



PAULO EUZÉBIO RUBBO DOS SANTOS

**Estudo da composição química e avaliação da atividade
esquistossomicida do extrato etanólico e frações das folhas de
Phyllanthus amarus Schum and Thonn (Euphorbiaceae)**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULO EUZÉBIO RUBBO DOS SANTOS

**Estudo da composição química e avaliação da atividade
esquistossomocida do extrato etanólico e frações das folhas de**

Phyllanthus amarus Schum and Thonn (Euphorbiaceae)

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pelo candidato

Paulo Euzébio Rubbo dos Santos

e aprovada pela Comissão examinadora

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do Título
de Mestre em Biociências e Tecnologia de
Produtos Bioativos, na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde

A handwritten signature in blue ink, reading "Vera Lúcia Garcia Rehder", is positioned above the name of the supervisor.

Orientadora: Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Santos, Paulo Euzébio Rubbo dos, 1959-
Sa59e Estudo da composição química e avaliação da atividade esquistosomicida do extrato etanólico e frações das folhas de *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn (Euphorbiaceae) / Paulo Euzébio Rubbo dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Vera Lucia Garcia Rehder.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Phyllanthus amarus*. 3. Lignanas. 4. Acido alfa-linolênico. I. Rehder, Vera Lucia Garcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of chemical composition and evaluation of antischistosomal activity of the ethanol extract and fractions of leaves of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn (Euphorbiaceae)

Palavras-chave em inglês:

Schistosoma mansoni

Phyllanthus amarus

Lignans

Alpha-linolenic acid

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Vera Lúcia Garcia Rehder [Orientador]

Lizandra Guidi Magalhães

Carmen Lucia Queiroga

Data de defesa: 19-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

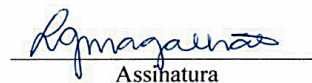
Campinas, 19 de julho de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Vera Lucia Garcia Rehder (orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Lizandra Guidi Magalhães


Assinatura

Dra. Carmen Lucia Queiroga


Assinatura

Profª. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Assinatura

“ Ignorance more frequently begets confidence than does knowledge: it is those who know little, and not those who know much, who so positively assert that this or that problem will never be solved by science.”

Charles Darwin

RESUMO

A esquistossomose, parasitose causada pelo *Schistosoma mansoni*, atinge mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, estimando-se que este número chegue a 6 milhões no Brasil. O fármaco de escolha em todo o mundo e para todas as espécies de *Schistosoma* é o praziquantel que, embora ainda se mostre eficiente, não possui boas alternativas para os crescentes casos de resistência que tem surgido nos últimos anos. O grande número de substâncias farmacologicamente ativas dentre os produtos naturais mostra grande potencial para a descoberta de alternativas para o praziquantel. O *Phyllanthus amarus* conhecido no Brasil como *Quebra-Pedra* é notório pelas diversas aplicações na medicina natural, apresentando, dentre outras substâncias ativas, grande variedade de lignanas, classe química com diversas ações farmacológicas comprovadas como, por exemplo, ação anti-inflamatória, antiviral, bactericida e esquistossomicida. Este estudo teve como objetivo o isolamento e identificação das substâncias ativas presentes nas folhas de *P. amarus*, através de ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro*. Para estes testes foi desenvolvido um procedimento para incorporação das amostras em polivinilpirrolidona (PVP) para garantir a solubilização das mesmas no meio aquoso de manutenção dos vermes. O extrato etanólico foi inicialmente fracionado por partição líquido-líquido com hexano-acetonitrila. A fração acetonitrila, mais ativa, foi fracionada por cromatografia em coluna clássica, com Florisil®. As substâncias identificadas nas frações mais ativas (nirantina, 5-demetoxinirantina e ácido linolênico) foram testadas em concentrações de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A 5-demetoxinirantina provocou a morte de 60% dos vermes machos e 40% das fêmeas na dosagem de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 72 horas; a nirantina matou 40% dos vermes machos na dosagem de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 24 horas; o ácido linolênico foi fatal para 100% dos vermes machos e fêmeas na dosagem de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 24 horas. O controle de oviposição foi total para todas as frações e substâncias testadas, mesmo no caso da filantina e hipofilantina que não demonstraram qualquer efeito sobre a mortalidade. Estes resultados sugerem a potencial eficácia destas substâncias para uma formulação a ser testada *in vivo*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, *Phyllanthus amarus*, Lignanas, ácido linolênico.

ABSTRACT

The schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* parasitosis, reaches over 200 million people worldwide, it is estimated that this number will reach 6 million in Brazil. The drug of choice around the world for all the species of *Schistosoma* is praziquantel that of though proven effective does not have good alternatives for increasing resistance cases it has appeared. The large number of pharmacologically active substances from the natural products shows great potential for the discovery of an option for praziquantel. The *Phyllanthus amarus* known in Brazil as “Quebra-Pedra” is notorious for various applications in natural medicine, featuring, among other active ingredients, a variety of lignans, chemical class with proven pharmacological activities, eg, anti-inflammatory, antiviral, and bactericidal and antischistosomal. This study aimed to the extraction of the active substances, followed by fractionation guided by *in vitro* bioassays. For these tests has been developed a procedure for incorporation of samples into polyvinylpyrrolidone to ensure solubilization thereof in the *Schistosoma* aqueous medium. The ethanolic extract was initially fractionated by liquid-liquid partition with hexane-acetonitrile. The acetonitrile fraction, the most active, was fractionated by classical column chromatography with Florisil® as stationary phase and solvent mixtures with increasing polarity as mobile phase. The substances identified in the most active fractions (niranthin, 5-demethoxyniranthin and linolenic acid) were tested at concentrations of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A 5-demethoxyniranthin caused the death of 60% of males and 40% females in the dosage of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 72 hours, the niranthin killed 40% of males at doses of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 24 hours; linolenic acid was fatal to 100% of males and females at a dose of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 24 hours. The control of oviposition was complete for all tested fractions and substances, even in the case of phyllanthin and hipophyllanthin that showed no effect on mortality. These results suggest the potential efficacy of these substances for a formulation to be tested *in vivo*.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, *Phyllanthus amarus*, Lignans, linolenic acid.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Prevalência da esquistossomose.....	1
1.2.	Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i>	2
1.3.	Fármacos utilizados.....	4
1.4.	Alternativas naturais.....	6
1.5.	Lignanas.....	6
1.6.	<i>Phyllanthus amarus</i>	9
2.	OBJETIVOS.....	12
2.1.	Objetivo geral.....	12
2.2.	Objetivos específicos.....	12
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1.	Estudos fitoquímicos.....	13
3.1.1.	Reagentes.....	13
3.1.2.	Equipamentos.....	13
3.1.3.	Material vegetal.....	13
3.1.4.	Obtenção dos extratos etanólicos.....	13
3.1.5.	Partição líquido-líquido com hexano-etanol-água.....	15
3.1.6.	Partição líquido-líquido com hexano-acetonitrila.....	15
3.1.7.	Fracionamento cromatográfico da fração FA	16
3.1.8.	Derivatização dos ácidos carboxílicos com diazometano.....	17
3.1.9.	Métodos de análises.....	17
3.1.9.1.	Cromatografia em Camada Delgada.....	17
3.1.9.2.	Cromatografia a Gás com Detector de Massas.....	17
3.2.	Estudo de dispersão em polivinilpirrolidona (PVP).....	18
3.3.	Testes <i>in vitro</i>	18
3.3.1.	Atividade esquistossomicida.....	18
3.3.2.	Atividade citotóxica.....	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1.	Extratos etanólicos (EE).....	25
4.1.1.	Estudos Fitoquímicos dos extratos EE.....	25
4.1.1.1.	CCD dos extratos EE.....	25
4.1.1.2.	GC-EM dos extratos EE.....	26

4.1.2.	Testes <i>in vitro</i> do extrato EE.....	34
4.1.2.1.	Dispersão sólida com PVP do extrato EE.....	35
4.1.2.2.	Atividade esquistosomicida do extrato EE.....	35
4.2.	Partição líquido-líquido.....	37
4.2.1.	Estudos Fitoquímicos das partições líquido-líquido.....	37
4.2.1.1.	CCD da partição hexano-etanol-água e hexano- acetonitrila.....	37
4.2.1.2.	CG-EM da partição hexano-etanol-água e hexano-acetonitrila.....	38
4.2.2	Atividade esquistosomicida das frações FE, FH1, FA, FH2 e RI.....	40
4.3.	Fracionamento cromatográfico da fração FA.....	43
4.3.1	Estudos Fitoquímicos da fração FA.....	43
4.3.1.1.	CCD do fracionamento cromatográfico da fração FA.....	43
4.3.1.2.	GC-EM do fracionamento cromatográfico da fração FA.....	46
4.3.2.	Atividade esquistosomicida do fracionamento cromatográfico da fração FA.....	48
4.4	Atividade esquistosomicida das lignanas e ácido linolênico.....	51
4.5	Atividade citotóxica.....	53
5.	CONCLUSÕES.....	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7.	ANEXOS	69
7.1	Anexo 1 Espectros de massas.....	69
7.1.1	Espectro de massas do Ácido palmítico (1).....	69
7.1.2	Espectro de massas do Ácido linoleico (2).....	69
7.1.3	Espectro de massas do Ácido linolênico (3).....	70
7.1.4	Espectro de massas da Filtertralina (6).....	70
7.1.5	Espectro de massas da Nirtetralina (7).....	71
7.1.6	Espectro de massas da Lignana 10.....	71
7.1.7	Espectro de massas da Lignana 11.....	72
7.1.8	Espectro de massas da Lignana 12.....	72
7.1.9	Espectro de massas da Lignana 13.....	73
7.1.10	Espectro de massas da Lignana 14.....	73
7.2	Anexo 2 Protocolo CEUA.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial dos diversos tipos de esquistossomose.....	2
Figura 2	Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i>	3
Figura 3	Praziquantel.....	4
Figura 4	Artemether.....	6
Figura 5	Substâncias naturais com ação farmacológica comprovada.....	7
Figura 6	Rota biossintética da lignana podofilotoxina.....	8
Figura 7	<i>Phyllanthus amarus</i>	10
Figura 8	Placa para teste <i>in vitro</i>	19
Figura 9	Fluxograma das extrações e fracionamentos.....	23
Figura 10	Substâncias identificadas em <i>Phyllanthus amarus</i>	24
Figura 11	CCD dos extratos etanólicos 1 e 2.....	25
Figura 12	Cromatogramas dos extratos EE1 e EE2.....	26
Figura 13	Cromatograma do EE1 metilado.....	27
Figura 14	Espectro de massas da 5-demetoxinirantina.....	29
Figura 15	Espectro de massas da filantina.....	29
Figura 16	Espectro de massas da hipofilantina.....	30
Figura 17	Espectro de massas da nirantina.....	30
Figura 18	Esquema de fragmentação da nirantina.....	31
Figura 19	Esquema de fragmentação da hipofilantina.....	32

Figura 20	Lignanas com padrões de fragmentação semelhantes às lignanas 10, 11, 12 e 13.....	33
Figura 21	Efeito dos EE com e sem PVP, PZQ e PVP sobre a oviposição de <i>S.mansoni</i>	37
Figura 22	CCD de extrato etanólico; fração etanólica e fração hexânica 1 da partição hexano:etanol; fração em acetonitrila e fração hexânica 2 da partição hexano:acetonitrila.....	38
Figura 23	Cromatogramas das substâncias voláteis das partições hexano:etanol (FH1 e FE) e hexano:acetonitrila (FH2 e FA).....	39
Figura 24	Microfotografia eletrônica de <i>S.mansoni</i> do grupo controle e tratados com FA.....	42
Figura 25	Efeito das frações FE, FH1, FA, FH2 e RI sobre a oviposição de <i>S.mansoni</i>	43
Figura 26	Comparação dos fracionamentos obtidos em sílica e Florisil® da fração FA.....	44
Figura 27	CCD das frações obtidas por cromatografia em Florisil®.....	45
Figura 28	de produção de ceramida por ativação da esfingomielinase (nSM) na membrana celular.....	50
Figura 29	Gráficos de mortalidade acumulada das lignanas e ácido linolênico isolados e em associação.....	51
Figura 30	Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações da partição líquido - líquido em acetonitrila:hexano contra a linhagem de queratinócito humano HaCat.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lignanas isoladas e identificadas em diversas espécies de <i>Phyllanthus</i>	9
Tabela 2	Identificação e composição de solventes das frações recolhidas na eluição da FA em coluna de Florisil®	16
Tabela 3	Principais fragmentos observados nos espectros de massas das substâncias presentes em <i>P. amarus</i>	28
Tabela 4	Porcentagem relativa das lignanas nos extratos etanólicos 1 e 2.....	34
Tabela 5	Mortalidade acumulada de <i>S. mansoni</i> machos e fêmeas com extrato etanólico formulado com PVP.....	36
Tabela 6	Lignanas presentes nas diferentes frações e suas porcentagens relativas após partição do EE em hexano-etanol-água e hexano:acetoneitrila.....	40
Tabela 7	Mortalidade acumulada de <i>S. mansoni</i> machos e fêmeas com frações obtidas das partições líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>P. amarus</i>	41
Tabela 8	Composição aproximada das substâncias voláteis nas frações obtidas por cromatografia em Florisil® e analisadas por CG/EM.....	47
Tabela 9	Mortalidade acumulada de <i>S. mansoni</i> machos e fêmeas com frações obtidas da cromatografia em coluna de Florisil®.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

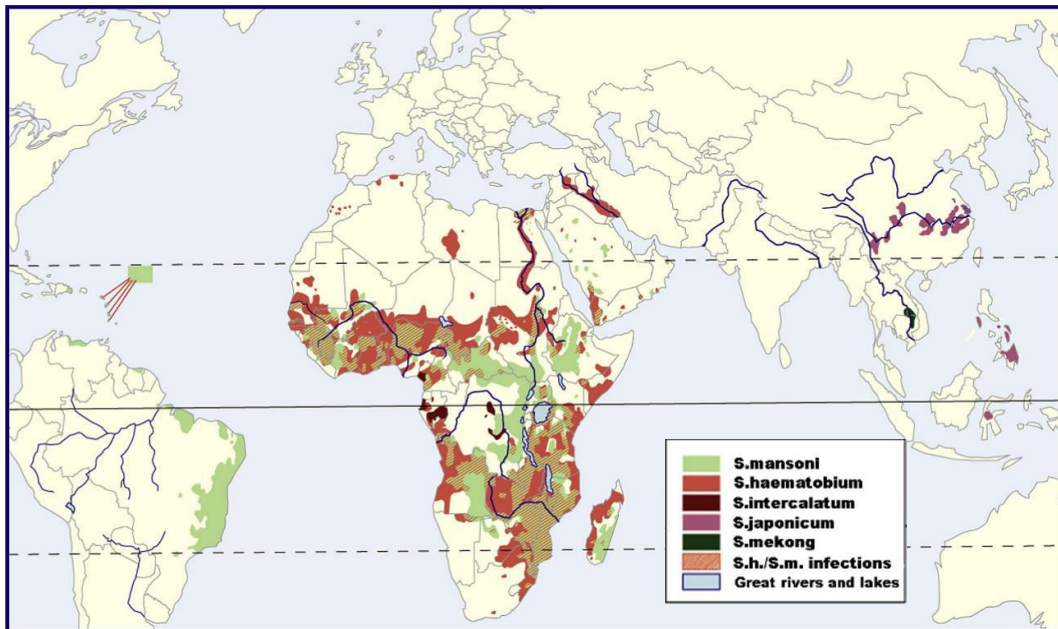
AA	Ácido Araquidônico
AL	Ácido Linolênico
BH	Belo Horizonte
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia a Gás com Espectrômetro de Massas
CPQBA	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
EE	Extrato Etanólico
FA	Fração Acetonitrilica
FH	Fração Hexânica
GI ₅₀	50% Growth Inhibition
HBV	Hepatitis B Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HP	Hewlett-Packard
m/z	Razão massa/carga
M+	Íon Molecular
MM	Massa Molecular
nSMase	Neutral Sphingomyelinase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pro Analysis
PBS	Phosphate Buffer Solution
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
PZQ	Praziquantel
RI	Resíduo Insolúvel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Sulforhodamine B
TCA	Trichoroacetic cid

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e prevalência da esquistossomose

A esquistossomose é uma parasitose causada pelo helminto trematódeo do gênero *Schistosoma* e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença negligenciada, ou seja, doença grave que afeta a população mais pobre e que não tem prioridade nos investimentos de pesquisa e desenvolvimento. Há registros de humanos acometidos pela esquistossomose a milhares de anos, como múmias egípcias nas quais foram encontrados ovos calcificados de *Schistosoma haematobium* em seus rins (Barakat, 2012). Hoje, segundo a OMS (WHO, 2013), o número estimado de pessoas afetadas pela esquistossomose é de cerca de 237 milhões em todo o mundo, com 779 milhões vivendo em áreas de risco com o número de mortes ultrapassando os 200.000. No Brasil a esquistossomose mansônica atinge entre 2,5 a 6 milhões de indivíduos sendo que 25 milhões de pessoas vivem em área de risco (Brasil, 2010). O agente etiológico é o trematódeo digenético do gênero *Schistosoma* no qual seis espécies são as responsáveis pelo maior número de casos de esquistossomose, cuja distribuição geográfica é mostrada na Figura 1. O *S. haematobium*, existe na África, Austrália, Ásia e Sul da Europa; o *S. japonicum* é encontrado na China, Japão, Filipinas e Formosa; o *S. mekong* é encontrado no Camboja e Laos; o *S. guineensis* e *S. intercalatum* são encontrados nas áreas de floresta tropical das regiões centro-africanas e finalmente o *S. mansoni* é encontrado na África, América Central, Índia, Antilhas e Brasil (Gryseels, 2012).

Figura 1 Distribuição mundial dos diversos tipos de esquistossomose, mostrando grande prevalência desta doença na África e boa parte do Brasil (Gryseels, 2012)

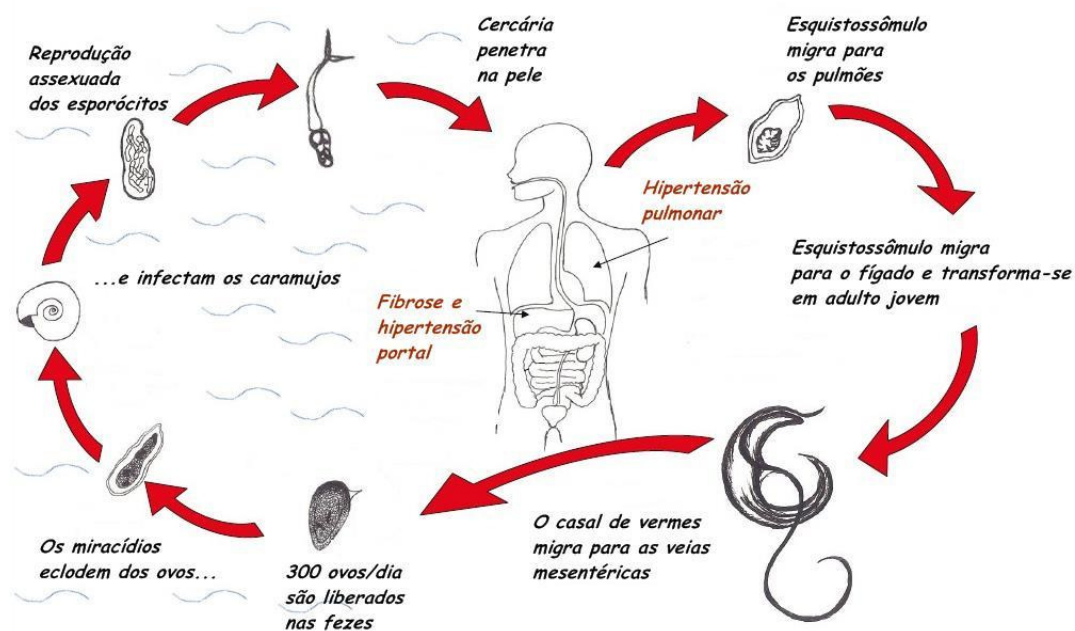


Grande parte da população afetada reside em áreas endêmicas, relacionadas com precárias condições de higiene e pouco ou nenhum saneamento básico, estando essa endemia associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico. Essas áreas situam-se principalmente em comunidades rurais; porém, as áreas acometidas encontram-se em processo de expansão, passando a envolver cada vez mais os centros urbanos, assim como áreas litorâneas (Barbosa *et al.*, 2010).

1.2. Ciclo do *Schistosoma mansoni*

O ciclo do *S. mansoni* está representado na Figura 2.

