium cepa* 20% imaturos, 10,5% maduros e 69,5% mortos.

A eficácia de fármacos anti *S. mansoni*, é normalmente avaliada por critérios como a carga parasitária e presença ou ausência de ovos nas fezes, sendo a redução da oviposição um resultado extremamente significativo uma vez que o ovo é responsável pela transmissão do parasito e manutenção do seu ciclo de vida. Além disso, a patologia da esquistossomose humana não está diretamente associada ao verme adulto, mas, a presença de um grande número de ovos que ficam aderidos nos tecidos do hospedeiro durante a migração do ovo e que causam processos inflamatórios, denominados granulomas, nos órgãos atingidos (GIBODA & SMITH, 1994; GRYSEELS et al., 2006; VERAS et al., 2012).

O processo granulomatoso é entendido como uma tentativa do hospedeiro em controlar a dispersão de substâncias antigênicas e restringi-las ao local da deposição, onde seriam desnaturadas e metabolizadas, ou seja, a reação em torno do ovo é inicialmente uma reação que tende a proteger o hospedeiro, impedindo que produtos tóxicos dos ovos como o antígeno hepatotóxico ômega-1, capazes de matar o hospedeiro, sejam liberados. 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 (MOHDA et al., 1998; ZANOTTI-MAGALHÃES et al., 1993).

A reação granulomatosa só ocorre após o amadurecimento do ovo e formação do miracídio. Os granulomas formam extensas áreas de fibrose no tecido, provocando a hipertensão portal e esta por sua vez dá origem às varizes esofagianas e outras alterações que comprometem e agravam o quadro clínico da doença (FARIA, 1999). Por isso, a diminuição da quantidade e do tamanho dos granulomas é considerada importante, uma vez que promoveram menos danos aos tecidos.

Neste trabalho nenhuma das amostras, nos dois períodos de tratamento, apresentou alteração significativa no tamanho dos granulomas em relação ao grupo controle negativo. Já na quantidade de granulomas, foi observada alterações, nos grupos tratados com a Nirantina no 45º dia de infecção e com a F+N no 45º e 60º dias de infecção em relação aos grupos controle negativo.

Em estudos realizados por Abdul-Ghani et al. (2011), utilizando o artemeter, contra o *S. mansoni* linhagem egípcia CD, nas concentrações 400 mg/kg/2 dias, 200 mg/kg/4 dias e 100 mg/kg/6 dias, apresentaram uma moderada redução na quantidade de granulomas, sendo as seguintes taxas de redução observadas respectivamente, 41,7%, 63,9% e 60,4%. Esses resultados são semelhantes aos encontrados com as amostras de nirantina no 45º dia de infecção (54,8%) e com a F+N no 45º e 60º dias (57,1% e 44%), e os animais foram tratados em dose única de 100 mg/kg, o que torna este resultado mais significativo do que o citado acima, que utilizou doses bem altas e por um maior período de tempo.

Já em estudos realizados com a mirra, também contra o *S. mansoni* linhagem egípcia CD, nas concentrações 500 mg/kg/2 dias, 250 mg/kg/4 dias e 125 mg/kg/6 dias, as taxas de redução do número de granulomas encontrados foi inferior ao encontrado no trabalho em questão, sendo elas respectivamente, 13%, 34,8% e 39,1%. Podendo observar que as duas melhores taxas ocorreram com os tratamentos realizados com as menores doses e um período maior de tempo (ABDUL-GHANI et al., 2010). No trabalho realizado por Melo et al. (2011a), testando o Cramoll 1,4 nas concentrações 50 mg/kg dose única e 7 mg/kg/7 dias, contra o *S.mansoni* linhagem BH, foi observado redução

de 40% e 73,5%, respectivamente, na quantidade de granulomas encontrados em relação ao grupo controle negativo.

Outro fato observado no presente trabalho foi que a maioria dos tratamentos apresentou maior quantidade de granulomas quando administrados aos 60 dias de infecção. Esse fato pode ser explicado por estudos realizados por Atta et al. (1981) e Boros et al. (1975) que relataram picos na formação de reações granulomatosas após a 8ª e 10ª semana de infecção e declínio após a 12ª.

Para a análise estrutural da atividade da F2BuOH e lignanas isoladas da *P. amarus* nos vermes adultos de *S. mansoni*, foi feita a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV revelou detalhes dos danos estruturais da superfície da membrana ocasionadas pelas amostras de *P. amarus* em relação aos controles negativo (PBS) e positivo (PZQ), conforme mostrado no item 4.3.5.

A MEV é uma importante ferramenta no estudo do tegumento do parasita quando se considera a relação hospedeiro-parasita. Muitas funções e características do tegumento de *S. mansoni* tem levantado a importância de estudá-lo. Ele está envolvido em funções que são importantes para os vermes, tais como a absorção de nutrientes, funções secretórias, absorção seletiva de fármacos e lipídeos, proteção do parasita contra o ataque do sistema imune do hospedeiro, além de possuir proteínas que são responsáveis pela reparação de danos. Além disso, o tegumento é a interface entre o parasita e o ambiente do hospedeiro. Portanto, essa estrutura do parasita é um importante alvo para fármacos (BERTÃO et al., 2012; LIMA et al., 2011; REDA et al., 2012; SHUHUA et al., 2000).

No trabalho em questão, a MEV mostrou que todos os tratamentos realizados provocaram alterações tegumentares nos vermes de *S. mansoni*, porém foram mais pronunciados nos vermes machos e menos evidentes ou não observados nos vermes fêmeas. Essa observação está de acordo com os resultados vistos nos testes in vitro, em que foi observado maior frequência de alterações tegumentares nos vermes machos. Os dados desse trabalho estão de acordo com Shaw & Erasmus (1987), quando testaram o PZQ, Mostafa & Soliman (2010), testaram o óleo da *Nigela sativa* e Sidr honey (mel) e Riad et al. (2009), que testaram o *Allium sativum*. Segundo Lima et

al. (2011), as lesões são mais pronunciadas nos vermes machos porque a fêmea frequentemente não está em contato com o microambiente do hospedeiro.

As principais alterações tegumentares induzidas pelas diferentes amostras de *P. amarus*, F2BuOH (100, 200 e 100x3 mg/kg), F+F+N, F+N e nirantina (100 mg/kg), foram caracterizadas por: formação de vesículas entre os tubérculos, descamação e perfuração do tegumento, destruição, perda de espinhos e rompimento de tubérculos, bem como inchaço na região das ventosas. Esses dados corroboram com os resultados de Riad et al. (2009), que investigaram as alterações tegumentares nos vermes adultos de *S. mansoni* recuperados de camundongos submetidos a tratamento com extrato de alho 50 mg/kg. Entre os danos tegumentares visualizados foram citados a destruição dos tubérculos e formação de edemas e vesículas. Ainda avaliando o alho (*A. sativum*), Lima et al. (2011) mostraram que a alicina (extraída do alho) 10, 15 e 20 mg/mL provocaram perfurações nos tubérculos e alterações nos espinhos, ulcerações e formação de vesículas e bolhas nos vermes machos, como também foi visto com as amostras de *P. amarus*.

Muitos estudos têm demonstrado que fármacos ativos contra *S. mansoni* causam danos graves no tegumento. No entanto, estudos nesse sentido foram mais intensos com o praziquantel, já que representa o fármaco mais utilizado no tratamento da esquistossomose. Já foi relatado que o PZQ causa rápidos e extensivos danos no tegumento dos vermes adultos, como o inchaço, perda ou encurtamento dos espinhos, bem como formação de vesículas (SHAW & ERASMUS, 1983; LIMA et al., 1994; REDA et al., 2012).

Ações semelhantes também foram encontradas em estudos com a oxamniquina. Kohn et al. (1982), observaram através da MEV que a oxamniquina produz alterações estruturais no verme ao nível do tegumento, da musculatura e do parêquima, com lesões do tipo “vesícula”. Magalhães-Filho et al. (1987), também observaram vacuolização, destruição dos tubérculos nos vermes machos e erosão (descamação) da superfície do tegumento.

Outros fármacos ainda em estudo também foram capazes de produzir alterações tegumentares. Shuhua et al. (2000), relataram que o artermeter provocou danos no tegumento dos machos e das fêmeas, havendo descamação do mesmo, sendo que

esses danos foram maiores nas fêmeas. Albuquerque et al. (2007), observaram que fármacos derivados do imidazole provocaram danos na ventosa oral do macho, além de redução e desorganização dos tubérculos. Nas fêmeas, observaram erosão do tegumento com descamação do mesmo e ruptura da superfície além de completo desaparecimento das estruturas sensoriais.

Assim sendo o tegumento do parasito é um importante marcador para testes com novos candidatos a fármacos esquistossomicidas.

## 6. Conclusões

## 6. CONCLUSÕES

### Ensaio *in vitro*:

As amostras com maior atividade esquistossomicida *in vitro* foram as Fr 3 (obtida da coluna seca do EEB) e as F2HEX e F2BuOH (obtidas da partição líquido-líquido). Estas frações foram as mais efetivas porque:

- Foram 100% letais para os vermes machos e fêmeas em 48, 72 e 48 horas, respectivamente;
- Provocaram separação dos casais, sendo esta mais acentuada para as F2HEX e F2BuOH;
- A suscetibilidade dos vermes machos e fêmeas foram iguais, não havendo ação preferencial por um dos sexos;
- Apresentaram os menores valores de DL ( $DL < 25$ );
- Não foi observada oviposição para nenhuma das amostras;
- Ocorreu alteração tegumentar em 100% dos vermes machos;
- Apesar das amostras F2HEX e F2BuOH terem apresentado resultados semelhantes *in vitro*, para a realização dos testes *in vivo* apenas a F2BuOH foi selecionada, pois apresentou uma ação mais rápida sobre os vermes adultos de *S. mansoni*;
- Apesar das lignanas não terem apresentado atividade esquistossomicida *in vitro*, a filantina, nirantina e filantina + fletetralina + nirtetralina também foram selecionadas para os ensaios *in vivo*, por estarem presentes na F2BuOH, acreditando-se que uma dessas lignanas ou um composto delas pode estar proporcionando a atividade esquistossomicida encontrada na F2BuOH;
- Foi observada a formação de uma da “vesícula” de sangue na proximidade das ventosas dos vermes fêmeas em contato com a lignana nirantina, sendo esta também selecionada para observar sua ação *in vivo*.