Figura 2 – Ciclo do *Schistosoma mansoni* (adaptado de PVRI, 2012)



Neste ciclo, dois hospedeiros estão envolvidos: um definitivo (vertebrado) e um intermediário (invertebrado). O homem é um importante hospedeiro definitivo que se reproduz sexuadamente. Os ovos do *S. mansoni* são eliminados no ambiente pelas fezes do hospedeiro definitivo, ocasionando a contaminação de mananciais hídricos. Quando as larvas eclodem, liberam os miracídios que infectam os caramujos de onde, após algumas semanas, retornam à água na forma de cercárias. As pessoas se tornam infectadas quando as cercárias penetram sua pele.

Durante a penetração na pele as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos que entram na corrente sanguínea e linfática, até atingir o coração e em seguida os pulmões, cerca de 7 dias após a penetração. Posteriormente, migram para o sistema porta hepático, onde amadurecem, aproximadamente 45 dias após a infecção, alojando-se no plexo mesentérico, onde as fêmeas liberam os ovos, cerca de 300 ovos por dia por indivíduo, podendo viver até 40 anos no hospedeiro definitivo. Alguns desses ovos são eliminados nas fezes

para continuar o ciclo de vida do parasita. Outros ficam retidos nos tecidos do corpo, causando uma reação granulomatosa e danos progressivos aos órgãos (Alisson et al, 1974)

A esquistossomose intestinal pode resultar em dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. O aumento do fígado é comum em casos avançados, e é frequentemente associada com ascite (barriga d'água) e hipertensão portal. Em tais casos, pode também haver aumento do baço caracterizando um quadro de hepatoesplenomegalia.

Os indivíduos infectados com o *S. mansoni* desenvolvem hepatoesplenomegalia devido aos granulomas formados ao redor dos ovos com produção de anticorpos em reação ao esquistossoma no intestino e fígado. O granuloma é seguido por fibrose e inflamação crônica no fígado, levando à hipertensão portal, causando doenças do fígado, ascites e hemorragia esofagogástrica (Harrison, 2005). Falhas renais devidas ao complexo antígeno-anticorpo e a exposição a uma infecção bacteriana ou viral secundária foram observados em alguns indivíduos infectados cronicamente (Brunet, 1998).

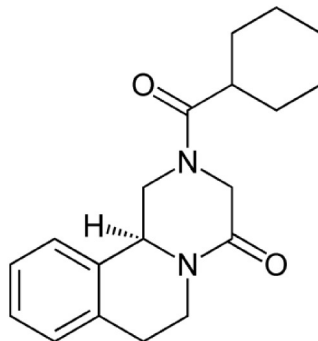
1.3. Fármacos utilizados

Vários fármacos já foram utilizados para o tratamento contra a esquistossomose (Shuhua *et al.*, 2002; Fenwick *et al.*, 2003; Caffrey, 2007). No Brasil o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde indica o praziquantel (PZQ, Figura 3) administrado por via oral em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e 60 mg/kg de peso para crianças e, alternativamente, a oxamniquina, cuja dose recomendada é de 20 mg/kg para crianças e 15 mg/kg para adultos (Brasil, 2010).

Entretanto, no Brasil e em outros países, o tratamento é feito quase que exclusivamente pela administração oral de praziquantel (PZQ, Figura 3) sintetizado pela Bayer e Merck na Alemanha em 1972, cujo mecanismo de ação, embora ainda

não totalmente elucidado, envolve a ruptura do tegumento do verme, com a consequente exposição de antígenos que permite o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (Brindley and Sher, 1987; Doenhoff *et al.*, 1988).

Figura 3 – Praziquantel – estrutura química



Observou-se também que o PZQ depleta a glutationa de vermes, o que pode estar relacionado com efeito de estresse oxidativo (Ribeiro *et al.*, 1998). A inibição dos canais de cálcio é outro efeito observado (Greenberg, 2005 e Picca-Mattocia *et al.*, 2007). Foi também demonstrado que o PZQ inibe o sistema excretor de vermes (Oliveira *et al.*, 2006 e Kusel *et al.*, 2006). Embora o PZQ seja eficiente no tratamento, é menos eficiente contra as formas juvenis do *Schistosoma*, e vem apresentando episódios de resistência (Caffrey, 2007; Doenhoff *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Uma possível disseminação de cepas resistentes, aliada à falta de drogas sintéticas alternativas gera grande preocupação quanto a um eventual desenvolvimento de resistência em maior escala.

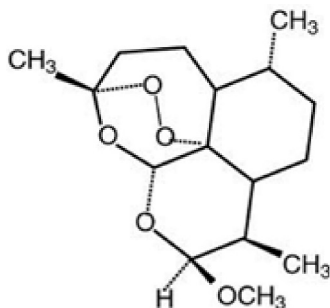
No entanto, a pesquisa de novas moléculas sintéticas para o tratamento da esquistossomose esbarra em algumas dificuldades como o desconhecimento sobre o mecanismo de ação do PZQ (Aragon *et al.*, 2009) e o desinteresse das grandes corporações em investir em doenças negligenciadas (dos Santos *et al.*, 2012), o

que foca a atenção nas fontes naturais, algumas delas mostrando resultados promissores *in vitro* (Almeida *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2012; Yousif, 2012) e *in vivo* (Soliman, 2012; Kamel *et al.*, 2011; Mostafa *et al.*, 2011).

1.4. Alternativas naturais

O artemeter (Figura 4), derivado da artemisinina extraída da *Artemisia annua* é especialmente ativo contra as formas imaturas do *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni*, (Xiao *et al.*, 1995; Shuhua *et al.*, 2002) muito importante porque neste estágio o parasita ainda não ovipõe. É aprovado como medicamento preventivo na China desde 1990 não sendo adequado para o tratamento curativo devido a sua menor eficácia contra os vermes adultos (Wang, 2000).

Figura 4 – Artemeter – estrutura química



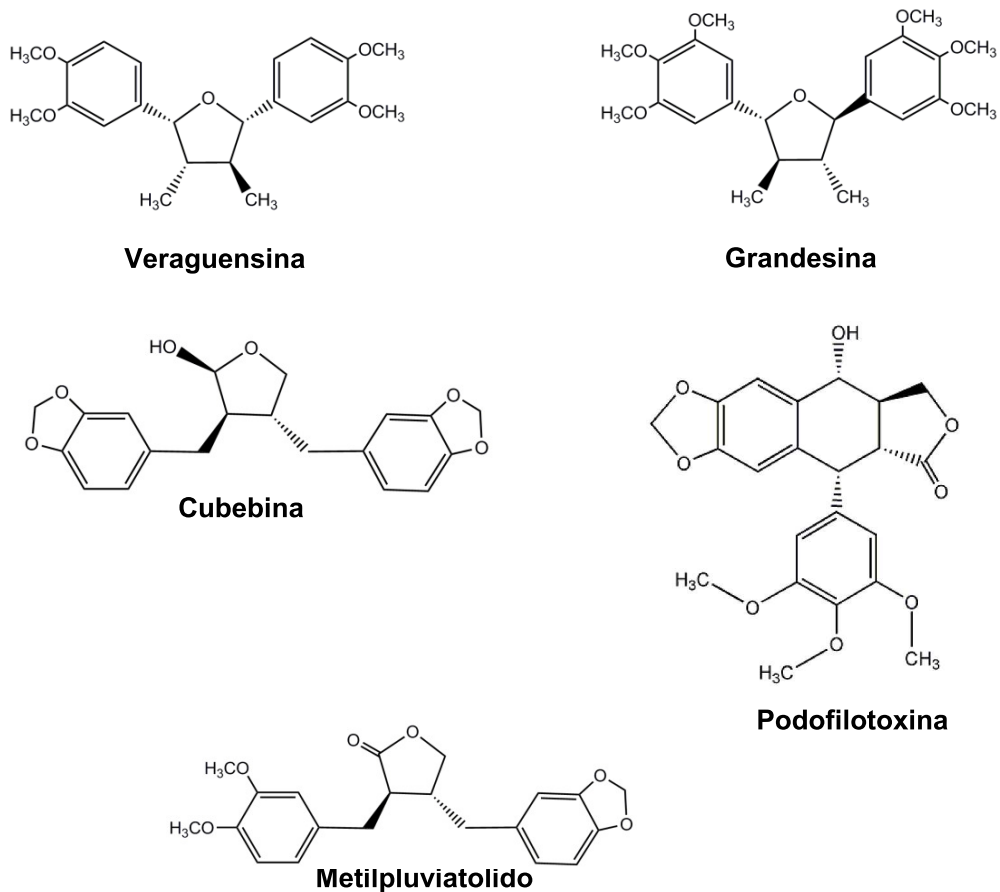
Algumas classes de substâncias químicas encontradas em produtos naturais têm notáveis propriedades antiparasitárias como os compostos fenólicos, terpênicos, alcalóides, flavonóides, alcalóides isoquinolínicos e poliacetilenos. (Sen & Chatterjee, 2011; Wink, 2012).

1.5. Lignanas

Além deles há também as lignanas que são um grupo de produtos naturais farmacologicamente muito ativos (Figura 5), ao qual pertencem os derivados de

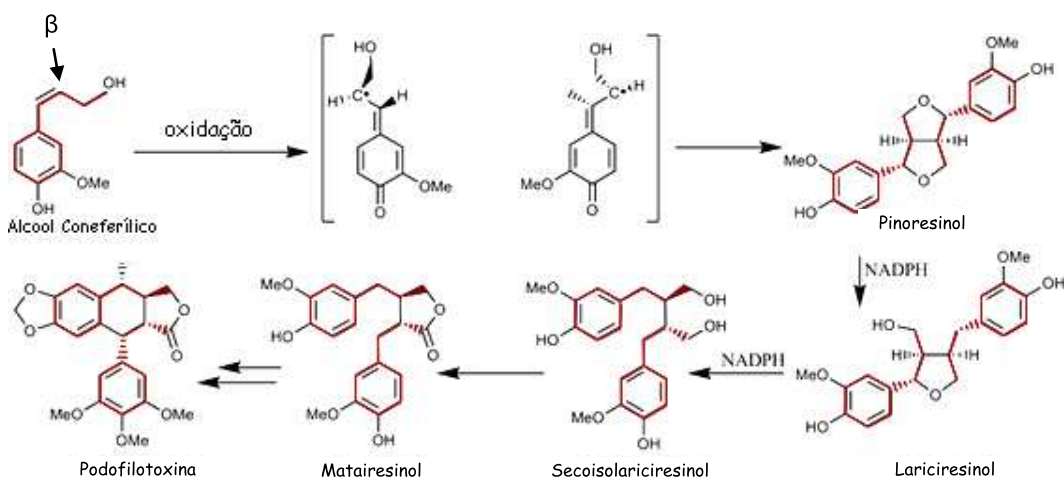
podofilotoxina como o antineoplásico etoposido. Quimicamente as lignanas pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas produzidas pela dimerização oxidativa de duas unidades de fenilpropanóide com uma enorme diversidade de estruturas. O termo lignana é aplicado aos dímeros opticamente ativos de fenilpropanóides ligados por seus átomos de carbono β , β' .

Figura 5 – Lignanas com ação farmacológica comprovada.



Na Figura 6 vemos um exemplo de rota biossintética da lignana podofilotoxina (Gordaliza *et al.*, 2004) com as unidades fenilpropanóides destacadas em vermelho. As lignanas estão na sua maioria presentes na natureza sob a forma livre, enquanto seus derivados glicosídeos são mais raros, sendo amplamente distribuídas no reino vegetal e encontradas em espécies que pertencem a mais de 70 famílias.

Figura 6 – Rota biossintética da lignana podofilotoxina, com as estruturas fenilpropanóides ligadas pelo carbono β , (adaptado de Gordaliza *et al.*, 2004).



As lignanas são encontrados nas raízes, rizomas, caules, folhas, sementes e frutos. Com algumas exceções, essas fontes não fornecem quantidades comercialmente úteis. Como exemplo de exceções temos as resinas exudadas de árvores, onde as lignanas ocorrem em misturas simples com outros produtos naturais, e são facilmente isoladas (Ayres & Loike, 1990).

Apesar de suas conhecidas atividades biológicas, as lignanas foram pouco testadas contra protozoários parasitas (Kayser *et al.*, 2003). Em um dos poucos trabalhos publicados, Lopes e colaboradores demonstraram *in vitro* o potencial das lignanas tetrahydrofurânicas grandisina e veraguensina (Figura 5) para impedir a transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue onde a atividade destas lignanas, na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, inibiu o crescimento do *T. cruzi* em 62% e 87% respectivamente. Em outro estudo, as lignanas isoladas a partir do extrato hexânico das folhas de *Zanthoxylum naranjillo* foram testadas tanto *in vitro* como *in vivo* contra duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Bastos *et al.*, 1999), sendo a lignana (-)-metilpluviatolido (Figura 5) a mais eficaz. Uma pimenta oriunda da Índia, *Piper cubeba*, contém a lignana cubebina (Figura 5) que, sinteticamente modificada,

gerou derivados com declarada eficácia contra o *S. mansoni* e *T. cruzi* (Silva, M. L. A *et al.*, WO/2007/009201).

As lignanas estão presentes no gênero *Phyllanthus* com grande diversidade de estruturas químicas e muitas delas são farmacologicamente ativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Lignanas isoladas e identificadas em diversas espécies de *Phyllanthus* (Nahar *et al.*, 2011).

Espécie	Porção	Lignanas
<i>P. amarus</i>	Partes aéreas	Hipofilantina; Nirantina; Nirtetralina; Filantina; Filtetralina
<i>P. anisobulos</i>	Partes aéreas	Justicidina B; Filantostatina A
<i>P. discoideus</i>	Partes aéreas	Filantina
<i>P. myrtifolius</i>	Planta inteira	Justicidina A; Filamiricina A, B, C, D, E, F, Filamiricosídeo A, B, C; Retrojusticidina B
<i>P. niruri</i>	Planta inteira e cultura de células	Cubebina, ester metílico, 2,3-Demetoxiseco-isolintetralina; 2,3-Demetoxiseco-isolintetralina; Demetilenedioxinirantina; Hinoquinina; Hidroxinirantina; Nirfilina; Isolintetralina; Linantina; Lintetralina; Neonirtetralina; Filnirurina; Seco-4-hidroxisolintetralina; Seco-isolariciresinol trimetil eter
<i>P. polyphyllus</i>	Planta inteira	Difilina Seco-isolariciresinol
<i>P. oxyphyllus</i>	Raízes	Pinoresinol
<i>P. reticulates</i>	Caule	Pinoresinol
<i>P. taxodiifolius</i>	Partes aéreas	Clestantina A; Cleistanthin A, ester metílico; Clestantosídeo A; Taxodiifolosídeo
<i>P. urinaria</i>	Planta inteira	5-Demetoxinirantina; Dextroboursehernina Heliobuftalmina lactona; Urinalignana
<i>P. virgatus</i>	Partes aéreas	Urinatetralina; Virgatusin Virgatina

1.6. *Phyllanthus amarus*

Por conta desta diversidade de moléculas bioativas, as espécies do gênero *Phyllanthus* vêm despertando grande interesse pois sinalizam um bom potencial de opções terapêuticas. O gênero *Phyllanthus* tem larga distribuição em regiões tropicais e sub-tropicais, apresentam um grande número de espécies, são

tradicionalmente utilizadas para diversos fins terapêuticos e mostram grande diversidade de metabólitos secundários (Calixto *et al.*, 1998).

Phyllanthus amarus Schum and Thonn (Euphorbiaceae) (Figura 7) é uma planta nativa das regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Silva & Sales, 2007). Popularmente é conhecida no Brasil como "quebra-pedra" e usada na medicina tradicional de diversos países para o tratamento de problemas de estômago, sistema genito-urinário, rins, fígado e baço, diurético, febrífugo e anti-séptico. A planta é usada em gonorréia, menorragia e outras afecções genitais. É útil na gastropatia, diarreia, febres intermitentes, oftalmopatia, sarna, úlceras e feridas (Patel *et al.*, 2011).

Figura 7 - *Phyllanthus amarus* cultivado no campo experimental do CPQBA-UNICAMP.



As diversas ações farmacológicas podem ser atribuídas aos diversos grupos de substâncias químicas presentes em *P. amarus* destacando-se as lignanas, flavonóides, taninos hidrolisáveis (elagitaninos), polifenóis, triterpenos, esteróis,

alcalóides e óleos voláteis (Patel *et al.*, 2011; Calixto *et al.*, 1998; Dhooghe *et al.*, 2011).

Quanto ao efeito anti-lítico, pelo qual a planta é popularmente conhecida, os estudos apontam uma ação preventiva na deposição de cristais de oxalato de cálcio (Barros *et al.*, 2003; Nishiura *et al.*, 2004). Os extratos alcoólico e aquoso das folhas de *P. amarus* apresentam efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Ujwala *et al.*, 2012; Wannannond *et al.*, 2012; Krithika *et al.*, 2011). Os extratos hidroetanólico e hexânico apresentam ação anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* provavelmente devido à presença das lignanas nirantina e nirtetralina (Kassuya *et al.*, 2003; Kassuya *et al.*, 2005; Kassuya *et al.*, 2006).

Há estudos comprovando outras atividades de interesse farmacológico como a ação anti-HIV (Notka *et al.*, 2004) anti-HBV (Liu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), bactericida contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, (Sen *et al.*, 2012; Eldeen *et al.*, 2011; Akinjogunla *et al.*, 2010) contra *Plasmodium falciparum* (Kamaraj *et al.*, 2012; Inbaneson *et al.*, 2012; Appiah-Opong *et al.*, 2011), *Leishmania donovani* (Chowdhury *et al.*, 2012) e recentemente ficou demonstrada a ação contra o *Schistosoma mansoni* (Oliveira, 2008; Oliveira, 2012).

Quanto à toxicidade, os resultados até agora publicados com testes em animais mostram que os extratos foram isentos de efeitos tóxicos em estudos de toxicidade aguda (Sirajudeen *et al.*, 2006; Lawson-Evi *et al.*, 2008; Pingale *et al.*, 2011) embora dois estudos de toxicidade crônica evidenciem alterações histológicas nos rins de ratos (Adjene, 2010; Eweka *et al.*, 2011).

Baseado nos resultados promissores obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa nos ensaios *in vitro* do extrato etanólico de *P. amarus*, o objetivo deste estudo foi testar as frações obtidas por partição líquido-líquido e cromatografia em coluna clássica contra *S. mansoni* linhagem BH, quanto à viabilidade e oviposição dos vermes *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

O presente estudo objetiva avaliar a atividade do extrato etanólico das folhas de *P. amarus*, suas frações e substâncias isoladas quanto à mortalidade e oviposição *in vitro* de casais de *S. mansoni*.

2. 2. Objetivos específicos

- Identificar as substâncias presentes nos extratos e frações com atividade esquistossomicida.

-Avaliar o efeito solubilizante Da polivinilpirrolidona (PVP) sobre os extratos e frações com atividade esquistossomicida.

- Avaliar solventes na partição líquido-líquido para otimizar a segregação das lignanas de substâncias graxas a partir do extrato etanólico.

- Avaliar fases estacionárias e fases móveis para o fracionamento das lignanas obtidas do processo de partição.

- Avaliar o extrato etanólico das folhas de *P. amarus* e suas frações com atividade esquistossomicida quanto à citotoxicidade em células humanas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudos Fitoquímicos

3.1.1. Reagentes

Etanol técnico 95%; Hexano P.A. (Synth®); Acetato de etila P.A. (Synth®); Acetonitrila P.A. (Nuclear®); Cloreto de metileno P.A. (Synth®); Metanol P.A. (Synth®); Ácido acético P.A. (Synth®); Ácido sulfúrico 98% P.A.(Synth®); Anisaldeído P.A. (Vetec®); Florisil (0.150-0.250 mm) (Merck®); Sílica Gel (0.063-0.200 mm) (Merck®); Diazald 99% (Aldrich®); Placas cromatográficas Silicagel 60 (Merck®); Polivinilpirrolidona (PVP K-30 Synth®); 5-Demetoxinirantina, Nirantina, Filantina e Hipofilantina, isoladas e identificadas pela DQOF, CPQBA-UNICAMP.

3.1.2. Equipamentos

-Dispensor Ultra-Turrax ® T-50.

-Evaporador rotativo Quimis.

-Cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 série II, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor split/splitless, utilizando-se uma Coluna capilar: HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

3.1.3. Material vegetal

Folhas de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn foram coletadas em fevereiro de 2011 no campo experimental do CPQBA/UNICAMP (S 22° 47' 58", W 47° 6' 44"). 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.