**Ensaio *in vivo*:**

- Diferentemente dos resultados dos testes *in vitro*, os ensaios *in vivo* mostraram que a associação de lignanas filantina + nirantina (1:1m/m), foi a mais efetiva nos dois períodos de tratamentos (45 e 60 dias após a infecção) para os parâmetros: redução do número total de vermes, de vermes fêmeas, de ovos e de granulomas. Esse resultado atestou que nem sempre há correspondência entre os dois tipos de ensaios;

- A lignana nirantina também ao contrário dos ensaios *in vitro*, se mostrou ativa no período de tratamento de 45 dias após a infecção, destacando a boa taxa de redução do número de ovos. Acredita-se que essa lignana tenha algum tipo de ação no aparelho reprodutor das fêmeas uma vez que, mesmo apresentando baixa taxa de redução de vermes no 60º dia de infecção, também mostrou redução significativa do número de ovos, portanto não há a patogenia no hospedeiro e disseminação ao meio ambiente.

- A MEV mostrou que todas as amostras de F2BuOH, filantina + nirantina, filantina + filtetralina + nirtetralina e nirantina provocaram *in vivo*, extensas alterações tegumentares nos vermes de *S. mansoni*, porém foram mais pronunciados nos vermes machos e menos evidentes ou não observados nos vermes fêmeas. Os machos ficaram mais expostos que as fêmeas, uma vez que foi encontrada maior quantidade de vermes acasalados nos testes *in vivo*.

- Na histologia dos fígados, foi visto que as amostras de *P. amarus* não atuaram na redução dos tamanhos dos granulomas em nenhum dos dois períodos, porém verificou diminuição significativa na quantidade deles para as amostras de filantina + nirantina e nirantina, após 45 dias de infecção;

- De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que as lignanas filantina+nirantina extraídas da planta *Phyllanthus amarus* apresentam atividade esquistossomicida sobre o *Schistosoma mansoni*, linhagem BH. Assim sendo, perspectivas futuras indicariam a necessidade de se otimizar a solubilidade e a

dosagem das lignanas, bem como padronizar a obtenção desses compostos, visando obter um fitoterápico com atividade anti-*S. mansoni*.



# 7. Referências Bibliográficas

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SHETA, M.; HASSAN, A. 2010. Efficacy of low-dose myrrh protocols in the treatment of experimental schistosomiasis mansoni: hepatic improvement without parasitologic cure. **Research and Reports in Tropical Medicine**. 1: 65-71.

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SHETA, M.; HASSAN, A. 2011. Artemether shows promising female schistosomicidal and ovicidal effects on the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* after maturity of infection. *Parasitology Research*. 108:1199–1205.

ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; IRMÃO, J. R.; PEIXOTTO, C. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. 2007. Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**. 26: 65-69.

ALLAM, G. 2009. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine *schistosomiasis mansoni*. **Immunobiology**. 214: 712-727.

ALLEGRETTI, S. M.; OLIVEIRA, C. N. F.; OLIVEIRA, R. N.; FREZZA, T. F.; REHDER, V. L. G. 2012. The use of brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*. In: **Schistosomiasis**. InTech Available from: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/the-use-of-brazilian-medicinal-plants-to-combat-schistosoma-mansoni>.

AMARAL, R. S.; TAUIL P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. 2006. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101(1): 79-85.

ANDRADE, Z. A. 1998. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 93 (1): 313-316.

ARENA, A. S. 1997. *Schistosoma mansoni*: atividade de oxamniquine e praziquantel em diferentes estágios de desenvolvimento das linhagens MAP e OuH *in vivo*. **[Dissertação de Mestrado]**. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

ATTA, A. M.; MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; PAREJA, G. 1981. Esquistossomose mansônica. I. Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. **Revista de Saúde Pública**. 15: 72-92.

BARAKAT, R.; ELMORSHEDY, H.; FENWICK, A. 2005. Efficacy of myrr in the treatment of human *schistomiasis mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 73: 365-367.

BASCH, P. F. & BASCH, N. 1984. Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 89:369-376.

BERTÃO, H. G.; SILVA, R. A. R.; PADILHA, R. J. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; Rádis-Baptista, G. 2012. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology Research**. 110: 2465-2473.

BONESSO-SABADINI, P. I. P. 1995. Avaliação da suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema – SP) de *Schistosoma mansoni* ao oxamniquine e praziquantel. [**Dissertação de Mestrado**]. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

BOROS, D. L.; PELLELY, R. P.; WARREN, K. S. 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. **The Journal of Immunology**. 114: 1437-1441.

BOTROS, S.; PICCA-MATTOCCIA, L.; WILLIAM, S.; EI-LAKKANI, N.; CIOLI, D. 2005. Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. **International Journal of Parasitology**. 35: 1453-1457.

BRAGUINE, C. G.; COSTA, E. S.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. 2009. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Zeitschrift für Naturforschung**. 64: 793-797.

CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.; CECHINEL FILHO, V; YUNES, R.A. 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Review**. 18:225–258.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. S. 2001. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. 6(2): 261-279.

CALIXTO, J. B. & SIQUEIRA-Jr, J. M. 2008. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. 78 (1): 98-106.

CANÇADO, J. R.; CUNHA, A. S.; CARVALHO, D. G.; CAMBRAIA, J. N. S. 1965. Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. **Bulletin of the World Health Organization**. 33: 557-566.

CAPRON, A. 1998. Schistosomiasis: Forty Year' War on the Worm. **Parasitology Today**. 14 (10): 379-384.

CECHINEL FILHO & YUNES. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. 21(1): 99-105.

CHAVES, A.; ALCANTÁRA, O. S.; CARVALHO, O. S.; SANTOS, J. S. 1979. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. **Revista de Saúde Pública**. 13: 348-352.

CHIEF, P. P.; WALDMAN, E. A. 1998. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 4(3): 257-275.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. 1993. Drug resistance in schistosomes. **Parasitology Today**. 9: 162-166.

CIOLI, D; PICA-MATTOCCIA, L. & ARCHERS, S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present...and future? **Pharmaceutical Therapy**. 68 (1): 35-85.

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

CIOLI, D.; BOTROS, S. S.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K.; MBAY A.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTÉ, L.A.T.; PICA-MATTOCCIA, L.; TROIAN, A, R..; SEIF EL-DIN, S. H.; SABRA, A.N.A. 2004. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **International Journal of Parasitology**. 34 (8): 979-987.

COLES, G. C. 1979. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**. 53: 31-33.

COLES, G. C.; BRUCE, J. I.; KINOTI, G. K.; MUTAHI, W. T.; DIAS, L. C.; ROCHA, R. S.; KATZ, N. 1987. The potential for drug resistance in schistosomiasis. **Parasitology Today**. 3 (11): 349-350.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. 1995. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª edição, editora UNICAMP, Campinas – São Paulo.

COURA, J. R. & AMARAL. 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99 (1): 13-19.

CUNHA, A. S. 1992. Schistosomiasis mansoni – Drug Therapeutic. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 87(4): 341-351.

CUNHA, A. S.; CANÇADO, R.; REZENDE, G. L. 1987. Therapeutical evaluation of different dose regimens of praziquantel in schistosomiasis mansoni, based on the quantitative oogram technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 29: 295-304.

CUNHA, A. S.; CARVALHO, D. G. 1966. Estudo do método do oograma quantitativo na esquistossomose mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 8: 113-121.

DAPPER, D. V.; AZIAGBA, B. N. & EBONG, O. O. (2007). Antiplasmodial effects of the aqueous extract of *Phyllanthus amarus* Schumach and Thonn against *Plasmodium berghei* in swiss albino mice. 2007. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**. 22 (1-2): 19-25.

DAVIS, B.H.; KRESINA, T.F. 1996. Hepatic fibrogenesis. **Clinics Laboratory Medicine** 16(2): 361-375.

DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. 1992. 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**. 78: 648-654.

DIAS, L. C. S.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M.; MAFRA, G. L. 1978. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. **Revista de Saúde Pública**. 12: 110.

DOENHOFF, M. J.; KUSEL J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there problem? **Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 96(5): 465-469.

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

DRESCHER, K. M.; ROGERS, E. J.; BRUCE, J. I.; KATZ, N.; DIAS, L. C.; COLES, G. C. 1993. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 88(1): 89-95.

EL BAZ, M. A.; MORSY, T. A.; EL BANDARY, M. M.; MOTAWEA, S. M. 2003. Clinical and parasitological studies on the efficacy of Mirazid in treatment of schistosomiasis haematobium in Tatoon, Etsa Center, El Fayoum Governorate. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 33: 761-767.

EL-LAKKANY, N. M.; SHEIF el-DIN, S. H.; BADAWY, A. A.; EBEID, F. A. 2004. Effect of artemether alone and in combination with grapefruit juice on hepatic drug-metabolising enzymes and biochemical aspects in experimental *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Parasitology**. 34: 1405-1412.

EL SHENAWY, N. S.; SOLIMAN, M. F. M.; REYAD, S. I. 2008. The effect of antioxidant properties of aqueous extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 50: 29-36.

ERASMUS, D. A. 1973. A comparative study of the reproductive system of mature, uimmature and “unisexual” female *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 67: 165-183.

FALLON, P. G. & DOENHOFF, M. J. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 53: 61-62.

FARIA, J. L. 1999. Aparelho Digestivo: esquistossomose em geral. **In: Patologia Especial com Aplicações Clínicas**. Guanabara-Koogan, 2 ed., Cap. 9, 362-381.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ATUNES, C. A. P.; TAVARES, A. S.; CUNHAS, A. S. 2003. Efficacy of oxaminiquine ando praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**. 81: 190-196.

GALVÃO, A. F. 2010. **Impacto do tratamento com praziquantel na infecção por *Schistosoma mansoni* em adolescentes do município de São Lourenço da Mata, área endêmica da esquistossomose em Pernambuco. Tese de Mestrado em Biologia Parasitária**, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B. 2000. Anthelmintic resistance in human helmiths: a review. **Tropical Medicine and International Health**. 06(2): 915-921.