3.1.4. Obtenção dos extratos etanólicos

O extrato etanólico (EE1) foi preparado a partir de 300 g de folhas secas e moídas de *P. amarus* (acesso 14/11-bordadura 2ª coleta) com auxílio de um

dispersores Ultra-Turrax® T-50 a 8000 rpm à temperatura ambiente. A extração em dispersor foi realizada por 10 minutos, utilizando na primeira extração 3,0 L de etanol 95% seguido de filtração a vácuo. Depois da filtração o resíduo da planta foi lavado com 100 mL do mesmo solvente, retornando-se o resíduo em um béquer e realizando-se assim mais uma extração de modo análogo à primeira, porém utilizando na segunda extração 2,0 L de solvente. Para a lavagem do resíduo foram utilizados 0,5 L de etanol 95%. Todos os filtrados foram combinados.

Uma amostra do extrato EE1 (56 mL - 1% do volume total) foi evaporada até *secura* para determinação do rendimento do processo de extração. O restante do extrato foi parcialmente evaporado com auxílio de um evaporador rotativo a vácuo em banho a 45°C, obtendo-se 2,0 L do extrato concentrado. Este extrato foi utilizado para o fracionamento por partição líquido-líquido utilizando-se hexano e etanol 85% como solventes.

Uma segunda extração foi realizada a partir de mais 300 g da mesma amostra, com o mesmo solvente e equipamento de extração, utilizando-se menor quantidade de solvente, e maior número de extrações com menos tempo. Assim, a extração em dispersor foi realizada por 5 minutos, utilizando-se na primeira extração 2,0 L de etanol 95% seguido de filtração a vácuo. Depois da filtração, o resíduo da planta foi lavado com 100 mL do mesmo solvente, retornando-se o resíduo em um béquer e realizando-se assim mais uma extração de modo análogo à primeira, porém utilizando na segunda extração 1,0 L. Para a lavagem do resíduo foram utilizados 100 mL de etanol 95%. Finalmente realizou-se a terceira extração com 0,5 L de Etanol 96% e 100 mL para a lavagem do resíduo, reunindo-se todos os filtrados, fornecendo o EE2. O volume final do EE2 foi determinado e uma alíquota de 36 mL (1% do volume total) foi evaporada até *secura* para determinação do rendimento do processo de extração. O restante do extrato foi parcialmente evaporado com auxílio de um evaporador rotativo a vácuo em banho de 45°C, obtendo-se 2,0 L do extrato concentrado. Este extrato foi utilizado para o fracionamento por partição líquido-líquido utilizando-se hexano e acetonitrila como solventes.

Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia a Gás com Espectrômetro de Massas (CG-EM).

O extrato EE1 foi submetido aos ensaios de atividade *in vitro* contra *S. mansoni*.

3.1.5. Partição líquido-líquido do extrato EE1 com hexano-etanol-água

O extrato etanólico (EE1 - 2,0 L) foi submetido à partição líquido-líquido com 2,0 L de n-Hexano e 200 mL de água em um funil de separação. A fração etanólica resultante (FE) foi extraída com três porções de 300 mL de n-hexano. As frações hexânicas foram reagrupadas (FH1) e extraídas com duas porções de 100 mL de etanol:água (9:1 v/v) e estas foram reagrupadas com a primeira fração etanólica.

As frações FE e FH1 foram evaporadas a vácuo fornecendo as frações secas que foram pesadas, analisadas por CCD utilizando como eluente hexano: acetato de etila (6:4 v/v), analisadas por CG-EM e enviadas para teste *in vitro* contra *S. mansoni*.

3.1.6. Partição líquido-líquido do extrato EE2 com hexano-acetonitrila

Uma porção do EE2 seco (36 g) foi solubilizada em 200 mL de acetonitrila com auxílio de banho de ultrassom, à temperatura ambiente, transferindo-se a porção solúvel para um funil de separação de 500 mL. Ao resíduo, foram adicionados 200 mL de n-Hexano para solubilizar o material insolúvel em acetonitrila com auxílio de banho de ultrassom à temperatura ambiente. A porção solúvel foi transferida para o funil de separação contendo a porção de acetonitrila. O resíduo insolúvel (RI) foi seco a vácuo e sua massa determinada, analisado por CG-EM e enviado para teste *in vitro* contra *S. mansoni*.

A mistura das fases de hexano e acetonitrila foi agitada vigorosamente, separando-se a fração de acetonitrila (FA). A fração hexânica (FH2) foi extraída com 2 porções de 50 mL de acetonitrila. As respectivas frações FA e FH2 foram

agrupadas e evaporadas a vácuo fornecendo as frações secas que foram pesadas, analisadas por CCD e CG-EM e enviadas para teste *in vitro* contra *S. mansoni*.

3.1.7. Fracionamento da fração FA por cromatografia em coluna

A fração FA (4,0 g) foi solubilizada em 200 mL de n-hexano com auxílio de banho de ultrassom e adicionada sobre 40 g de Florisil® (silicato de magnésio) previamente acondicionada em coluna de vidro de 2 cm x 40 cm em n-hexano. Após eluição, o solvente foi evaporado a vácuo, analisado por CCD e esta fração foi descartada. Em seguida, a coluna foi eluída com um gradiente de polaridade crescente de solventes sendo recolhidas 2 frações de 50 mL de cada mistura de solventes, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição de solventes das frações recolhidas na eluição da FA em coluna de Florisil®

Frações	Fase móvel		Frações	Fase móvel		
	Hexano	Diclorometano		Diclorometano	AcOEt	MeOH
1a;1b	100%	0%	6a;6b	95%	5%	0%
2a;2b	80%	20%	7a;7b	95%	5%	0%
3a;3b	60%	40%	8a;8b	90%	10%	0%
4a;4b	40%	60%	9a;9b	0%	100%	0%
5a;5b	0%	100%	10a;10b	0%	0%	100%

As vinte frações obtidas (1a a 10b) foram analisadas por CCD utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (70:30 v/v), agrupadas de acordo com sua semelhança, gerando seis frações (frações I-VI), secas, pesadas e posteriormente analisadas por CG-EM.

As amostras, depois de agrupadas e secas, foram encaminhadas para os ensaios de atividade *in vitro* contra *S. mansoni*.

3.1.8. Derivatização dos ácidos carboxílicos da fração VI com solução de diazometano

A fração VI (10 mg) foi solubilizada em 2 mL de etanol absoluto e adicionadas a 2 mL de solução de diazometano, sendo os solventes posteriormente evaporados sob nitrogênio a temperatura ambiente. A amostra foi então dissolvida em 2 mL de acetato de etila e enviada para análise por CG-EM.

3.1.9. Métodos de análise

3.1.9.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos, as frações e as substâncias isoladas foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 – Merck. O eluente utilizado foi uma mistura de hexano-acetato de etila 70:30 (v/v). A detecção das substâncias foi realizada por irradiação sob lâmpada Ultravioleta (UV) a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (10:5:0,5 v/v) e aquecimento em estufa a 100°C por 5 minutos. (Wagner & Bladt, 1996).

3.1.9.2. Cromatografia a Gás com Detector de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas num cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 série II, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor split/splitless, utilizando-se uma Coluna capilar: HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do injetor foi de 280°C; detector, 300°C; o gradiente de temperatura da coluna foi 150°C / 2 min, 5°C.min⁻¹ até 240°C, então 10°C. min⁻¹ até 300°C por 34 min. O volume de injeção foi de 1,0 µL com vazão de gás de arraste (He) de 1,0 mL min⁻¹.

3.2. Estudo de dispersão em polivinilpirrolidona (PVP)

Preliminarmente foram testadas quatro proporções do extrato EE1 e PVP (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 m/m) a fim de determinar a melhor proporção para solubilização dos extratos a serem testados *in vitro*, conforme descrito abaixo.

Pesaram-se quatro alíquotas de 10 mg do extrato EE1 em quatro tubos de ensaios de 15 mL seguido da adição de 10, 20, 30 e 40 mg de polivinilpirrolidona (PVP-K30) e de 3 mL de etanol 96%. As amostras foram solubilizadas à temperatura ambiente com auxílio de um banho de ultrassom e secas sob nitrogênio à temperatura ambiente. Às dispersões sólidas então formadas foram adicionados 2 mL de água, e as soluções resultantes foram analisadas quanto ao aspecto, filtradas em filtro 0,45 µm, sendo as lignanas quantificadas por cromatografia gasosa.

A exceção das amostras EE 2005, EE 2011 e PZQ, que foram testadas *in vitro* com e sem PVP, todas as demais foram testadas dispersas em PVP.

3.3. Testes *in vitro*

3.3.1. Atividade esquistossomicida

Os testes *in vitro* da atividade esquistossomicida foram realizados pela Dra. C. N.F. Nascimento no Laboratório de Helminologia do Depto. de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Silmara Allegretti. Neste estudo foi utilizada a linhagem BH de *S. mansoni*, oriunda de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. A linhagem foi mantida em caramujos *Biomphalaria glabrata* do Departamento de Biologia Animal. Camundongos Swiss-SPF fêmeas, com trinta dias de idade, pesando cerca de 20 g, foram infectados com cerca de 70 cercárias.

Oito semanas após a infecção, os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático e veias mesentérica. Estes foram lavados em meio RPMI-1640 (Nutricell) complementado com 200 µg·mL⁻¹ de estreptomicina, 100 IU / mL de penicilina (Invitrogen), e 25 mM de HEPES. Depois,

com o auxílio de lupa, um casal de vermes foi transferido para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços (Figura 8) contendo 2 mL de meio RPMI-1640 e foram incubados em estufa de CO₂ a 5% e 37 ° C (Xiao *et al.*, 1995). A solução de PBS a 2% (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,0) foi utilizada como solvente para todas as amostras. Todos os testes foram realizados em cinco repetições.

Figura 8 – Placa com 24 poços para a observação dos casais de *S. mansoni*, com distribuição aleatória das amostras*

	1	2	3	4	5	6
A	200*	200	50	100	25	100
B	25	200	50	100	50	50
C	CTRL	25	CTRL	200	100	CTRL
D	100	50	25	200	CTRL	25

*valores expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Foram avaliadas as concentrações de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O grupo controle positivo foi tratado com uma concentração letal de PZQ (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), enquanto que o grupo de controle negativo foi mantido apenas em meio RPMI-1640 sob as mesmas condições. Neste estudo avaliou-se a oviposição e a susceptibilidade dos vermes na presença de diferentes concentrações dos extratos, frações e substâncias isoladas em intervalos regulares de 24, 48 e 72 h, utilizando-se de um microscópio invertido Leica DM500. Durante todo o período de observação as placas de cultura foram mantidas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Os ensaios foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA / Unicamp, protocolo. 2984-1, Anexo 2), por estarem em acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela CEUA.

Foram avaliadas nestes experimentos as seguintes amostras: EE (s/PVP), EE, FH1, FE, FH2, FA, RI, frações I-VI, nirantina, filantina, hipofilantina, 5-demetoxinirantina, ácido linolênico (AL), AL+filantina, AL+nirantina, AL+5-demetoxinirantina, estas com PVP, além do PZQ e do PVP.

3.3.2. Atividade citotóxica

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA – UNICAMP sob orientação do Dr. João Ernesto de Carvalho.

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) usada neste estudo foi obtida na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas-UNICAMP. Foi cultivada em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (100UI/mL:100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de acordo com sua densidade de inoculação. Foram inoculados 100 μL por compartimento de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T0), que continha a mesma linhagem celular utilizada no experimento. As amostras foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) na concentração de 0,1g·mL⁻¹. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (100UI·mL⁻¹:100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o que evita a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (100 μL /compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. No momento de adição das amostras, as células inoculadas em uma placa controle T0 foram fixadas pela adição de 50 μL por compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal T0. Após 48 horas de tratamento, as células das placas T (tratadas) e C (controle) foram fixadas com 50 μL por compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 hora, a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com

água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50µL por compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB, Sigma®) a 0,4 % (massa/volume) dissolvido em ácido acético a 1 % e, a seguir, as placas foram mantidas em temperatura ambiente, por 30 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150µL por compartimento de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada. Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. .

Para estas condições, o cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$. Se $T < T_0$, a amostra-teste induziu morte celular, ou seja, efeito citocida e pode ser calculada por $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ (Monks *et al.*, 1991). Se $T > C$ a amostra-teste estimulou o crescimento celular. Se $T \geq T_0$ e $< C$, a amostra-teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve um efeito citostático. Esses resultados foram expressos em curva de crescimento celular em função da concentração da amostra e, a partir deles, foi calculada a concentração efetiva GI50 (concentração necessária para inibição de 50% da proliferação celular), através de regressão não linear, tipo sigmoideal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation) (Denny et al, 2008; Shoemaker, 2006)

As amostras avaliadas neste ensaio foram: EE, FH2, FA, RI e PVP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

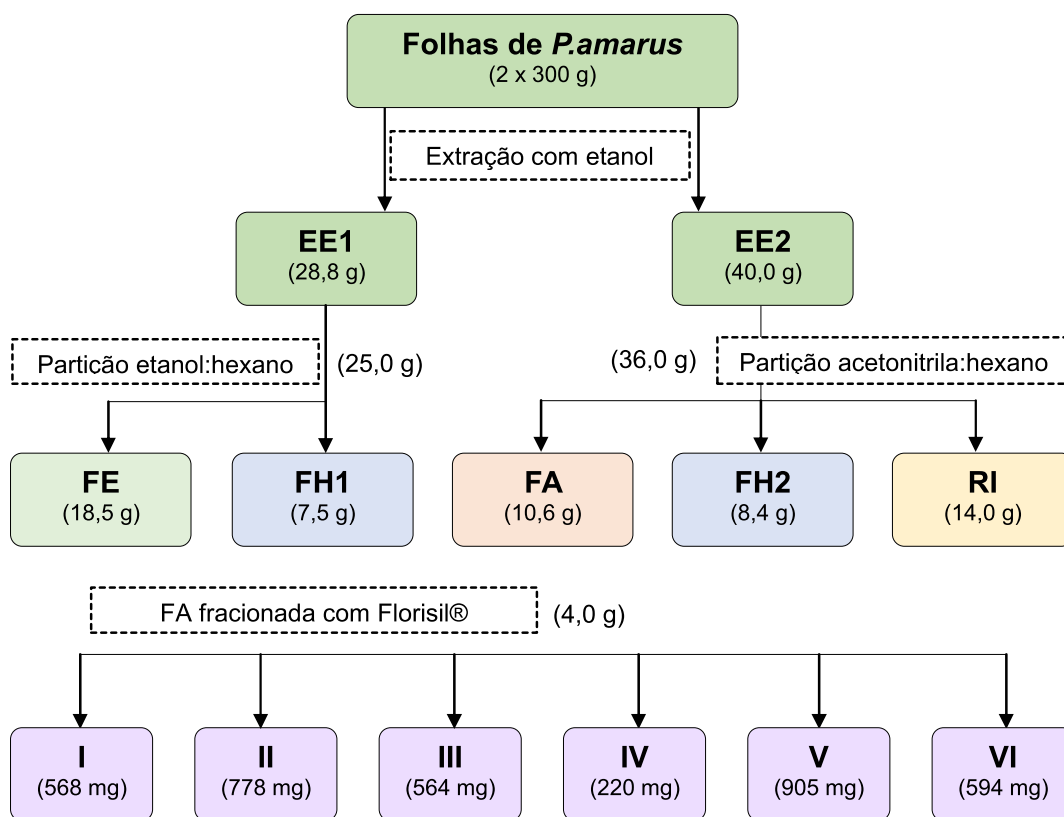
A espécie *Phyllanthus amarus* é uma importante planta medicinal, amplamente utilizada na medicina tradicional por possuir uma grande variedade de propriedades benéficas ao homem. Uma triagem de compostos obtidos das partes aéreas desta planta identificou inúmeras atividades farmacológicas como atividade hepatoprotetora, anti-diabética, analgésica, anti-inflamatória, diurética, além de outras (Joseph *et al.*, 2011). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisas (Fapesp- Processo n ° 2002/03498-5) demonstraram atividade anti-inflamatória de frações ricas em lignanas e lignanas isoladas das folhas de *P. amarus* (Kassuya *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* utilizando os extratos hexânico e etanólico contra o *S. mansoni* linhagem BH, mostraram atividades promissoras dessa planta contra essa helmintíase (Oliveira, 2008). Para os dois extratos foram testadas as concentrações de 100, 150 e 250 mg·kg⁻¹ em camundongos em dose única, via oral, com redução em até 63% do número de vermes recuperados do sistema porta hepático na maior dosagem. Houve 100% de supressão da oviposição nos tratamentos realizados com o extrato etanólicos (100 mg·kg⁻¹) e fração rica em lignanas (50 mg·kg⁻¹). O fígado e o baço dos camundongos tratados com o extrato etanólico, extrato hexânico e fração rica em lignanas apresentaram-se livres de granulomas ou menos comprometidos do que os respectivos órgãos do grupo controle. Estudos de frações e substâncias isoladas do extrato etanólico desta planta (Oliveira, 2012) confirmaram a atividade esquistomicida *in vitro*, com 100% de mortalidade para vermes machos e fêmeas para as frações ricas em lignanas (25µg·mL⁻¹) e *in vivo*, com a nirantina na dosagem de 100 mg·kg⁻¹, diminuindo a carga parasitária em camundongos em até 57% e a oviposição em até 95%. Esses resultados demonstram potencial atividade anti-inflamatória e esquistomicida de *P. amarus*, principalmente para o extrato etanólico, e suas frações contendo lignanas.

O estudo fitoquímico do *P. amarus* realizado neste projeto envolveu a preparação de extratos etanólicos das folhas secas e moídas de *P. amarus* e foram guiados pelos resultados de atividade antiparasitária, visando a identificação das

substâncias responsáveis pela atividade. Devido à grande dificuldade de solubilização das amostras em meio aquoso para realização dos ensaios *in vitro*, o presente trabalho envolveu também o estudo de incorporação destas amostras em matrizes hidrossolúveis visando garantir sua total solubilização no meio de cultura dos vermes de *S. mansoni* e assim comprovar sua atividade e monitorar o isolamento das substâncias ativas. O processo de extração e fracionamento estão esquematizados no fluxograma da Figura 9.

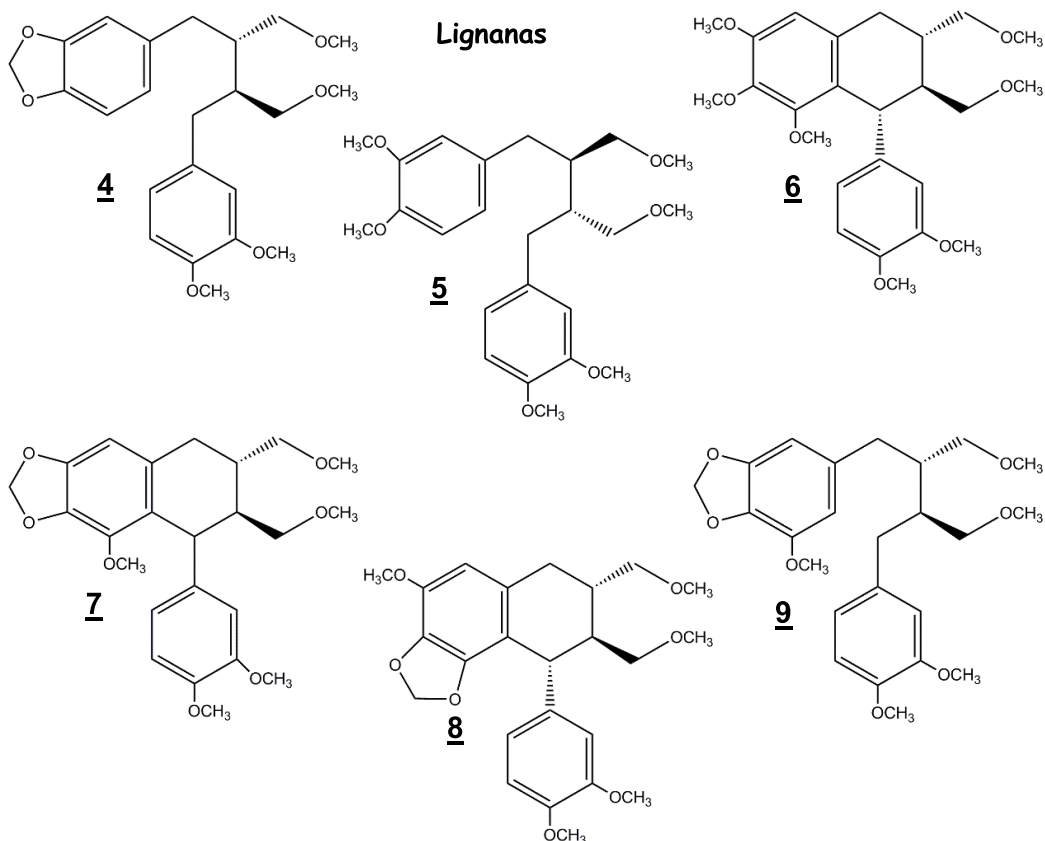
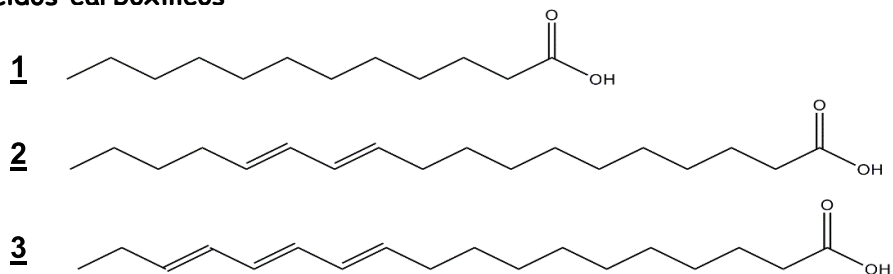
Figura 9 – Fluxograma resumido das extrações e fracionamentos das folhas de *P. amarus*



Na Figura 10 estão apresentadas as estruturas das substâncias identificadas nos extratos e frações de *P. amarus*.