GIBODA, M. & SMITH, M. J. 1994. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for praziquantel: efficacy of oral application in mice. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 97: 98-102.

GONNERT, R. & ANDREWS, P. 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research**. 52: 129-150.

GRAY, D. J.; McMANUS, D. P.; LI, Y. S.; WILLIAMS, G. M.; BERGGUIST, R.; ROSS, A. G. 2010. Schistosomiasis elimination lessons from the past guide the duture. **The Lancet Intectious Diseases**. 10: 733-736.

GREVELDING, C. G.; SOMMER, G.; KUNZ W. 1997. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. **Parasitology**. 115: 635-640.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. 2006. Human Schistosomiasis. **The Lancet**. 368: 1106-1118.

- HERMETO, M. V.; BICALHO, R. S.; SILVA, R. E.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. 1994. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 36(2): 99-103.
- HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D., SAVIOLI, L. 2007. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of medicine**. 357:1018-1027.
- HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D. H. 2009. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **The Lancet**. 373: 1570-1575.
- INCANI, R.N.; MORALES, G.; CESARI, I.M. (2001). Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**. 87(2):131–137.
- ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. 1996. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 55: 214-218.
- JACKSON, F. & COOP, R. L. 2000. The development of Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**. 120(1): 95-107.
- JATSA, H. B.; NGO SOCK, E. T.; TCHUEM TCHUENTE, L. A.; KAMTCHOUING, P. 2009. Evaluation of the in vivo activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. 6: 216-221.
- JIRAUNGKOORSKUL, W., SAMPHONG, S., SABHON, P., RIENGROJPITAK, S., KANGWANRANGSAN, N. 2005. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. **Parasitology International**. 54: 177- 183.
- JIRAUNGKOORSKUL, W, SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. 2006. *Schistosoma mekongi*: the in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. **Experimental Parasitology**. 113(1): 16-23.
- JOSEPH, B. & RAJ, S. J. 2011. An overview: Pharmacognostic properties of *Phyllanthus amarus* Linn. **International Journal of Pharmacology**. 7(1): 40-45.
- KAMEL, E. G.; EL-EMAM, M. A.; MAHMOUD, S. S. M.; FOU DA, F. M.; BAYAUMY, F. E. 2011. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*- infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosoides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. **Parasitology International**. 60(4): 388-392.

KARUNA, R., REDDY, S.S., BASKAR, R.; SARALAKUMARI, D. 2009. Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats. **Indian Journal of Pharmacology**. 41(2):64-67.

KASSUYA, C. A., SILVESTRE, A. A., REHDER, V. L.; CALIXTO, J. B. 2003. Anti-allodynic and anti-edematous properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. 478(2-3): 145-153.

KASSUYA, C. A.; REHDER, V. L. G.; MELO, L. V.; SILVESTRE, A. A.; CALIXTO, J. B. 2005. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta Medica**. 71(8): 721-726.

KASSUYA, C. A.; SILVESTRE, A. A.; MENEZES DE LIMA Jr., O.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. 2006. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus* Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**. 546: 182-188.

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

KATZ, N.; DIAS, P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. 1973. Estudo de uma cepa de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 7: 381-387.

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

KATZ N. 2008a. Terapêutica clínica na Esquistossomose Mansonii. *In: Schistosoma mansoni & Esquistossomose uma visão multidisciplinar*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro – RJ. Cap. 29: 849-870.

KATZ, N. 2008b. Terapêutica experimental da esquistossomose mansonii. *In: Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro – RJ. Cap.28: 823-847.

KATZ, N. & COELHO, P.M.Z. 2008. Clinical therapy of schistosomiasis mansonii: the brazilian contribution. **Acta Tropica**. 108: 72–78.

KEISER, J. 2010. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. **Parasitology**. 137: 589-603.



KHAN, S.; AL-QURAINY, F.; RAM, M.; AHMAD, S.; ABDIN, M. Z. 2010. Phyllanthin biosynthesis in *Phyllanthus amarus*: Schum and Thonn growing at different altitudes. **Journal of Medicinal Plants Research**. 4(1): 41-48.

KHAN, S.; SINGLA R. K.; ABDIN, M. Z. 2011. Assessment of phytochemical diversity in *Phyllanthus amarus* using HPTLC fingerprints. **Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1(1): 1-12.

KHATOON, S.; RAI, V.; RAWAT, A. K. S. R.; MEHROTA, S. 2006. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **Journal of Ethnopharmacology**. 104(1-2): 79-86.

KOHN, A.; SERAPIAO, C. J.; KATZ, N.; DIAS, E. P. 1979. Ação do oxamniquine sobre o *Schistosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 21: 217-227.

KOHN, A.; LÓPEZ-ALVAREZ, M. L.; KATZ, N. 1982. Transmission and scanning electron microscopical studies in the tegument of male *Schistosoma mansoni* after oxamniquine treatment. **Annals Parasitology Human**. 57: 285-291.

KING, C. H.; MUCHIRI, E. M.; OUMA, J. H. 2000. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. **Emerging Infectious Disease Journal**. 6(6): 585-588.