Figura 10 - Substâncias identificadas nos extratos e frações de *Phyllanthus amarus*.

Ácidos carboxílicos



1-ác.palmitico; **2**-ác.linoleico; **3**-ác.linolênico; **4**-5-demetoxinirantina; **5**-filantina;

6-filtetralina; **7**-nirtetralina; **8**-hipofilantina; **9**-nirantina.

Das lignanas identificadas por seus tempos de retenção e espectros de massa e (CG-EM), a 5-demetoxinirantina **4**, a filantina **5** e a nirantina **9** pertencem à

classe das diarilbutanas; a filtetralina **6**, a nirtetralina **7** e a hipofilantina **8**, pertencem à classe das ariltetralinas. (Kassuya *et al.*, 2005).

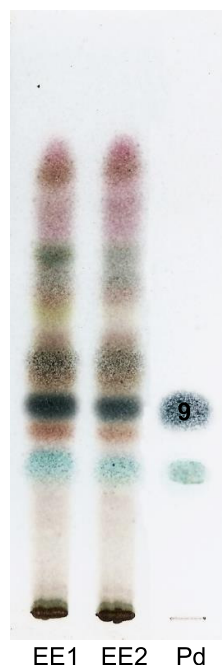
4.1. Extratos etanólicos (EE)

4.1.1. Estudos Fitoquímicos dos extratos EE

4.1.1.1. CCD dos extratos EE

Os extratos etanólicos (EE1 e EE2) foram obtidos a partir das folhas secas e moídas de *P. amarus* com rendimento de 9,6% e 13,3 %, respectivamente. O maior rendimento observado no EE2 deve-se a maior eficiência de extração que foi realizada em três etapas enquanto o EE1 em duas. A análise por CCD dos extratos revelou a presença de substâncias nirantina e filantina bem como pigmentos e outras substâncias reativas com anisaldeído, possivelmente terpenos e esteroides (Figura 11).

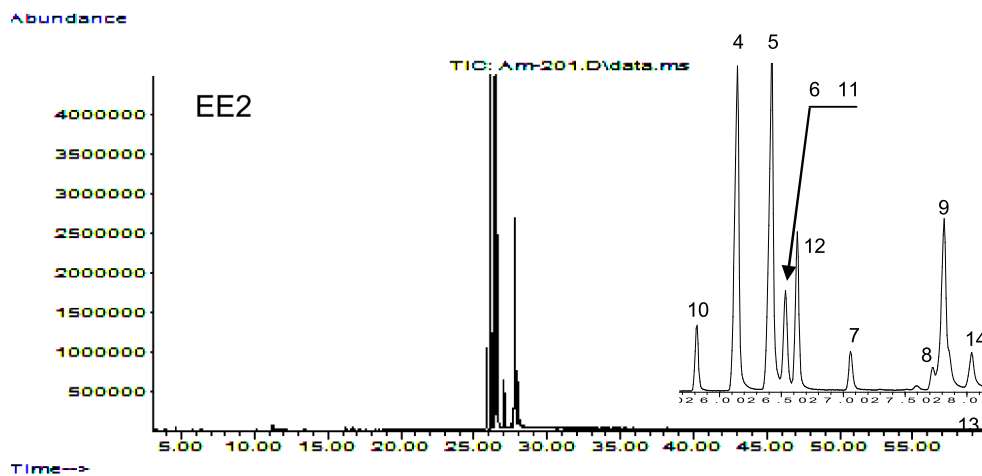
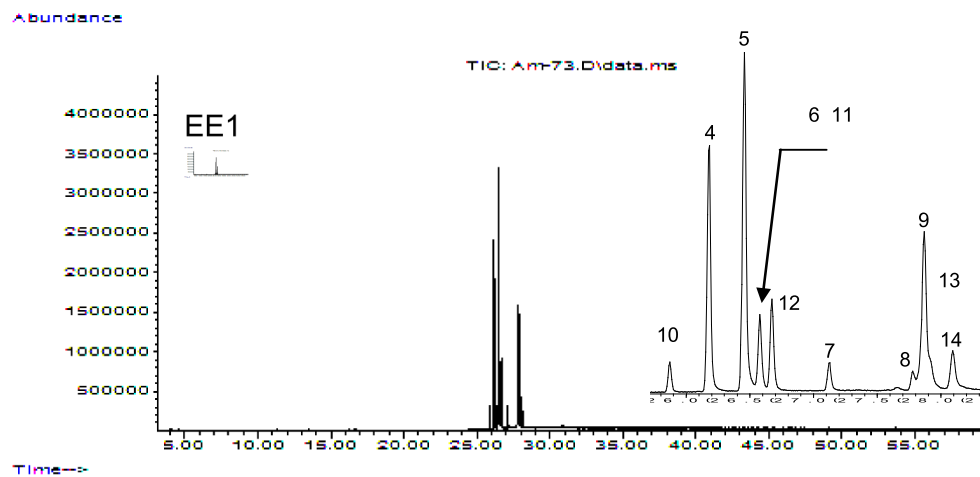
Figura 11 – CCD dos extratos EE1 e EE2; fase móvel hexano:acetato de etila (7:3 v/v); revelador anisaldeído sulfúrico (Pd: nirantina (9); filantina (5)).



4.1.1.2. GC-EM dos extratos EE

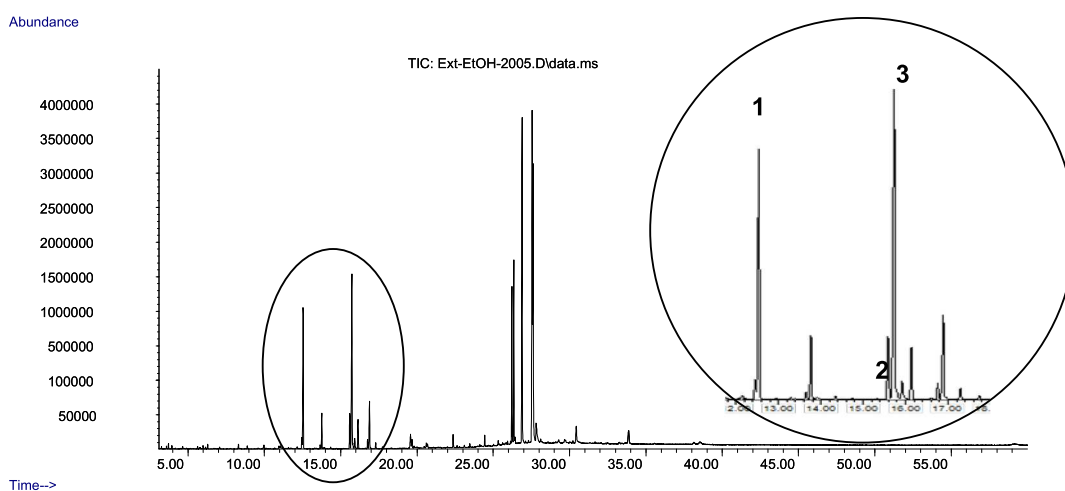
Na comparação das análises dos extratos etanólicos por CG-EM (Figura 12) vê-se uma grande semelhança em seus cromatogramas, com o mesmo conjunto de picos entre os tempos de retenção de 25 e 30 min, sendo estes picos característicos das lignanas presentes em *P. amarus*.

Figura 12 - Cromatogramas dos extratos EE1 e EE2 das folhas de *P. amarus*. Nos detalhes segue a identificação das lignanas conforme disposto na Tabela 1.



A derivatização do extrato EE por metilação com diazometano mostrou a presença de ácidos carboxílicos. O extrato EE derivatizado apresenta, em seu cromatograma (Figura 13), os picos com tempo de retenção de 12,5 min, 15,6 min e 15,7 min correspondentes ao éster metílico do ácido palmítico **1**, ao éster metílico do ácido linoleico **2** e ao éster metílico do ácido linolênico **3**.

Figura 13 – Cromatograma do EE1 metilado, destacando-se os picos referentes aos ésteres metílicos dos ácidos palmítico **1**, linoleico **2** e linolênico **3**.



As substâncias detectadas e identificadas por CG-EM neste trabalho encontram-se listadas na Tabela 3 sendo que a numeração que as identifica será utilizada nos cromatogramas subsequentes. Para cada substância, o fragmento referente ao íon molecular está grafado em **negrito** e o pico base sublinhado.

Tabela 3 - Principais fragmentos observados nos espectros de massas das substâncias presentes em *P. amarus*.

Substância	Fragmentação m/z (%)							
Palmitato de metila (1)	270	(10)	143	(19)	87	(70)	<u>74</u>	(100)
(12,80) *	75	(18)	55	(22)	43	(27)	41	(19)
Linoleato de metila (2)	294	(11)	9	(63)	82	(48)	81	(90)
(15,85) *	68	(44)	<u>67</u>	(100)	55	(60)	41	(50)
Linolenato de metila (3)	292	(4)	95	(52)	93	(49)	81	(40)
(16,01) *	<u>79</u>	(100)	67	(60)	55	(43)	41	(43)
Lignana 10	386	(7)	218	(11)	187	(26)	173	(11)
(25,85)	136	(28)	<u>135</u>	(100)	77	(16)	45	(12)
5-Demetoxinirantina (4)	402	(23)	203	(19)	187	(14)	177	(14)
(26,20)	152	(35)	<u>151</u>	(100)	136	(14)	135	(60)
Filantina (5)	418	(15)	203	(19)	189	(7)	177	(13)
(26,44)	152	(32)	<u>151</u>	(100)	107	(9)	45	(8)
Lignana 11	400	(69)	324	(22)	<u>323</u>	(100)	308	(17)
(26,50)	296	(37)	201	(20)	135	(49)	45	(36)
Filtetralina (6)	416	(76)	353	(51)	<u>339</u>	(100)	321	(32)
(26,50)	312	(32)	201	(31)	151	(95)	45	(41)
Lignana 12	400	(58)	337	(61)	<u>323</u>	(100)	308	(53)
(26,60)	307	(61)	185	(50)	151	(51)	45	(58)
Nirtetralina (7)	430	(100)	367	(32)	353	(78)	222	(44)
(27,05)	215	(81)	208	(81)	151	(66)	45	(65)
Hipofilantina (8)	430	(66)	367	(40)	353	(56)	215	(45)
(27,77)	208	(48)	207	(79)	<u>151</u>	(100)	45	(10)
Nirantina (9)	432	(31)	430	(23)	203	(26)	166	(90)
(27,85)	165	(65)	152	(34)	<u>151</u>	(100)	45	(20)
Lignana 13	432	(36)	<u>166</u>	(100)	151	(93)	165	(69)
(27,95)	152	(34)	203	(28)	217	(17)	45	(14)
Lignana 14	370	(37)	371	(8)	152	(15)	<u>151</u>	(100)
(28,35)	136	(8)	135	(26)	107	(7)	77	(11)

*após metilação do extrato EE.

Nas figuras 14 a 17 estão apresentados os espectros de massas das substâncias observadas no extrato EE de *P. amarus* e testadas *in vitro*. Os espectros de massas das demais substâncias encontram-se no anexo.

Figura 14 - Espectro de massas da substância de tempo de retenção 26,1 minutos – 5-demetoxinirantina (**4**) (MM 402).

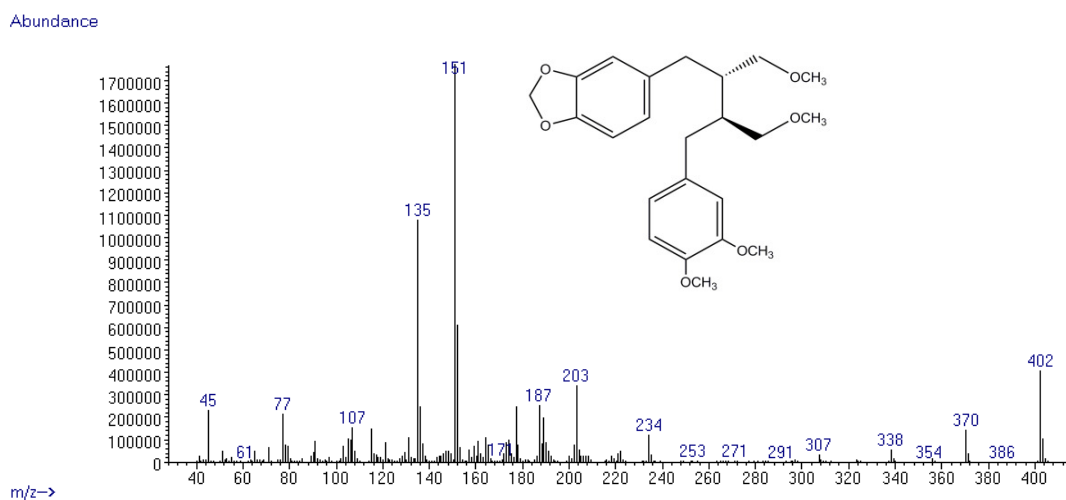


Figura 15 - Espectro de massas da substância de tempo de retenção 26,4 minutos – filantina (**5**) (MM 418).

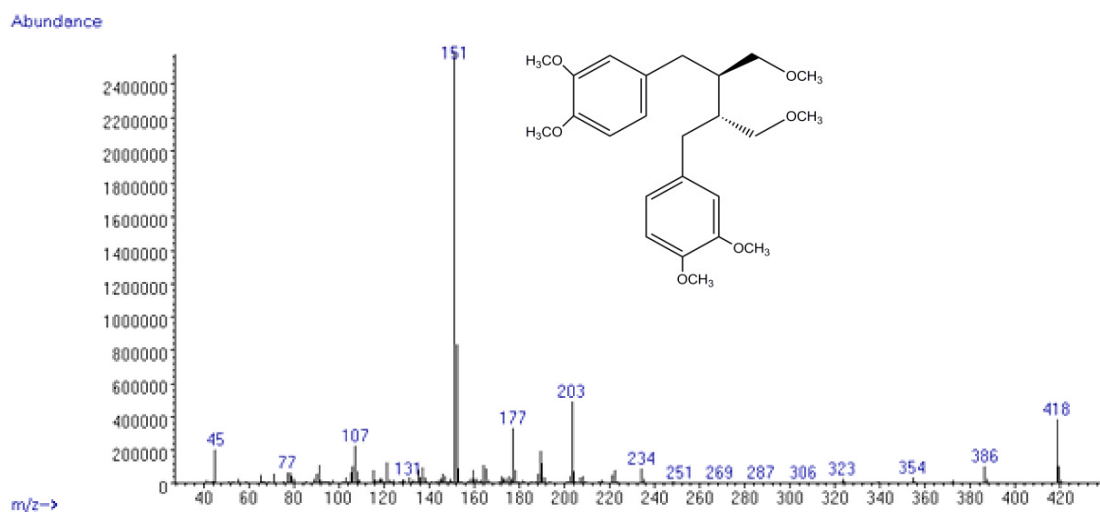


Figura 16 - Espectro de massas da substância de tempo de retenção 27,7 minutos – hipofilantina (**8**) (MM 430).

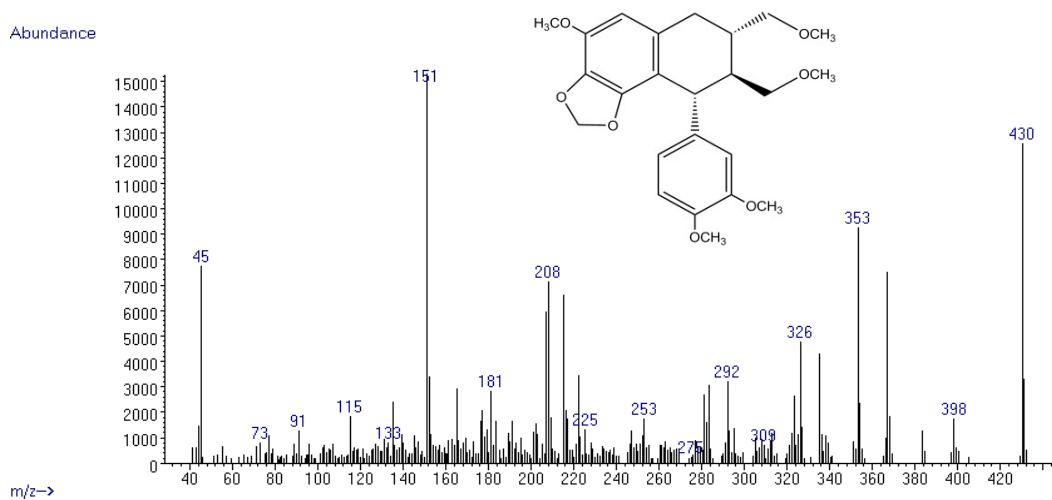
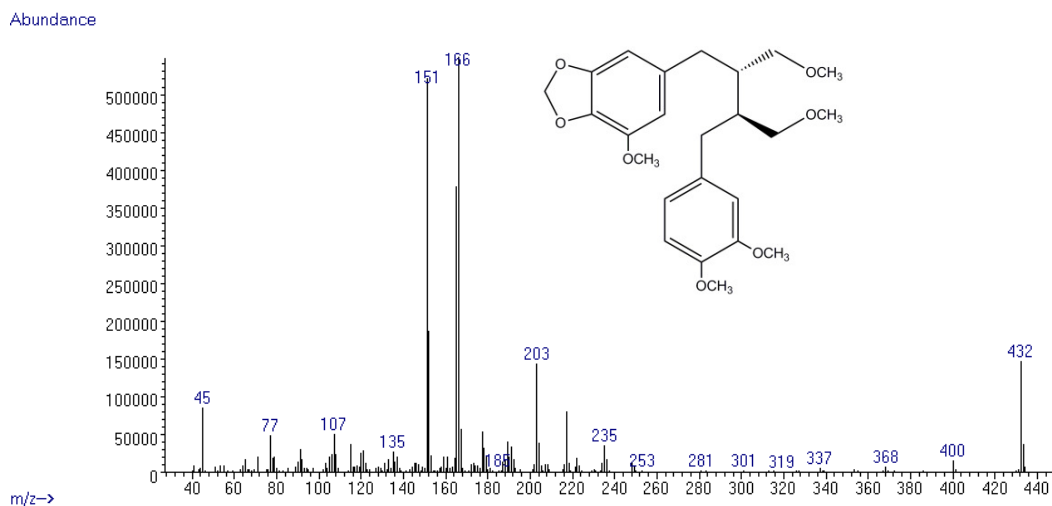
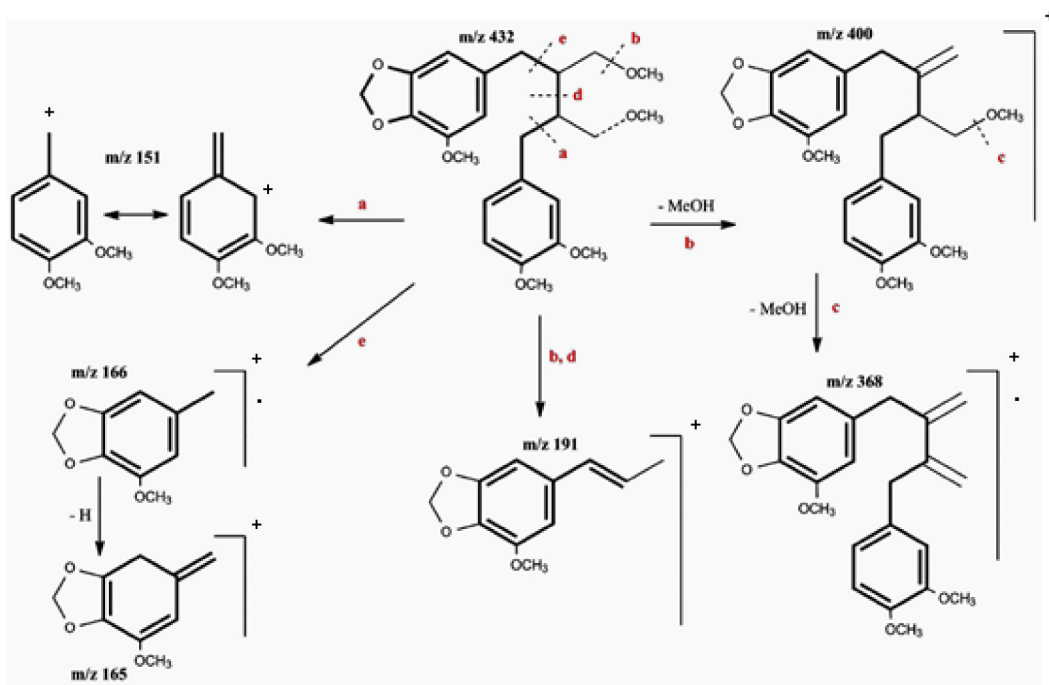


Figura 17 - Espectro de massas da substância de tempo de retenção 27,8 minutos – nirantina (**9**) (MM 432).



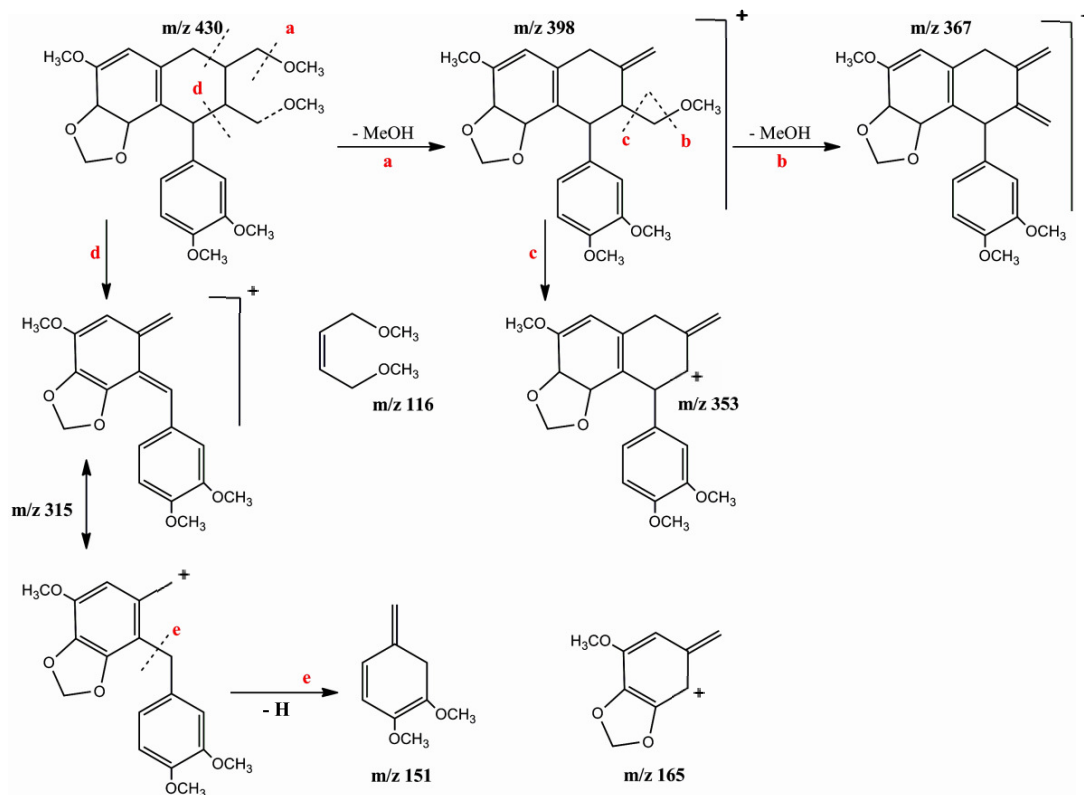
O espectro de massas da filantina (**5**, Figura 15) apresentou os fragmentos M^+ 418 (18%); 386 (6%), 353; 203 (27%); 151 (100%) e 107 (10%) m/z . O pico base em m/z 151 é obtido por fragmentação da ligação C7-C8, como na nirantina (**9**), (caminho **a**, Figura 18), que origina um cátion benzílico estabilizado pelos elétrons do anel aromático.

Figura 18 - Principais fragmentos observados na fragmentação da nirantina (**9**)



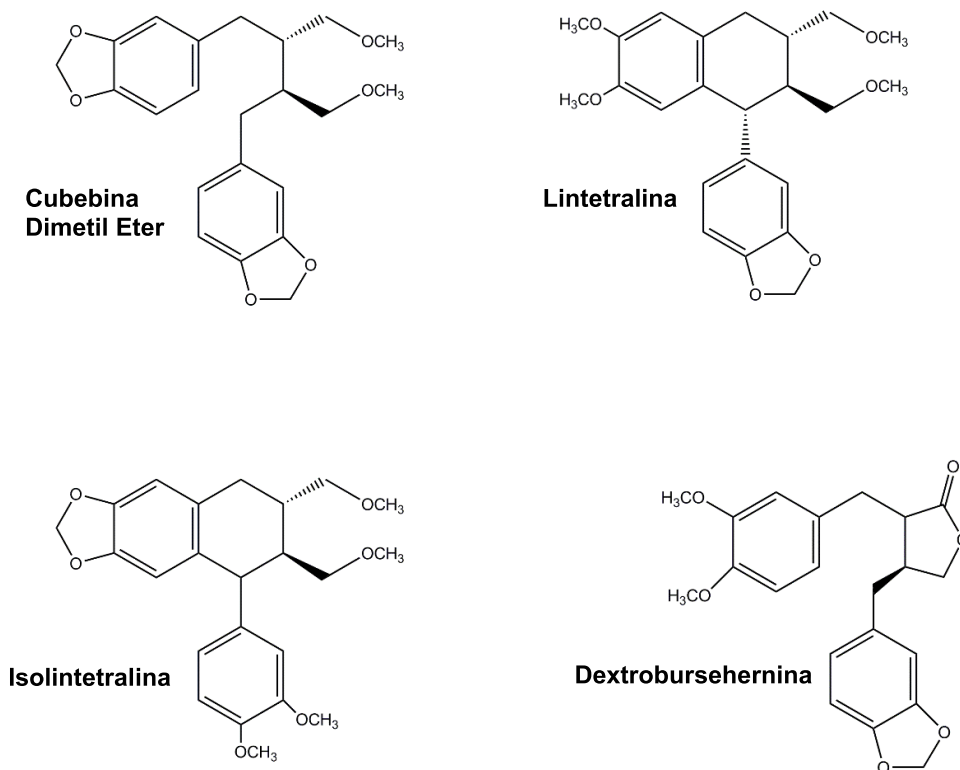
A hipofilantina (**8**) (MM 430), uma lignana da classe das ariltetralinas, apresenta fragmentação semelhante à da nirantina (**9**), exibindo entretanto, além do fragmento m/z 151 e m/z 165, o fragmento m/z 353, indicativo da classe das ariltetralinas (Figura 19). As fragmentações da hipofilantina (**8**) e nirantina (**9**) foram estudadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

Figura 19 - Principais fragmentos observados para hipofilantina (8)



Além dessas lignanas, observou-se a presença de outras substâncias com tempo de retenção de 25,86 min e m/z 386, lignana **10**, com padrão de fragmentação muito semelhante ao dimetil éter da cubebina (Elfahimi *et al.*, 2006); tempo de retenção de 26,50 min e m/z 400, lignana **11**, com perfil de fragmentação semelhante ao da lintetralina (Enders *et al.*, 2003); tempo de retenção de 26,60 min e m/z 400, lignana **12**, com perfil de fragmentação semelhante ao da isolintetralina (Huang *et al.*, 1992); tempo de retenção 28,35 min e m/z 370, lignana **14**, com perfil de fragmentação semelhante à da dextrobursehernina (Satyanarayana & Venkateswarlu, 1991), ilustradas na Figura 20.

Figura 20 – Lignanas com padrões de fragmentação semelhantes às lignanas **10**, **11**, **12** e **14** detectadas nos extratos e frações de *P. amarus*.



A lignana **13** elui quase ao mesmo tempo que a nirutina (**9**) e apresenta padrão de fragmentação muito semelhante, à exceção do fragmento m/z 416 (39,7%). Estas substâncias requerem análises adicionais para a correta determinação de suas estruturas.

As porcentagens relativas das lignanas presentes nos extratos etanólicos (Tabela 4) mostram perfis muito semelhantes mas diferem significativamente dos extratos obtidos em 2005 que apresentavam teores menores de filantina e teores maiores de nirtetralina e hipofilantina e ausência da 5-demetoxinirutina e outras lignanas (Oliveira, 2012). Esta grande diferença entre os teores pode estar associada a fatores sazonais e climáticos, entre outros que interferem na biossíntese dessas substâncias.

A análise por CG-EM (Tabela 4) de ambos os extratos etanólicos mostra o mesmo perfil e confirma a presença das lignanas 5-demetoxinirantina (**4**) (tempo de retenção 26,1 min; m/z 402), filantina (**5**) (tempo de retenção 26,4 min; m/z 418), filtetralina (**6**) tempo de retenção 26,5 min; m/z 416), nirtetralina (**7**) (tempo de retenção 27,0 min; m/z 430), hipofilantina (**8**) (tempo de retenção 27,7 min; m/z 430) e nirantina (**9**) (tempo de retenção 27,8 min; m/z 432), já isoladas e identificadas por nosso grupo de pesquisas

Tabela 4 - Porcentagem relativa das lignanas nos extratos EE1 e EE2.

Lignana	EE1 (%)	EE2 (%)	EE2005 (%)
Lignana 10	2,4	4,0	---
5-Demetoxinirantina 4	20,0	24,9	---
Filantina 5	30,0	27,0	9,7
Filtetralina 6 /Lignana 11	7,2	7,5	11,4
Lignana 12	8,1	10,6	---
Nirtetralina 7	2,7	2,7	25,6
Hipofilantina 8	1,8	1,5	28,2
Nirantina 9 /Lignana 13	21,2	17,6	25,0
Lignana 14	5,5	4,1	---

4.1.2. Testes *in vitro* do extrato EE

Para realização dos ensaios de atividade esquistossomicida e citotoxicidade *in vitro*, as amostras foram avaliadas inicialmente comparando-se a solubilidade dos extratos com e sem polivinilpirrolidona (PVP), conhecido excipiente para solubilização de substâncias pouco solúveis em água (Vasconcelos *et al.*, 2007), avaliando-se os seguintes parâmetros: mortalidade dos vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* e oviposição em função da concentração e tempo de exposição.

4.1.2.1. Dispersão sólida com PVP do extrato EE

Devido à baixa solubilidade em água do extrato EE e frações obtidas de *P. amarus*, optou-se pelo uso do PVP, que facilita a dissolução de substâncias pouco solúveis em água pelo fenômeno da dispersão sólida, onde um ou mais ingredientes ativos são dispersos num veículo ou matriz inerte hidrossolúvel no estado sólido. Dispersões sólidas representam uma útil técnica farmacêutica para aumentar a dissolução, absorção e eficácia terapêutica de fármacos pouco solúveis em meio aquoso. Vários pesquisadores relatam resultados encorajadores com diferentes fármacos usando a técnica de dispersão sólida (Kaur *et al.*, 2012). Sendo assim, com objetivo de avaliar a eficácia da dispersão das amostras em PVP, os testes *in vitro* foram realizados inicialmente com o extrato etanólico disperso e não disperso em PVP.

Com efeito, a dispersão sólida do extrato EE com PVP apresentou mistura hidrossolúvel e propiciou uma melhor atividade *in vitro* (Tabela 5). A partir desse resultado, todas as amostras avaliadas foram dispersas em PVP, a exceção do PZQ.

4.1.2.2. Atividade esquistossomicida do extrato EE

Num primeiro ensaio ficou clara a eficiência da dispersão do extrato etanólico em PVP, sendo que o PVP mostrou-se inerte (Tabela 5). A dispersão sólida com o PVP melhorou drasticamente a atividade esquistossomicida do extrato etanólico, provavelmente devido à melhor disponibilidade das moléculas bioativas por efeito de sua solubilização no meio aquoso.

Na menor concentração ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) temos 80% de mortalidade para machos e fêmeas para o EE em PVP, contra nenhuma ocorrência para o extrato EE1 sem PVP.

O praziquantel, testado sem adição de PVP, mostrou-se ativo em todas as concentrações, enquanto que o PVP não mostrou nenhuma atividade

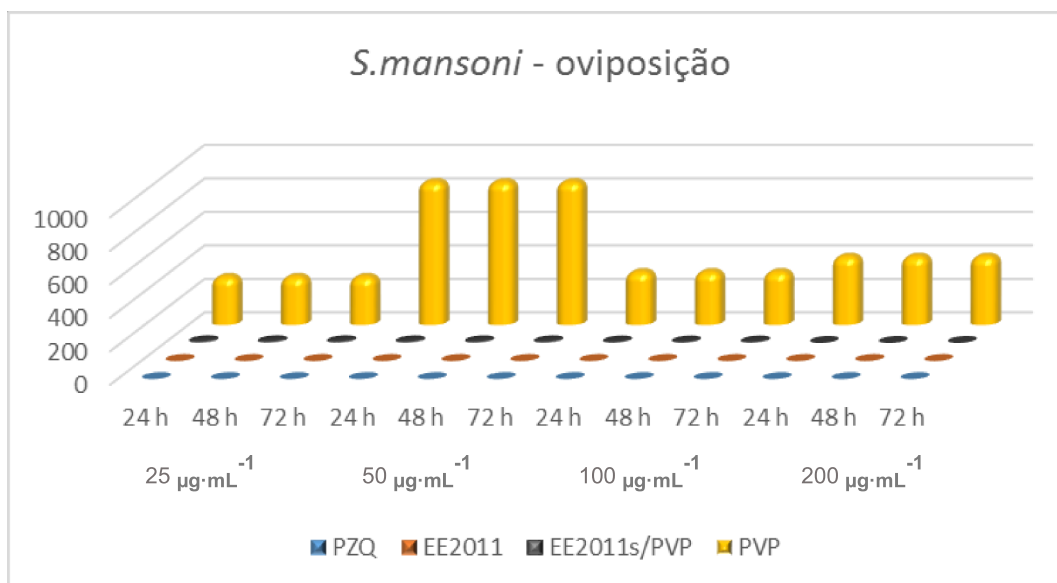
esquistossomicida, com resultados semelhantes ao do grupo controle negativo (PBS).

Tabela 5 - Mortalidade acumulada de *S. mansoni* machos e fêmeas com extrato EE1 de folhas de *P. amarus* formulado com PVP.

Concentração	Tempo	Mortalidade acumulada (%)							
		EE1		EE1 c/ PVP		PZQ		PVP	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6h	0	0	0	0	100	100	0	0
	24h	0	0	0	0	100	100	0	0
	48h	0	0	80	60	100	100	0	0
	72h	0	0	80	80	100	100	0	0
50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6h	0	0	0	0	100	100	0	0
	24h	0	0	0	0	100	100	0	0
	48h	0	0	100	80	100	100	0	0
	72h	20	0	100	100	100	100	0	0
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6h	0	0	0	0	100	100	0	0
	24h	0	0	100	100	100	100	0	0
	48h	20	20	100	100	100	100	0	0
	72h	100	100	100	100	100	100	0	0
200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6h	0	0	0	0	100	100	0	0
	24h	0	0	100	100	100	100	0	0
	48h	100	100	100	100	100	100	0	0
	72h	100	100	100	100	100	100	0	0
Controle (PBS)	6h	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0

O efeito na oviposição (Figura 21) é marcante em ambos os casos, embora no EE sem PVP observa-se ainda alguma presença de ovos (<10) nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A contagem para os grupos controle com PBS ficaram entre 249 e 461 ovos.

Figura 21 – Efeito do extrato EE1 com e sem PVP, PZQ e PVP sobre a oviposição de *S.mansoni*.



4.2. Partição líquido-líquido

4.2.1. Estudos Fitoquímicos das partições líquido-líquido

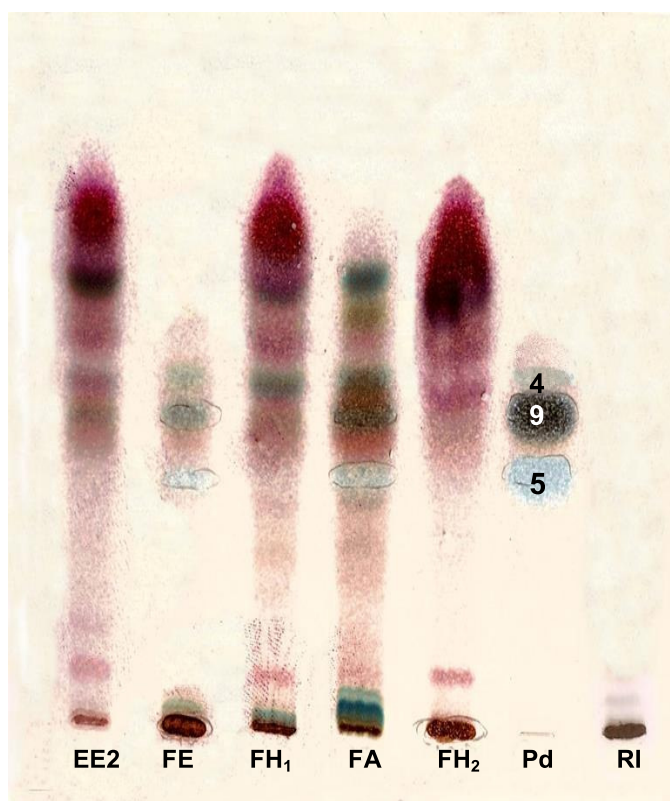
4.2.1.1. CCD da partição hexano-etanol-água e hexano-acetonitrila

O fracionamento de uma porção do extrato EE1 por partição líquido-líquido foi executado inicialmente com n-hexano e etanol 86%. Esta partição resultou na presença de lignanas nas duas fases. Por outro lado, o uso de partição com hexano:acetonitrila permitiu a melhor separação das lignanas das substâncias graxas, embora este procedimento gere uma quantidade maior de resíduo insolúvel.

Para análise por CCD das fases particionadas nos dois sistemas, foram utilizados padrões das lignanas filantina (**5**), nirantina (**9**) e 5-demetoxinirantina (**4**), isoladas previamente por nosso grupo de pesquisas. Nesta análise identificam-se, pelo R_f, sob luz ultra-violeta (254 nm) e revelação com anisaldeído, as lignanas 5-

demetoxinirantina, nirantina e filantina no extrato EE e frações FE, FH1 e FA. Na FH2 e no RI essas substâncias estão ausentes (Figura 22). A análise do RI por CCD indica a presença de substâncias mais polares.