KING, C. H. 2009. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Tropica**. 113: 95-104.

KIRAN, D.; ROHILLA, A.; ROHILLA, S.; KHAN, M. U. 2011. Pleiotropic Multifaceted Therapeutic Potential of *Phyllanthus amarus*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**. 2(2): 610-614.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethnopharmacology**. 99: 302-312.

KÖHLER, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal of Parasitology**. 31: 336-345.

KOMURIAH, A.; BOLLA, K.; RAO, K. N.; RAGAN, A.; RAJU, V. S.; CHARYA, M. A. S. 2009. Antibacterial studies and phytochemical constituents of South Indian *Phyllanthus* species. **African Journal of Biotechnology**. 8(19): 4991-4995.

KRITHIKA, R., MOHANKUMAR, R., VERMA, R. J., SHRIVASTAV, P. S., MOHAMED, I. L., GUNASEKARAN, P.; NARASIMHAN, S. 2009. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in HepG2 cell line. **Chemico-Biological Interactions**. 181: 351-358.

KUNZ, W. 2001. Schistosome male–female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends in Parasitology**. 17(5): 227-231.

LAMBERTUCCI, J. R. 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 105(4): 422-435.

LESCANO, S. Z.; CHIEFF, P. P.; CANHASSIS, R. R.; BOULOS, M.; AMATO-NETO, V. 2004. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Revista de Saúde Pública**. 38(1): 71-75.

LIANG, Y. S.; COLES, G.; DOENHOFF, M. J.; VAUGHAN, R. S. 2001. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**. 31:1227-1235.

LIMA, S. F. L. Q.; VIEIRA, A. H.; KUSEL, J. R. 1994. Altered behavior of carbohydrate-bound molecules and lipids in áreas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damaged by praziquantel. **Parasitology**. 109: 469-477.

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. 2011. 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**. 44: 327- 330.

LOPEZ, C. A. A. 2006. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. 1(1): 19-27.

MACHADO E SILVA, J. R. M.; LIMA, M. A. D.; RODRIGUES E SILVA, R.; MALDONADO Jr., A.; PRESGRAVE, O. A. F.; REY, L. 1993. Comparative study on the localization of adult *Schistosoma mnasoni* worms in albino mice anesthetized with pentobarbital sodium, ether or chlorophorm. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 35(4): 323-326.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. 25(3): 429-438.

MAGALHÃES-FILHO, A.; BEZERRA-MELO, M. E.; PADOVAN, P. A.; PADOVAN, I. P. *Schistosoma mansoni*: structural damage after treatment with oxamniquine. 1987. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82(4):347-352.

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. 2009. *In vitro*

schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**. 104: 1197-1201.

MAGALHÃES, L. G.; KAPADIA, G. J.; TONUCCI, L. R. S.; CAIXETA, S. C.; PARREIRA, N. A.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A. 2010. *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adults worms. **Parasitology Research**. 106: 395-401.

MAGHRABY, A. S.; SHALABY, N.; ABD-ALLA, H. I.; AHMED, S. A.; KHALED, H. M.; BAHGAT, M. M. 2010. Immunostimulatory effects of extract of *Pulicaria crispata* before and after *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**. 67(1): 75-79.

MAHMOUD, M. R.; EL-ABHAR, H. S.; SALEH, S. 2002. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 79(1): 1-11.

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

MANTAWY, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. 2011. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 53: 155-163.

MARTINEZ, E. M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F.; MACHADO-SILVA, J. R.; REY, L. 2003. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (5): 557-564.

MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; PRENKEL, J.K. 1981. *In vitro* and *in vivo* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopy study. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**. 31: 544-554.

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. 2011a. Potential effects of Cramoll 1, 4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**. 118: 152-158.

MELO, N. I.; MAGALHAES, 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. C. S.; CROTTI, A. E. M. 2011b. Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **Molecules**. 16: 762-773.

METWALLY, N. S. 2006. Potency of *Allium sativum* and *Allium cepa* Oils against *Schistosoma mansoni* Infection in Mice. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**. 23: 319- 332.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2005. Esquistossomose mansônica. *In: Guia de vigilância epidemiológica - Esquistossomose mansônica - Série A: Normas e manuais técnicos*. 6ª ed. 297-306. Ministério da Saúde: Brasília.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – Brasília.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2009. **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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. *Revista de Saúde Pública*. 44(1): 200-202.

MIRANDA, M. A.; MAGALHÃES, L. G.; TIOSSI, R. F. J.; KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L. G. R.; RODRIGUES, V.; MCCHESENEY, J. D.; BASTOS, J. K. 2012. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology research**.

MITSUI, Y.; MIURA, M.; AOKI, Y. 2009. *In vitro* effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**. 83: 7-11.

MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. 2005. *SATIVA* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(2): 205-211.

MOHDA, J.; REDMAN, C. A.; THORNHILL, J. A.; KUSEL, J. R. 1998. Unanswered questions on the basic biology of the host-parasite relationship. **Parasitology Today**. 14 (10): 396-401.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**. 83: 757-766.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. 2011a. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**. 127(2): 357-364.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M. C. V.; LEITE, J. R. S. A.; NAKANO, E.; KAWANO, T. 2011b. Evaluation of the *in vitro* Activity of Dermaseptin 01, a Cationic Antimicrobial Peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**. 8: 548-558.

MOSTAFA, O.M.S & SOLIMAN, M. I. 2010. Ultrastructure 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)**. 22: 111–121.

MOURÃO, S. C. 2001. Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo.

NATIONAL TRAVEL HEALTH NETWORK AND CENTRE. Disponível em: <http://www.nathmac.org/2008>. Acesso: 2012.

NEVES, J. K. A. L.; LIMA, M. C. A.; PEREIRA, V. R. A.; MELO, C. M. L.; PEIXOTO, C. A.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; GALDINO, S. L. 2011. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. **Experimental Parasitology**. 128: 82–90.

NOTKA, F., MEIER, G.; WAGNER, R. 2004. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication *in vitro* and *ex vivo*. **Antiviral Research**. 64(2): 93-102.

OLIVEIRA, R. N., REHDER, V. L. G., OLIVEIRA, A. S. S., MONTANARI-Jr., I., CARVALHO, J. E., RUIZ, A. L. T. G., JERALDO, V. L. S., LINHARES, A. X., ALLEGRETTI, S. M. 2012. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Parasitology Research**. *In press*

OLIVER, L.; STIREWALT, M. A. 1952. An efficient method for exposure of mice to cercária of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**. 38: 19-23.

PARAENSE, W. B. 2008. Histórico do *Schistosoma mansoni*, In: ***Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro – RJ. Cap. 1: 31-41.

PARISE-FILHO, R. & SILVEIRA, M. A. B. 2001. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 37: 123-135.

PARISE FILHO, R., de SOUZA, T. M., ARAÚJO, M. B., FERNANDES, A. N., SILVEIRA, M. A. B. 2001. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas

especialidades farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 37: 61-72.

PEARCE, E. J. & MACDONALD, A. S. 2002. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews – Immunology**. 2: 499–451.

PELLEGRINO, J.; LIMA-COSTA, F. F.; CARLOS, M. A.; MELLO, R. T. 1977. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*: XIII. Activity of praziquantel, na isoquinoline-pyranzino derivate on mice, hamsters and cebus monkeys. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research**. 52:151-168.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAIS, D. R.; CAIXETA, S. C.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A. A. 2010. Antiprotozoal, Schistosomicidal, na Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**. 7: 993-1001.

PASSOS, A. D. C. 1998. Controle da esquistossomose. **Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde**. 1-71.

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

PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 11:201-215.

PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; MELLO, R. T.; PILÓ-VELOSO, D.; OLIVEIRA, M. C.; KUSEL, J. R.; NELSON, D. L. 2008. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica**. 108: 249-255.

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

POPIEL, I.; CIOLI, D.; ERASMUS, D. A. 1984. The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. **International Journal of Parasitology**. 14: 183-190.

POPIEL, I.; BASCH, P. F. 1984. Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. **Journal Experimental of Zoology**. 232: 141-150.

PORDEUS, L. C., AGUIAR, L. R., QUININO, L. R. M., BARBOSA, C. S. 2008. The Occurrence of Acute and Chronic Froms of the Schistosomiasis Mansonic in Brazil from

1997 to 2006: A Revision of Literature. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, 17:163-175.

PRAMYOTHIN, P., NGAMTIN, C., POUNGSHOMPOO, S.; CHAICHANTIPYUTH, C. 2007. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**. 114(2): 169-173.

PRATA, A. 1957. Tipos de ovos de *Schistosoma mansoni*. In: **Biópsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; p.15-60.

RAJESHKUMAR, N. V & KUTTAN, R. 2000. *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**. 73: 215-219.

RAJESHKUMAR, N. V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; KUTTAN, R. 2002. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 81: 17-22.

RAMIREZ, B.; BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M.A.; NWAKA, S. 2007. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opinion Drug Discovery**. 2(1):S53-S61.

RAMOS, J. A. 2004. Ações da desametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos. **[Dissertação de Mestrado]**. Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, UFRJ-Rio de Janeiro.

RAPHAEL, K. R & KUTTAN, R. 2003. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 87: 193-197.

RAPHAEL, K. R., SABU, M. C.; KUTTAN, R. 2002. Hypoglycemic effect of methanol extract of *Phyllanthus amarus* Schumach and Thonn on alloxan induced *diabetes mellitus* in rats and its relation with antioxidant potential. **Indian Journal of Experimental Biology**. 40(8): 905-909.

REDA, E. S.; OUHTIT, A.; ABDEEN, S. H.; EL-SHABASY, E.A. 2012. Structural changes of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from C57BL/6 mice treated with radiation-attenuated vaccine and/or praziquantel against infection. **Parasitology Research**. 110: 979–992.

REDE GENOMA DE MINAS GERAIS. Disponível em: [rgmg.cpqrr.fiocruz.br](http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br). 2012.

RIAD, N. H. A.; TAHA, H. A.; MAHMOUD, Y. I. 2009. Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study. **Tropical Biomedicine**. 26(1): 40–50.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. 2006. Schistosmiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**. 99: 505-521.