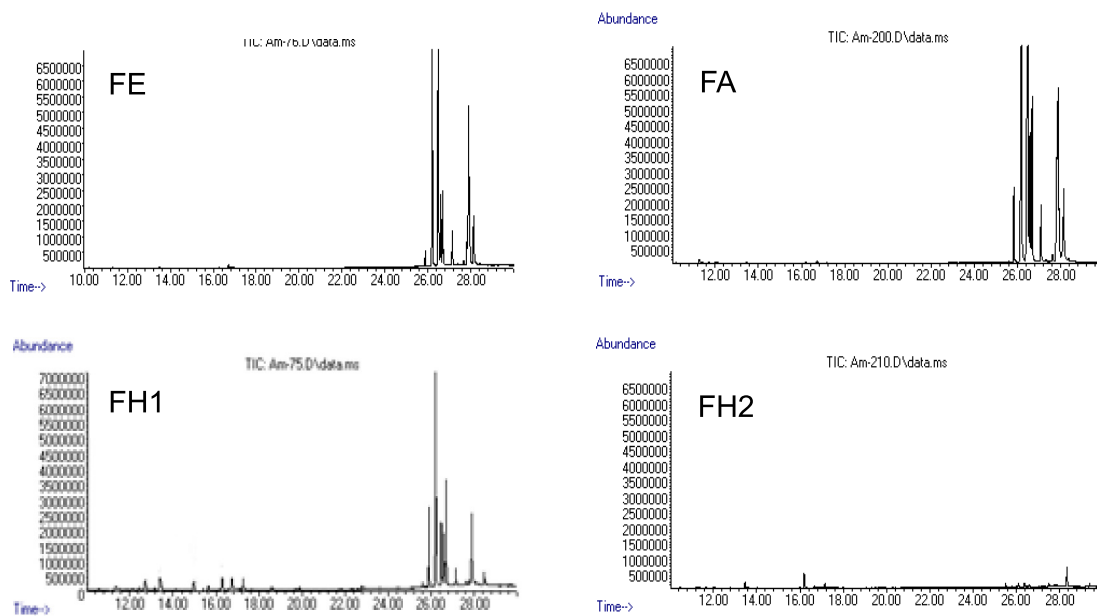
Figura 22 – Análise por CCD de extrato etanólico (EE2); fração etanólica (FE) e fração hexânica 1 (FH1) da partição hexano:etanol (FE e FH1); fração em acetonitrila (FA) e fração hexânica 2 (FH2) da partição hexano:acetonitrila; padrões de lignanas (4, 5 e 9) e resíduo insolúvel (RI) obtidas de folhas de *P. amarus*.



4.2.1.2. CG-EM da partição hexano-etanol-água e hexano-acetonitrila

A análise por CG-EM das frações obtidas a partir do extrato EE2 (Figura 23) permite comparar mais precisamente a eficiência dos dois sistemas de partição, evidenciando o melhor resultado para o processo de partição com hexano:acetonitrila.

Figura 23 - Cromatogramas das substâncias voláteis das partições hexano:etanol (FH1 e FE) e hexano:acetonitrila (FH2 e FA).



Na Tabela 6 são mostradas as porcentagens relativas das lignanas em cada etapa do fracionamento normalizadas pela área total das lignanas presentes antes da partição (EE2).

Tabela 6 – Lignanas presentes nas diferentes frações e suas porcentagens relativas após partição do EE em hexano:acetonitrila, obtidos por CG-EM e normalizados.

Lignanas *	EE2 (%)	FE (%)	FH1 (%)	FA (%)	FH2 (%)	RI (%)
Lignana 10	3,7	3,0	0,7	3,0	0,4	---
5-Demetoxinirantina (4)	18,6	10,1	9,1	20,7	1,2	0,3
Filantina (5)	33,9	3,0	16,5	26,3	0,7	0,4
Filtetralina(6)/Lignana 11	6,9	2,2	3,4	6,3	0,4	0,1
Lignana 12	6,4	4,3	3,1	8,2	0,7	0,1
Nirtetralina (7)	2,8	0,8	1,4	2,8	0,1	---
Hipofilantina (8)	2,1	---	1,0	1,8	---	0,2
Nirantina (9)/Lignana 13	21,6	4,3	10,5	18,4	0,3	0,1
<i>Lignana 14</i>	6,5	---	3,2	5,1	---	0,2

* valores estimados pela área relativa.

Fica evidente pela análise destes resultados que a extração com acetonitrila foi seletiva para as lignanas, ficando estas concentradas na acetonitrila e a respectiva fase hexânica com teores menores que 2 %, enquanto que na partição hexano:etanol, as lignanas distribuem-se de forma semelhante entre as fases. Tentativas feitas com outros *sistemas binários, ternários e quaternários não permitiram a mesma separação.*

4.2.2. Atividade esquistossomicida das frações FE, FH1, FA, FH2 e RI

As frações FE, FH1, FA, FH2 e RI foram dispersas em PVP e avaliadas quanto à atividade esquistossomicida para mortalidade (Tabela 7).

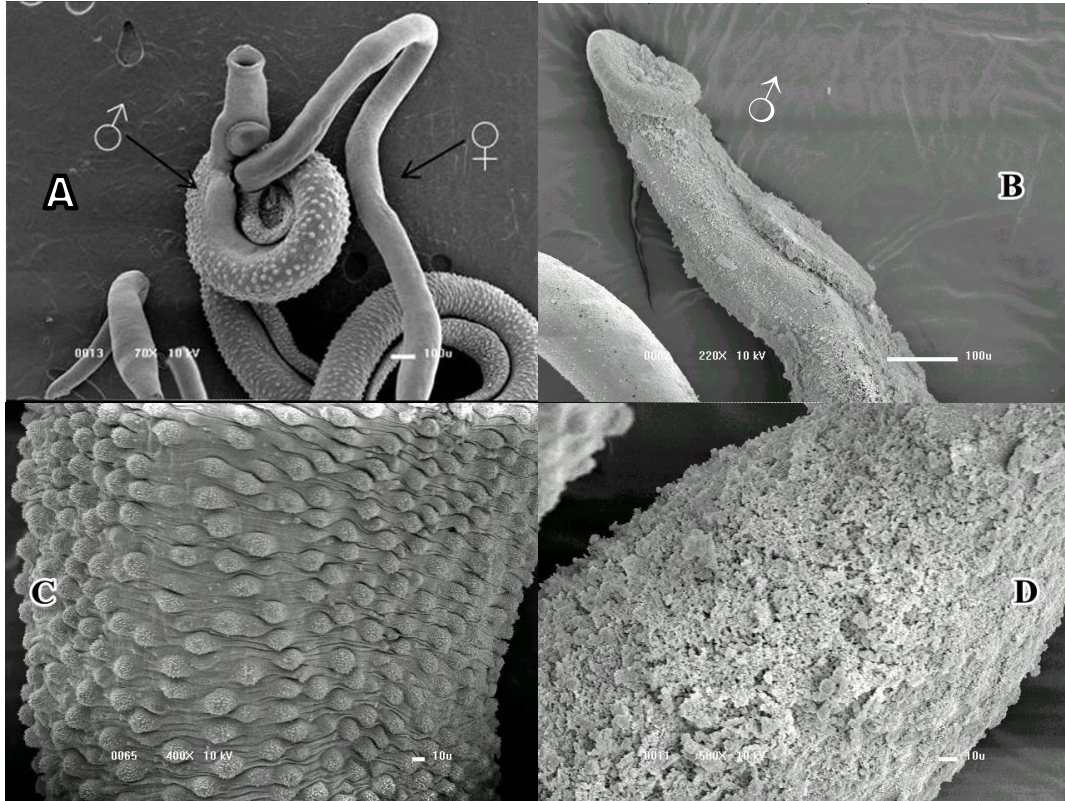
Tabela 7 - Mortalidade acumulada de *S. mansoni* machos e fêmeas com frações obtidas das partições líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *P. amarus dispersas em PVP*

Concentração	Tempo	Mortalidade acumulada (%)									
		FE		FH1		FA		FH2		RI	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
25 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	40	40	20	0	80	80	0	0	0	0
	48h	80	100	20	0	100	100	0	0	0	0
	72h	100	100	60	0	100	100	0	0	0	0
50 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
	24h	60	100	20	0	100	100	0	0	0	0
	48h	80	100	40	0	100	100	0	0	0	0
	72h	100	100	60	0	100	100	0	0	20	0
100 µg·mL ⁻¹	6h	20	20	0	0	100	80	0	0	0	0
	24h	100	100	20	0	100	100	0	0	0	0
	48h	100	100	60	40	100	100	0	0	0	20
	72h	100	100	80	100	100	100	0	0	60	100
200 µg·mL ⁻¹	6h	0	40	0	0	100	100	0	0	0	0
	24h	100	100	60	0	100	100	0	0	0	0
	48h	100	100	80	40	100	100	0	0	20	40
	72h	100	100	100	100	100	100	0	0	80	80
Controle (PBS)	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A fração FE foi mais ativa que a fração FH1, pois exibe atividade mesmo na concentração de 25 µg·mL⁻¹ para machos e fêmeas, enquanto a fração FH1 mostrou atividade contra ambos os sexos nas concentrações maiores de 100 µg·mL⁻¹. Por outro lado, as frações provenientes da partição hexano:acetoneitrila apresentam resultados diferentes, ou seja, a atividade se concentrou exclusivamente na fração FA, o que sugere a participação das lignanas, que estão concentradas nesta fração. A FH2 mostrou-se inativa quanto à mortalidade dos vermes e pouco ativa quanto à oviposição. Na figura 24 pode-se ver a extensão dos danos ao tegumento dos vermes machos e fêmeas onde, em **A**, vemos macho e fêmea com tegumento

íntegro e em **B** macho e porção dorsal de fêmea apresentando extensa descamação com total perda dos tubérculos e espinhos.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura dos vermes sem tratamento (**A e C**) e tratados com $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FA após 24 h (**B e D**). Em **A** vermes macho e fêmea; em **B** verme macho; em **C** tegumento íntegro mostrando os tubérculos; em **D** tegumento descamado com total ausência dos tubérculos.

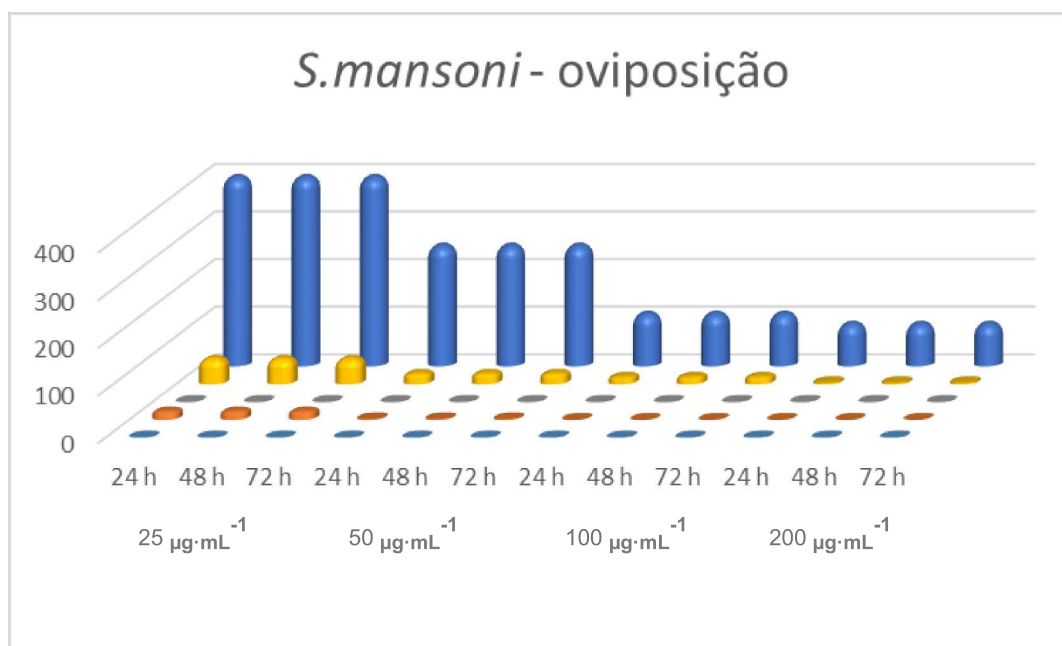


Em **C** vemos em detalhe o tegumento dos vermes do grupo controle, com o tegumento íntegro; em **D** vemos em detalhe o tegumento dos vermes que receberam $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FA, com destruição completa do tegumento após 24 horas.

A fração RI, isenta de lignanas e contendo substâncias mais polares, apresenta atividade esquistossomocida apenas nas concentrações e tempo de contato mais elevados, embora ainda mostre algum controle sobre a oviposição. Os resultados obtidos nas partições realizadas evidenciaram que a FA foi mais ativa na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do que as demais frações e extratos.

As frações provenientes das partições hexano:etanol:água e hexano:acetonitrila foram também testadas sobre a oviposição do *S. mansoni* (Figura 25).

Figura 25 – Efeito das frações FE, FH1, FA, FH2 e RI sobre a oviposição de *S.mansoni*.



O efeito sobre a oviposição mostra que ambas as frações provenientes da partição hexano:etanol:água (frações FE e FH1) exercem forte supressão sobre a oviposição. Na partição hexano:acetonitrila quase todo o efeito de supressão da oviposição concentra-se na fração FA não se contando um só ovo mesmo na menor concentração. Para o resíduo insolúvel (fração RI), é possível contar uma pequena quantidade de ovos (20-50) nas menores concentrações. A fração FH2 mostra ligeiro efeito supressivo nas concentrações mais elevadas. A contagem para os grupos controle com PBS ficaram entre 236 e 485 ovos.

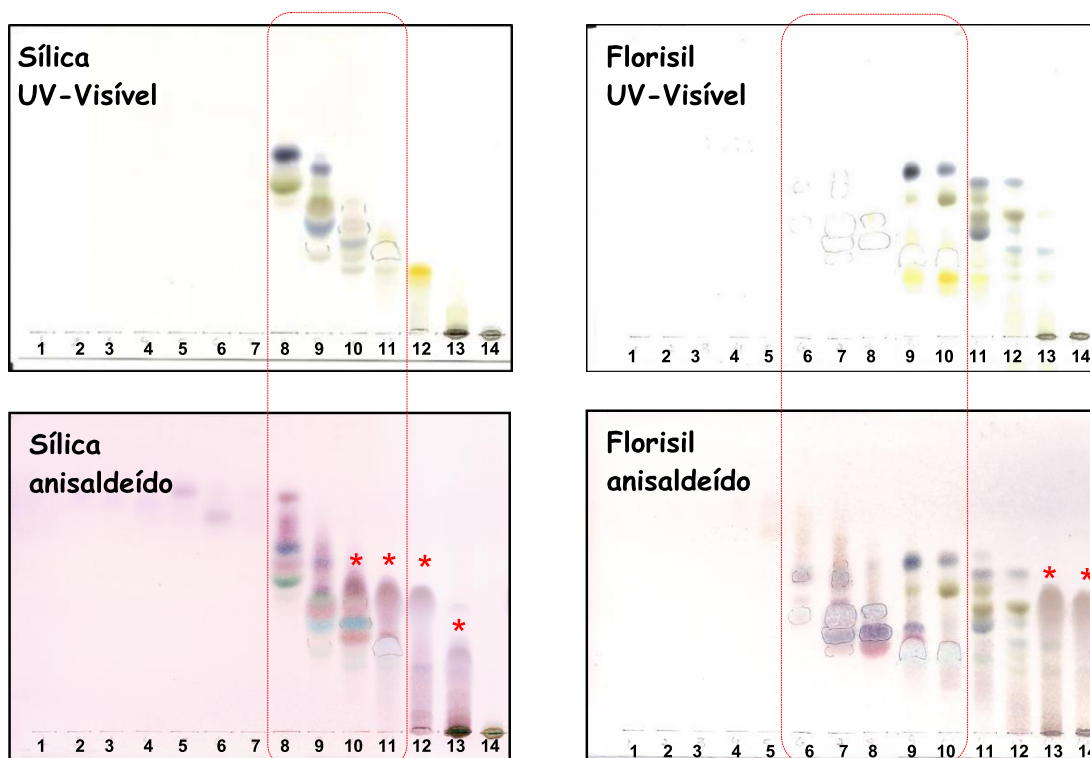
4.3. Fracionamento cromatográfico da fração FA

4.3.1. Estudos Fitoquímicos da fração FA

4.3.1.1. CCD do fracionamento cromatográfico da fração FA

Uma amostra da fração FA, enriquecida em lignanas, foi fracionada por cromatografia em colunas clássicas utilizando Florisil® (silicato de magnésio) e outra amostra da fração FA utilizando sílica gel a fim de comparar a eficiência das fases estacionárias. Na Figura 26 estão apresentadas as CCDs das frações contendo lignanas, assinaladas pela linha tracejada.

Figura 26 - Comparação dos fracionamentos obtidos em coluna cromatográfica de sílica e Florisil®.

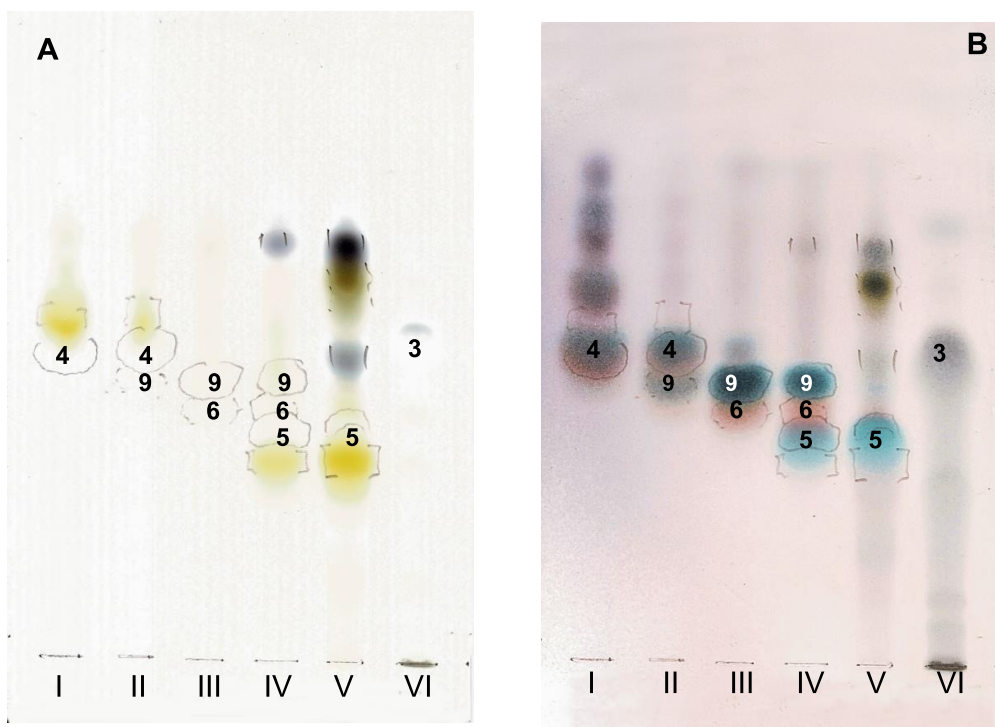


As manchas verdes, azuis, amarelas e cinzas, sob luz visível, indicam a presença de substâncias indesejadas (frações 9 a 14 em Florisil® e 8 a 14 em sílica). Fase estacionária: sílica; fase móvel hexano:acetato de etila 60:40 (v/v); revelador solução de anisaldeído. * Ácido graxo livre

O uso de Florisil® mostrou melhor desempenho para se obter a maior parte das lignanas sem substâncias coloridas, exceção feita à filantina nas frações 9 e 10 (Figura 26). Todas as frações contendo lignanas obtidas por cromatografia em sílica, contém substâncias coloridas (frações 7 a 14).

As manchas sinalizadas com asterisco apresentam-se, imediatamente após revelação com anisaldeído, com cor cinza esverdeada, típica de ácidos graxos de cadeia longa. Estas substâncias ficam isoladas das lignanas quando se faz o fracionamento com o Florisil® (frações 13 e 14) e permaneceram misturadas às lignanas no fracionamento por sílica (frações 10-13). Por causa da melhor separação cromatográfica, o fracionamento da fração FA (4,0 g) foi realizado utilizando-se o Florisil® como fase estacionária e como fase móvel as dez misturas de solventes descritas na Tabela 2. Na figura 27 pode-se observar a análise por CCD destas frações.

Figura 27 – Análise por CCD das frações obtidas da fração FA por cromatografia em Florisil. **A**-UV-visível; **B**-Anisaldeído sulfúrico; a numeração das manchas refere-se às lignanas na Tabela 1. Fase móvel Hexano:Acetato de etila 60:40 (v/v).



A placa A, observada sob luz visível, mostra a pigmentação escura na fração V, que também apresenta filantina. As frações I a V apresentam manchas que

absorvem sob luz UV a 254 nm, o que é uma característica das lignanas. A placa revelada com solução de anisaldeído sulfúrico (B) desenvolve as cores características das lignanas estudadas, ou seja, nas frações **I-II** ficaram visíveis as manchas correspondentes à 5-demetoxinirantina (**4**) e à nirantina (**9**); na fração **III** observou-se a nirantina (**9**) com forte intensidade e a nirtetralina (**6**); a fração **IV** mostrou a presença de nirantina (**9**), nirtetralina (**6**) e filantina (**5**); a fração **V** mostrou a presença da filantina (**5**); a fração **VI** contém uma substância (**3**) que não absorve luz visível e nem fluoresce sob luz UV a 254 nm ou a 366 nm, identificada em análise posterior (CG-EM) predominantemente como ácido linolênico.

4.3.1.2. GC-EM do fracionamento cromatográfico da fração FA

Os dados da CCD confirmam boa separação das principais lignanas (Tabela 8), já observada na análise por CCD, sendo possível avaliar o efeito de cada uma delas na atividade esquistosomicida *in vitro*

Tabela 8 – Porcentagem relativa das substâncias identificadas nas frações obtidas por coluna cromatografica em Florisil® e analisadas por CG-EM.

Substância	Fr I (%)	Fr II (%)	Fr III (%)	Fr IV (%)	Fr V (%)	Fr VI (%)
Palmitato de metila 1						21,7
Linoleato de metila 2						8,9
Linolenato de metila 3						69,4
Lignana 10	18,6	0,6				
5-Demetoxinirantina 4	43,9	58,2	7,4			
Filantina 5				38,1	94,9	
Filtetralina 6	27,6	15,9	0,7			
Lignana 11	7,8	9,4	2,9	15,6	5,1	
Nirtetralina 7	1,2	6,1	4,6			
Hipofilantina 8		0,9				
Nirantina 9 /Lignana 13		8,9	33,0	26,6		
Lignana 13			43,6	8,9		
Lignana 14			7,8	10,9		

* Após metilação com solução de diazometano

A composição de ácidos graxos presentes na fração **VI** foi confirmada pela metilação da amostra com solução de diazometano, demonstrando predominância do ácido linolênico (18:3 ω -3) e em menor concentração o ácido palmítico (12:0) e o ácido linoleico (18:2 ω -6).

4.3.2. Atividade esquistossomicida do fracionamento cromatográfico da fração FA

As frações obtidas no fracionamento da FA por cromatografia em coluna com Florisil® foram testadas contra *S. mansoni in vitro* e os resultados estão descritos na Tabela 9.

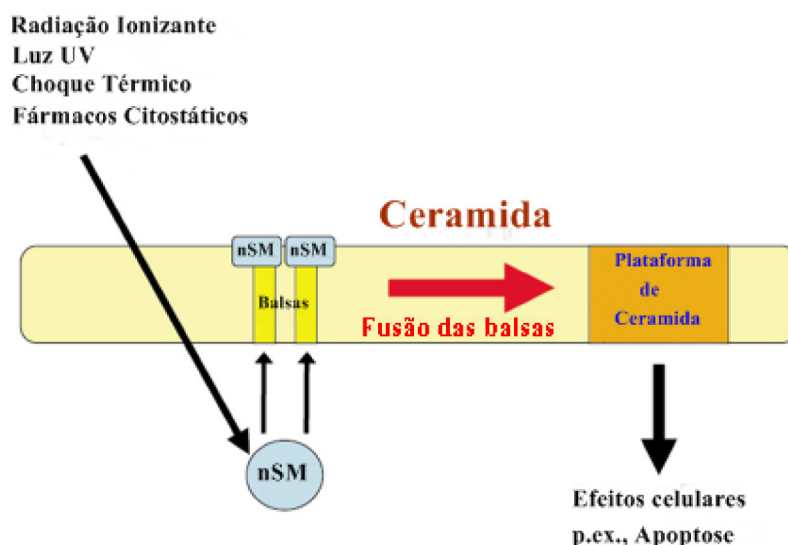
Tabela 9 - Mortalidade acumulada de *S. mansoni* machos e fêmeas com frações obtidas da cromatografia da fração FA em coluna de Florisil®.

Conc.	Tempo	Mortalidade (%)											
		Fr I		Fr II		Fr III		Fr IV		Fr V		Fr VI	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
25 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
	72h	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	80	0
50 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	48h	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	80	80
	72h	0	0	60	0	40	20	0	0	0	0	80	80
100 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
	48h	20	0	40	0	60	0	0	0	0	0	100	100
	72h	60	0	80	0	100	0	40	40	0	0	100	100
200 µg·mL ⁻¹	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80
	24h	20	0	40	20	0	0	40	20	0	0	100	100
	48h	60	0	60	60	100	20	100	80	0	0	100	100
	72h	100	0	100	100	100	60	100	100	0	0	100	100
Controle (PBS)	6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os resultados descritos na Tabela 9 mostram que após 72 horas a fração I (43% 5-demetoxinirantina) apresenta letalidade a partir de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com 100% de mortalidade na dosagem de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os machos, sem afetar as fêmeas; a fração II (58% de 5-demetoxinirantina) começa a matar 40% dos machos com a dosagem de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo 100% fatal com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os machos e $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para machos e fêmeas. A maior concentração de 5-demetoxinirantina nesta fração pode ser a responsável por esta melhoria na atividade esquistossomicida em relação a fração I. A fração III, rica em nirantina (33%), mostra atividade semelhante à fração II, porém mais ativa sobre os machos (100% de mortalidade com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e menos intensa sobre as fêmeas (60% de mortalidade com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A fração IV, que contém predominantemente filantina (37%) e nirantina (26%) elimina os vermes machos e fêmeas a partir de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ambos na dosagem de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (os machos em 48h), no entanto a fração V, contendo 93% de filantina, não provoca nenhuma morte entre os vermes mesmo na mais alta concentração, indicando que atividade se deve à nirantina. Já a fração VI, contendo 70% de AL, mostrou a maior atividade dentre as frações, eliminando 80% dos vermes machos com $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, na dosagem de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos os vermes machos e fêmeas em 24 h. A atividade esquistossomicida dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) já havia sido publicada por El Ridi e colaboradores (2003) que testaram *in vitro* a influência de óleos ricos em PUFA na antigenicidade de esquistossômulos pulmonares, demonstrando que estes ácidos interferem na estabilidade da membrana externa do verme, expondo moléculas antigênicas. Tallima (2005) demonstrou que uma dieta rica em PUFA ministrada a camundongos infectados com *S. mansoni* diminui significativamente a contagem de vermes quando comparado à dieta padrão e sugere que o mecanismo de ação dos PUFA pode ser pela sua ação ativadora da esfingomielinase neutra (nSMase), representado na Figura 28.

Figura 28 – Esquema de produção de ceramida por ativação da esfingomielinase neutra (nSM) na membrana celular (adaptado de Gunawardena *et al.*,2004)



A esfingomielinase é ativada hidrolisando a esfingomielina, componente da membrana do *S. mansoni*, desencadeando pelo menos dois importantes fenômenos: desestabilização da membrana que, tendo aumentada sua fluidez, propicia a já citada exposição de moléculas antigênicas e produção de ceramida, substância que atua como mediadora no processo de morte celular programada por apoptose.

Esse grupo de pesquisa publicou vários trabalhos testando especificamente o ácido araquidônico (AA, C20:4, n-3) como potencial auxiliar no tratamento da esquistossomose (El Ridi *et al.*, 2010, 2012). Nestes estudos a menor concentração efetiva de AA testada foi de 5 mM ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 60 x maior do que a menor concentração efetiva de AL avaliada em nossos ensaios *in vitro*).

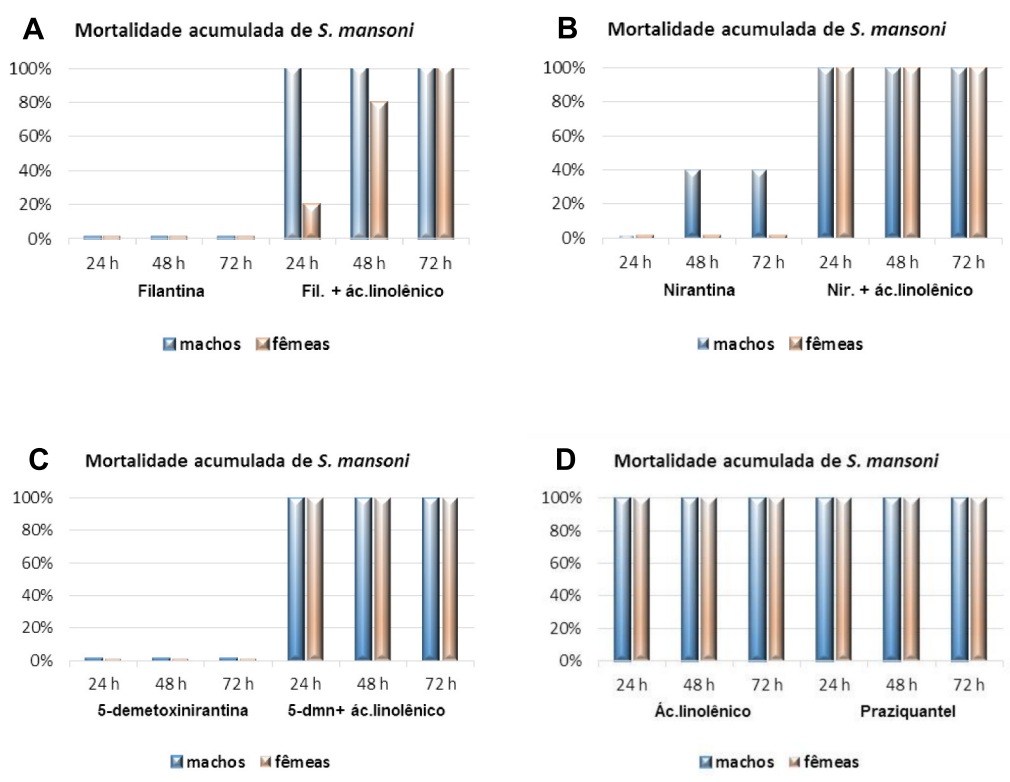
Com relação a oviposição, os resultados obtidos foram promissores visto que as frações testadas foram 100% eficazes na menor concentração ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), mesmo para as frações contendo filantina e hipofilantina que foram 100% ineficazes quanto à mortalidade dos vermes. A inibição total da oviposição tem sido relatada em várias pesquisas com produtos naturais como a curcumina extraída da *Curcuma*

longa (Magalhães *et al.*, 2009) e a piplartina isolada da *Piper tuberculatum* (Moraes *et al.*, 2011). Na tese de Oliveira (2012) a filantina não mostrou inibição para a oviposição, talvez devido à baixa solubilidade dos extratos e frações testados sem o auxílio de um adjuvante que propiciasse esta solubilização.

4.4. Atividade esquistossomocida das lignanas e ácido linolênico

Como decorrência destes resultados, optamos por testar o ácido linolênico isolado e associado à lignanas filantina, nirantina e 5-demetoxinirantina, sendo todas as amostras previamente dispersadas em PVP (Figura 29).

Figura 29 – Gráficos de mortalidade acumulada das lignanas e ácido linolênico isolados e em associação*.



* concentração das substâncias isoladas: 25 µg·mL⁻¹; em associação: 12,5 µg·mL⁻¹ cada.

Na Figura 29 pode-se comparar os resultados obtidos nos testes *in vitro* do ácido linolênico e das lignanas filantina, nirantina e 5-demetoxinirantina isoladamente, na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e em associação, quando se fez misturas binárias de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido linolênico com $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada lignana. O praziquantel foi testado sem adição de PVP na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

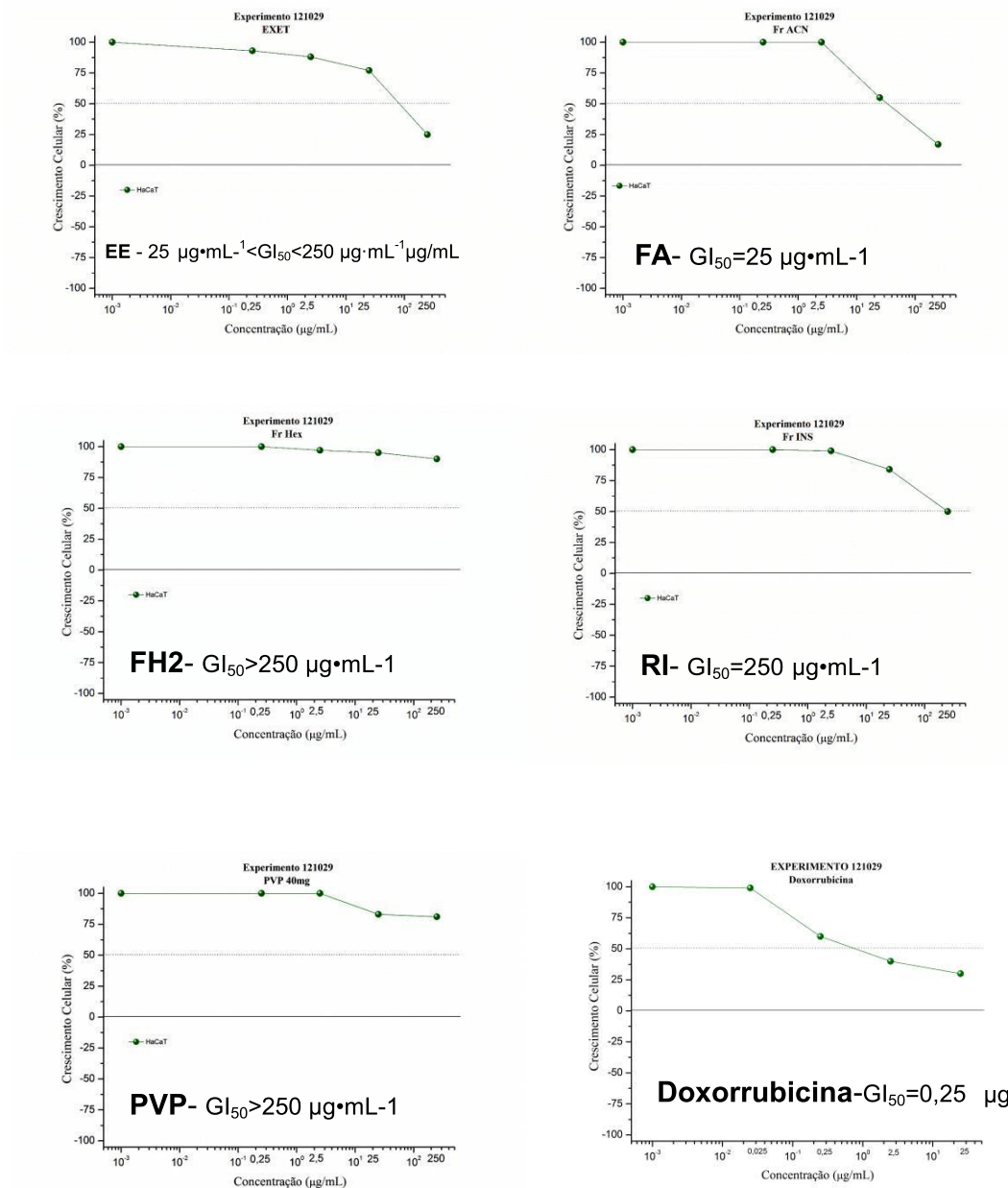
O gráfico **A** da Figura 29 mostra que a filantina não produz nenhum efeito letal sobre os vermes, enquanto que associada ao ácido linolênico elimina todos os vermes machos em 24 horas e todos os vermes fêmeas em 72 horas. Como o ácido linolênico na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (gráfico **D**) é letal para vermes machos e fêmeas em 24 horas, o resultado da associação com a filantina pode ser devido aos $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do ácido linolênico nesta associação. A 5-demetoxinirantina (gráfico **C**) não mata os vermes na dosagem de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mas apresenta boa atividade a partir de uma concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no período de 72 horas. Por conta disto, a associação da 5-demetoxinirantina com o ácido linolênico mostra melhor resultado que o da associação com a filantina, eliminando a totalidade dos vermes em 24 horas. Já a nirantina (gráfico **B**) na dosagem de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mostra atividade moderada (40% de mortalidade) no período testado e quando associada ao ácido linolênico elimina todos os vermes em 24 horas. Chowdhury et al (2012) reportam que a nirantina possui atividade contra *Leishmania donovani* em concentração de $2,16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e sugere que o mecanismo de ação seja por inibição da topoisomerase I, enzima determinante na duplicação do DNA. O resultado do praziquantel (gráfico **D**) na dosagem de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ é o mesmo do ácido linolênico, com 100% de letalidade para os vermes machos e fêmeas em 24 horas.

Esta atividade marcante do ácido linolênico confirma as observações de El Ridi *et al* (2010) e Tallima *et al* (2005) sobre a ação dos ácidos poli-insaturados sobre o *S. mansoni*, mas quando se compara a concentração utilizada por Tallima em seus experimentos *in vitro* ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido araquidônico), fica claro que o ácido linolênico ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) é muito mais ativo nas condições usadas neste trabalho. Para a oviposição o controle foi total em todos os testes com as substâncias puras ou mistura binária e em todas as concentrações.

4.5. Atividade citotóxica

Para avaliação da toxicidade das amostras EE, FA, FH e RI foram realizados testes *in vitro* da atividade antiproliferativa citotóxica frente a linhagem HaCaT de queratinócitos cujos gráficos são mostrados na Figura 30.

Figura 30 – Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico e frações da partição líquido - líquido em acetonitrila:hexano contra a linhagem de queratinócito humano HaCaT.



Estes gráficos relacionam à porcentagem de crescimento e a concentração das amostras testadas, evidenciando a ação das amostras EE, FA, FH2, RI e PVP contra a cultura de células, tendo a Doxorubicina como controle positivo.

Os valores entre 100% e 0% representam inibição de crescimento enquanto os valores negativos representam morte celular, pois a quantidade de células nesse caso é menor do que aquela no início do experimento.

A fração FA apresenta valor de GI_{50} de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o que indica a possibilidade de efeito inibidor do crescimento de células saudáveis *in vivo*, com potencial toxicidade. O extrato EE apresenta GI_{50} entre $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ indicando, como a fração FA, um potencial de toxicidade *in vivo* para concentrações teciduais mais elevadas. A fração RI apresenta alguma ação inibitória em concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O PVP e a fração FH2 mostram-se inativos.

5. Conclusões

- O extrato EE apresentou atividade esquistossomicida na menor concentração testada ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) matando 80% dos vermes machos e fêmeas em 72 horas.
- A fração FA eliminou 80% dos vermes machos e fêmeas em 24 horas e 100% em 48 horas na menor concentração testada ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- A dispersão do extrato etanólico – EE, frações e substâncias isoladas em PVP possibilitou a solubilização das amostras no meio utilizado nos ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro* e potencializou a atividade tanto na mortalidade de vermes machos e fêmeas quanto no controle da oviposição.
- A partição líquido-líquido do EE em acetonitrila e hexano permitiu a separação das lignanas para a fase de acetonitrila (FA) e a maior parte das substâncias graxas para a fase hexânica (FH).
- O Florisil® apresentou melhor resultado que a sílica-gel para fracionamento das lignanas possibilitando a remoção de substâncias coloridas e isolamento das lignanas e dos ácidos carboxílicos
- As frações obtidas por cromatografia em Florisil® enriquecida nas lignanas nirantina e 5-demetoxinirantina e nirantina apresentaram um resultado

modesto quanto à mortalidade do *S. mansoni*, pois em média eliminaram 100% dos vermes na maior concentração testada ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 72 horas.

- A fração VI, obtida por cromatografia em Florisil® e contendo a mistura de ácidos carboxílicos (palmítico, linolênico e linoleico), apresentou bom resultado para a mortalidade dos vermes, eliminando 80% dos machos na menor concentração ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 72 horas e 100% de machos e fêmeas na dosagem de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 24 horas.
- As lignanas filantina e 5-demetoxinirantina não mostraram atividade para mortalidade dos vermes na dosagem de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- O ácido linolênico eliminou 100% dos vermes machos e fêmeas na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 24 horas.
- Todos os extratos e frações contendo lignanas e/ou ácido linolênico suprimiram a oviposição em 100% em todas as concentrações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adjene, J. O. 2010. "Histological Effects of Chronic Administration of *Phyllanthus amarus* on the Superior Colliculus of Adult Wistar Rats". African Journal of Biotechnology 9 (25): 3919-3922.

Akinjogunla, O. J., N. O. Eghafona, I. O. Enabulele, C. I. Mbotto, and F. O. Ogbemudia. 2010. "Antibacterial Activity of Ethanolic Extracts of *Phyllanthus amarus* against extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Stool samples of HIV soro-positive patients with or without diarrhoea". African Journal of Pharmacy and Pharmacology 4 (6): 402-407.

Alisson ACM, Andrade Z, Brunner KT, Butterworth AE, Capron A, Cohen S, Colley DG, Coombs RRA, David JR, Davis A, Hoffman DB, Hopewood BCC, Hoube U, Jordan P, Lambert PH, Mahmoud AAF, Sher A, Smithers SR, Sturrock RF, Torrigian G, Warren KS, Webbe G, Weigle W. 1974. "Immunology of Schistosomiasis". WHO press 1974; 51: 553-95

Almeida, L. M. S., P. G. S. Farani, L. A. Tosta, M. S. Silvério, O. V. Sousa, A. C. A. Mattos, P. M. Z. Coelho, E. G. Vasconcelos, and P. Faria-Pinto. 2012. "In vitro evaluation of the Schistosomicidal Potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) Extracts". Natural Product Research 26 (22): 2137-2143.

Appiah-Opong, R., A. K. Nyarko, D. Dodoo, F. N. Gyang, K. A. Koram, and N. K. Ayisi. 2011. "Antiplasmodial Activity of Extracts of *Tridax procumbens* and *Phyllanthus amarus* in nitro *Plasmodium falciparum* culture systems". Ghana Medical Journal 45 (4): 143-150.

Aragon, A. D., Imani, R. A., Blackburn, V. R., Cupit, P. M., Melman, S., Goronga, D. T., Webb, T., Loker, E. S. and Cunningham, C.. 2009. "Towards an understanding of

the mechanism of action of praziquantel". *Molecular and Biochemical Parasitology* 164 (1): 57-65.

Ayres, D.C. and Loike, J.D. 1990. *Lignans: Chemical, biological, and clinical properties*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-11; 85-112.

Barakat, R. M. R. 2012. "Epidemiology of Schistosomiasis in Egypt: Travel through Time". *Am J Trop Med Hyg* February 2000 vol. 62 no. 2 suppl 21-27.

Barbosa, C. S., Araújo, K. C., Sevilla, M. A. A. Melo, F., Gomes, E. C. S. and Souza-Santos, R. 2010. "Current epidemiological status of Schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105 (4): 549-554.

Barros M.E. Schor N., Boim M.A. 2003. "Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*". *Urology Research* 30: 374.

Bastos, J.K.; Albuquerque, S.; Silva, M.L.A. 1999. "Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Planta Med.*, v.65, p.541-544.

Brasil, 2010, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Guia de vigilância epidemiológica*. 7a Ed. Cd 10 p.24, Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Brindley, P. J. and A. Sher. 1987. "The chemotherapeutic effect of Praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response". *Journal of Immunology* 139 (1): 215-220.

Brunet, L. R. D. W. Dunne, and E. J. Pearce, 1998 "Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* Infection," *Parasitology Today*, vol. 14, no. 10, pp. 422-427,.

Caffrey, C. R. 2007. "Chemotherapy of Schistosomiasis: Present and Future". *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (4): 433-439.

Calixto, J. B., A. R. S. Santos, V. Cechinel Filho, and R. A. Yunes. 1998. "A Review of the Plants of the Genus *Phyllanthus*: Their Chemistry, Pharmacology, and Therapeutic Potential". *Medicinal Research Reviews* 18 (4): 225-258.

Chowdhury, S., T. Mukherjee, R. Mukhopadhyay, B. Mukherjee, S. Sengupta, S. Chattopadhyay, P. Jaisankar, S. Roy, and H. K. Majumder. 2012. "The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice". *EMBO Molecular Medicine* 4 (10): 1126-1143.

de Oliveira, R. N., V. L. G. Rehder, A. S. Santos Oliveira, Í. M. Júnior, J. E. de Carvalho, A. L. T. G. de Ruiz, V. de Lourdes Sierpe Jeraldo, A. X. Linhares, and S. M. Allegretti. 2012. "*Schistosoma mansoni*: *In vitro* Schistosomicidal Activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less) DC". *Experimental Parasitology* 132 (2): 135-143.

Denny C, Zacharias ME, Kohn LK, Foglio MA, Carvalho JE 2007. "Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae)". *Rev Bras Farmacogn* 17: 598-603.

Dhooghe, L., H. Meert, R. K. Cimanga, A. J. Vlietinck, L. Pieters, and S. Apers. 2011. "The Quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae)". *Phytochemical Analysis* 22 (4): 361-366.

Doenhoff, M. J., D. Cioli, and J. Utzinger. 2008. "Praziquantel: Mechanisms of Action, Resistance and New Derivatives for Schistosomiasis". *Current Opinion in Infectious Diseases* 21 (6): 659-667.

Doenhoff, M. J., J. Modha, and J. R. Lambertucci. 1988. "Anti-Schistosome Chemotherapy Enhanced by Antibodies Specific for a Parasite Esterase". *Immunology* 65 (4): 507-510.

dos Santos, F. L. A., Lyra, M. A. M., Alves, L. D. S., da Silva, K. E. R. Rolim, L. A. T. C., Gomes, B. L., Ferraz, L. R. M., de Lima, A. A. N., Soares-Sobrinho, J. L. and Rolim-Neto, P. J.. 2012. "Research, Development and Innovation for the Control of Neglected Diseases". *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 33 (1): 37-47.

El Ridi, R. A. F. and H. A. -M Tallima. 2012. "Novel Therapeutic and Prevention Approaches for Schistosomiasis". *Journal of Advanced Research* (article in press; available online 23 June 2012)

El Ridi, R., M. Aboueldahab, H. Tallima, M. Salah, N. Mahana, S. Fawzi, S. H. Mohamed, and O. M. Fahmy. 2010. "*In vitro* and *in vivo* activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (8): 3383-3389.

El Ridi, R., S. H. Mohamed, and H. Tallima. 2003. "Incubation of *Schistosoma mansoni* lung-stage Schistosomula in corn oil exposes their surface membrane antigenic specificities". *Journal of Parasitology* 89 (5): 1064-1067.

Eldeen, I. M. S., E. -M Seow, R. Abdullah, and S. F. Sulaiman. 2011. "*In vitro* antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthus sp*". *South African Journal of Botany* 77 (1): 75-79.

Elfahmi, S. Batterman, A. Koulman, T. Hackl, R. Bos, O. Kayser, H. J. Woerdenbag, and W. J. Quax. 2006. "Lignans from Cell Suspension Cultures of *Phyllanthus Niruri*, an Indonesian Medicinal Plant". *Journal of Natural Products* 69 (1): 55-58.

Enders, D., G. Del Signore, and O. M. Berner. 2003. "First Asymmetric Synthesis of (-)-Lintetralin via Intramolecular Friedel-Crafts-Type Cyclization". *Chirality* 15 (6): 510-513.

Eweka, A. O. and A. Enogieru. 2011. "Effects of oral administration of *Phyllanthus amarus* leaf extract on the kidneys of adult wistar rats - a histological study". African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 8 (3): 307-311.

Fenwick, A., L. Savioli, D. Engels, N. R. Bergquist, and M. H. Todd. 2003. "Drugs for the Control of Parasitic Diseases: Current Status and Development in Schistosomiasis". Trends in Parasitology 19 (11): 509-515.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. 2007. "Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários". Química Nova 30 (2): 347-381

Gordaliza, M., Garcia, P.A., Miguel del Corral, J.M., Castro, M.A., Gómez-Zurita, M.A. 2004. "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives". Toxicon 44 (4): 441-459.

Greenberg, R. M. 2005. "Ca²⁺ Signalling, Voltage-Gated Ca²⁺ Channels and Praziquantel in Flatworm Neuromusculature". Parasitology 131 (SUPPL. 1): S97-S108

Gryseels, B. 2012. "Schistosomiasis". Infectious Disease Clinics of North America 26 (2): 383-397.

Gunawardena, B., Teichgräber, V., Hessler, G. and Gulbins, E. 2004 "Ceramide in malignant tumors" Cancer Therapy Vol 2, 13-20,

Harrison, T "Schistomiasis other trematode infections," in Harrison's Principles of Internal Medicine, A. Adel and F. Mohamed, Eds., pp. 1266-1271, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 16th edition, 2005.

Huang, Y. L., C. C. Chen, and J. C. Ou. 1992. "Isolintetralin: a new lignan from *Phyllanthus niruri*". Planta Medica 58 (5): 473-474.

Inbaneson, S. J., S. Ravikumar, and P. Suganthi. 2012. "In vitro Antiplasmodial effect of ethanolic extracts of coastal medicinal plants along palk strait against *Plasmodium falciparum*". Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2 (5): 364-367.

Joseph, B. and S.J. Raj,, 2011. "An overview: Pharmacognostic properties of *Phyllanthus amarus* Linn".. International. Journal of Pharmacology, 7: 40-45.

Kamaraj, C., N. K. Kaushik, A. A. Rahuman, D. Mohanakrishnan, A. Bagavan, G. Elango, A. A. Zahir, et al. 2012. "Antimalarial activities of medicinal plants traditionally used in the villages of Dharmapuri Regions of South India". Journal of Ethnopharmacology 141 (3): 796-802.

Kamel, E. G., M. A. El-Emam, S. S. M. Mahmoud, F. M. Fouda, and F. E. Bayaomy. 2011. "Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza Dioscorides* and *Sesbania sesban*". Parasitology International 60 (4): 388-392.

Kassuya, C. A. L., A. A. Silvestre, V. L. G. Rehder, and J. B. Calixto. 2003. "Anti-allodynic and anti-oedematogenic 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. L., A. Silvestre, O. Menezes-de-Lima Jr., D. M. Marotta, V. L. G. Rehder, and J. B. Calixto. 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 (1-3): 182-188.

Kassuya, C. A. L., D. F. P. Leite, L. V. De Melo, V. L. C. Rehder, and J. B. Calixto. 2005. "Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*". Planta Medica 71 (8): 721-726.

Kaur, J., G. Aggarwal, G. Singh, and A. C. Rana. 2012. "Improvement of drug solubility using solid dispersion". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4 (2): 47-53.

Kayser, O., A. F. Kiderlen, and S. L. Croft. 2003. "Natural products as antiparasitic drugs". *Parasitology Research* 90 (SUPPL. 2): S55-S62.

Krithika, R., R. J. Verma, P. S. Shrivastav, and L. Suguna. 2011. "phyllanthin of standardized *Phyllanthus amarus* extract attenuates liver oxidative stress in mice and exerts cytoprotective activity on human hepatoma cell line". *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 1 (2): 57-67.

Kusel, J. R., F. A. Oliveira, M. Todd, F. Ronketti, S. F. Lima, A. C. A. Mattos, K. T. Reis, P. M. Z. Coelho, J. A. Thornhill, and F. Ribeiro. 2006. "The effects of drugs, ions, and poly-l-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 (SUPPL. 1): 293-298.

Lawson-Evi, P., K. Eklu-Gadegbeku, A. Agbonon, K. Aklikokou, S. Moukha, E. E. Creppy, and M. Gbéassor. 2008. "Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn". *Scientific Research and Essays* 3 (9): 410-415.

Liu, J., H. Lin, and H. McIntosh. 2001. "Genus *Phyllanthus* for chronic hepatitis b virus infection: A systematic review". *Journal of Viral Hepatitis* 8 (5): 358-366.

Lopes, N. P., P. Chicaro, M. J. Kato, S. Albuquerque, and M. Yoshida. 1998. "Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs and their in Vitro Activity against *Trypanosoma cruzi*". *Planta Medica* 64 (7): 667-669.

Magalhães, L. G., C. B. Machado, E. R. Morais, É. Bueno De Carvalho Moreira, C. S. Soares, S. H. Da Silva, A. A. Da Silva Filho, and V. Rodrigues. 2009. "*In Vitro*

Schistosomicidal Activity of Curcumin Against *Schistosoma mansoni* Adult Worms". Parasitology Research 104 (5): 1197-1201.

Monks A, Scudeiro 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". J Natl Cancer I 83: 757-766.

Moraes, J. D., C. Nascimento, P. O. M. V. Lopes, E. Nakano, L. F. Yamaguchi, M. J. Kato, and T. Kawano. 2011. "*Schistosoma mansoni*: In Vitro Schistosomicidal Activity of Piplartine". Experimental Parasitology 127 (2): 357-364.

Mostafa, O. M. S., R. A. Eid, and M. A. Adly. 2011. "Antischistosomal activity of Ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* Harbored in C57 Mice". Parasitology Research 109 (2): 395-403.

Nahar, L., Satyajit, D., Sarker, S.D., Delazar A., 2011. "Phytochemistry of the Genus *Phyllanthus*" in *Phyllanthus* species scientific evaluation and medicinal Applications Edited by K. B. Harikumar CRC Press 2011 Pages 119-138.

Nishiura, J. L., A. H. Campos, M. A. Boim, I. P. Heilberg, and N. Schor. 2004. "*Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients". Urological Research 32 (5): 362-366.

Notka, F., G. Meier, and R. Wagner. 2004. "Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV Replication *in vitro* and *ex vivo*". Antiviral Research 64 (2): 93-102.

Oliveira, C.N.F. Estudo da atividade de *Phyllanthus amarus* L. contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH. 2008. 74 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

Oliveira, C.N.F. Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade das frações e compostos isolados do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH. 2012. 161 f. Tese (doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.

Oliveira, F. A., J. R. Kusel, F. Ribeiro, and P. M. Z. Coelho. 2006. "Responses of the Surface Membrane and Excretory System of *Schistosoma mansoni* to Damage and to Treatment with Praziquantel and Other Biomolecules". *Parasitology* 132 (3): 321-330.

Patel, J. R., P. Tripathi, V. Sharma, N. S. Chauhan, and V. K. Dixit. 2011. "*Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology: A Review". *Journal of Ethnopharmacology* 138 (2): 286-313.

Pica-Mattoccia, L., C. Valle, A. Basso, A. R. Troiani, F. Vigorosi, P. Liberti, A. Festucci, and D. Cioli. 2007. "Cytochalasin D abolishes the Schistosomicidal activity of Praziquantel". *Experimental Parasitology* 115 (4): 344-351.

Pingale, S. S. and S. S. Shewale. 2011. "Acute Toxicity Study of *Phyllanthus amarus*". *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 9 (1): 81-84.

PVRI, 2012 -http://pvri.info/sites/default/files//styles/uc_product_full/public/Educational/PVD_Atlas/2011/PVRIRReview_2011_3_1_12_85614_u1_0.preview-1.png?itok=8ea1Apud. Acessado em 21/05/2013.

Ribeiro, F., P. M. Z. Coelho, L. Q. Vieira, D. G. Watson, and J. R. Kusel. 1998. "The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*". *Parasitology* 116 (3): 229-236.

Satyanarayana, P. and S. Venkateswarlu. 1991. "Isolation, Structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus niruri*: Synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumour extractive". *Tetrahedron* 47 (42): 8931-8940.

Sen, A. and A. Batra. 2012. "Determination of antimicrobial potentialities of different solvent extracts of the medicinal plant: *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn". International Journal of Green Pharmacy 6 (1): 50-56.

Sen, R. and Chatterjee, M. 2011. "Plant Derived Therapeutics for the Treatment of Leishmaniasis". Phytomedicine 18 (12): 1056-1069.

Shoemaker, R.H. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nat Rev Cancer 6: 813-826

Shuhua, X., M. Tanner, E. K. N'Goran, J. Utzinger, J. Chollet, R. Bergquist, C. Minggang, and Z. Jiang. 2002. "Recent Investigations of artemether, a novel agent for the prevention of *Schistosomiasis japonica*, *mansoni* and *haematobia*". Acta Tropica 82 (2): 175-181.

Silva, M.J. & Sales, M.F. 2007. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco. Brasil. Acta Botanica Brasilica 21: 79-98.

Sirajudeen, K. N. S., S. A. Sulaiman, M. Madhavan, Z. Ismail, M. Swamy, Md L. Ismail, and M. Yaacob. 2006. "Safety evaluation of aqueous extract of leaves of a plant *Phyllanthus amarus*, in rat liver". African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 3 (4): 78-93.

Soliman, M. F. M. 2012. "Evaluation of avocado/soybean unsaponifiable alone or concurrently with praziquantel in murine Schistosomiasis". Acta Tropica 122 (3): 261-266.

Tallima, H., M. Salah, and R. El Ridi. 2005. "*In vitro* and *in vivo* effects of unsaturated fatty acids on *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* lung-stage larvae". Journal of Parasitology 91 (5): 1094-1102.

Ujwala, W., V. Singh, and M. Ali. 2012. "In-vitro antioxidant activity of isolated tannins of alcoholic and aqueous extracts of dried leaves of *Phyllanthus amarus*

Schonn and Thonn". International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 13 (2): 93-100.

Vasconcelos, T., B. Sarmiento, and P. Costa. 2007. "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs". Drug Discovery Today 12 (23-24): 1068-1075.

Wagner, H. and Bladt, S. 1996. In: "Plant drug analysis. A thin-layer chromatography atlas", Springer, Berlin p. 359

Wang, W., L. Wang, and Y. -S Liang. 2012. "Susceptibility or resistance of praziquantel in human Schistosomiasis: A Review". Parasitology Research 111 (5): 1871-1877.

Wang, X. -H, C. -Q Li, X. -B Guo, and L. -C Fu. 2001. "A comparative study of *Phyllanthus amarus* compound and interferon in the treatment of chronic viral hepatitis B". Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 32 (1): 140-142.

Wang, ZH, 2000. "Research progress of *Schistosomiasis japonica* chemotherapy". Hubei J Prev Med, 11:1-3.

Wannannond, P., J. Wattanathorn, S. Muchimapura, C. Thipkaew, W. Thukhummee, N. Leelayuwat, and B. Sripanidkulchai. 2012. "*Phyllanthus amarus* facilitates the recovery of peripheral nerve after injury". American Journal of Applied Sciences 9 (7): 1000-1007.

WHO, Weekly epidemiological record, 22 February 2013, vol. 88, 8 (pp. 81-88) <http://www.who.int/wer/2013/wer8808/en/index.html>

Wink, M. 2012. "Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites". *Molecules* 17 (11): 12771-12791.

WO/2007/009201 WIPO Patent Application Silva, M. L. A.; Silva, R. da; Rodrigues, V.; Pereira Junior, O. S.; Silva Filho, A. A.; Donate, P. M.; Albuquerque, S.; Bastos, J. K. 2007. "Process to obtain dibenzylbutyrolactonic lignans; process to obtain synthetic derivatives from lignanes bearing anti-chagas chemoprophylactic and therapeutical activities"

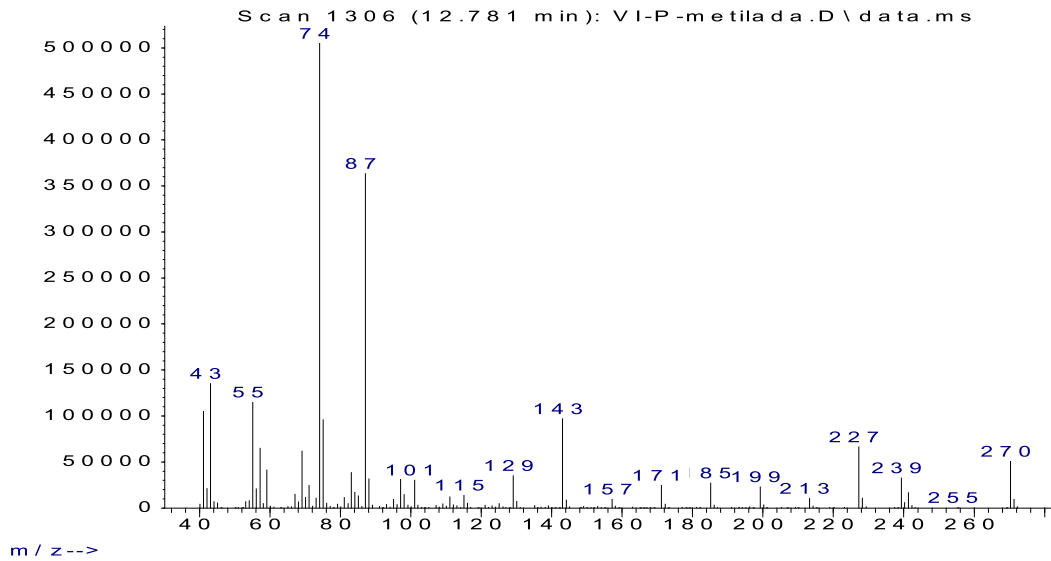
Xiao, S. H., J. Q. You, Y. Q. Yang, and C. Z. Wang. 1995. "Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether". *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 26 (2): 306-318.

Yousif, F., G. Wassel, L. Boulos, T. Labib, K. Mahmoud, S. El-Hallouty, S. El Bardicy, *et al.* 2012. "Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for Schistosomicidal activity". *Pharmaceutical Biology* 50 (6): 732-739.

7. ANEXOS