ROGERS, H. S & BUEDING, E. 1971. Hycanthone Resistance: Development in *Schistosoma mansoni*. *Science*. 172 (3987): 1057 – 1058.

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

SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. 1983. *Schistosoma mansoni*: the effects of a subcurative dose of praziquantel on the ultrastructure of worms *in vivo*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research**. 69: 73-90.

SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. 1987. *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after *in vivo* treatment with praziquantel. **Parasitology**. 94: 243-254.

SHEIR, Z.; NASR, A. A.; MASSOUD, A.; SALAMA, O.; BADRA, G. A.; EL-SHENNAWY, H.; HASSAN, N.; HAMMAD, S. M. 2001. A safe, effective, herbal antischistosomal therapy derived from myrrh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 65(6): 700-704.

SHOEMAKER, R. H. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Review Cancer**. 6: 813-823.

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

SILVA, M. S. 2002. Avaliação Farmacológica de Plantas Medicinais de Uso Popular no Povoado Colônia Treze em Lagarto, SE. In: **I Congresso Internacional sobre Desenvolvimento e Meio Ambiente**. Fortaleza.

SILVA, F.L. 2008. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni***. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife- Pernambuco.

SILVA, L. C. S.; MACIEL, P. E.; RIBAS, J. G. R.; PEREIRA, S. R. S.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, L. M.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. 2004. Mielorradiculopatia



esquistossomótica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 37(3): 261-272.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute.** 82(13): 1107-1118.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA-JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A.P. 2011. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica.** 9(4): 300-307.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. 2006. Schistosomes and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases.** 6: 411-425.

STELMA, F. F.; TALLA, I.; SOW, S.; KONGS, A.; NIANG, M.; POLMAN, K.; DEEDLER, A. M.; GRYSEELS, B. 1995. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 53:167–170.

STELMA, F. F.; SALL, S.; DAFF, B.; SOW, S.; NIANG, M.; GRYSEELS, B. 1997. Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. **Journal of Infectious Diseases.** 176:304–307.

TANABE, M. 2003. Haemostatic abnormalities in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Parasitology International** 52 (4): 351-359.

TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A. M. 2003. O Gênero *Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae*) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasil.** 17: 265-278.

UTZINGER, J. & KEISER, J. 2004. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. **Expert Opinion on Pharmacotherapy.** 5: 263-285.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. 2003. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** 47(5):1487-1495.

UTZINGER, J.; RASO, G.; BROOKER, S.; de SAVIGNY, D.; TANNER, M.; ORNBJERG, N.; SINGER, B. H.; N'GORAN, E. K. 2009. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology.** 136: 1859-1874.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. 2011. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**. 120S: S121-S137.

VARANDA, E. A. 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 27(1): 1-7.

VALENÇA, P. L. F. 2000. Esquistossomose mansoni humana: Influência da IL-10 no fenótipo celular do granuloma *in vitro*. **[Tese de Doutorado]**. Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

VEIGA Jr., V. F. E., & PINTO, A. C. 2005. Plantas Medicinais: Cura segura?. **Química Nova**. 28:519- 528.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES M.A.; CAMPELO Y.D.; VIEIRA, M.M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M.C.; LEITE, J.R.; MORAES, J. 2012. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**. 19:1- 8.

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

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

XIAO, S. H.; HOTEZ, P. J.; TANNER, M. 2000. 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**. 31: 724-732.

XIAO, S.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; CHEN, M.; ZHENG, J. 2002. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Tropica**. 82: 175-181.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DOING, Y.; ENDRISS, Y.; VENNERTSTROM, J. L.; TANNER, M. 2007. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51: 1440-1445.

WAGNER, H.; BLADT, S. 1996. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2th. Berlin: Springer.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. 2011. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**. 16(1): 39-62.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. **Schistosomiasis**. Bulletin of world health organization. 6 (2): 150-151.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004. **World health report 2004: changing history**. Geneva: WHO.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2006. **Neglected Tropical Disease hidden successes, emerging opportunities**. 1-52.

YOLLES, T. K.; MOORE, P.V.; DE GINSTI, D.L.; RIPSON, C.A.; MELENEY, H.E. 1947. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **Journal of Parasitology**. 33: 419-26.

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

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. 1993. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Revista de Saúde Pública**. 27(6): 412-420.

# ANEXO



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

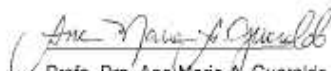
CERTIFICADO


Certificamos que o Protocolo nº 1901-1, sobre "Estudo da atividade dos compostos do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* L. contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 17 de julho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1901-1, entitled "Study of the activity of isolated compounds from *Phyllanthus amarus* L. ethanolic extract against *Schistosoma mansoni* BH strain", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 17, 2009.

Campinas, 17 de julho de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraído  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA - Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6399  
E-mail: [comisab@unicamp.br](mailto:comisab@unicamp.br)  
<http://www.fi.unicamp.br/ceea/>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado "Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade de frações e compostos isolados do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH:

( ) 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. 1901-1, Instituição: CEMIB/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.*

*Claudineide N F de Oliveira*

Aluno: Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira

*Silmara Marques Allegretti*

Orientador: Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

*ANA MARIA APARECIDA GUARALDO*  
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura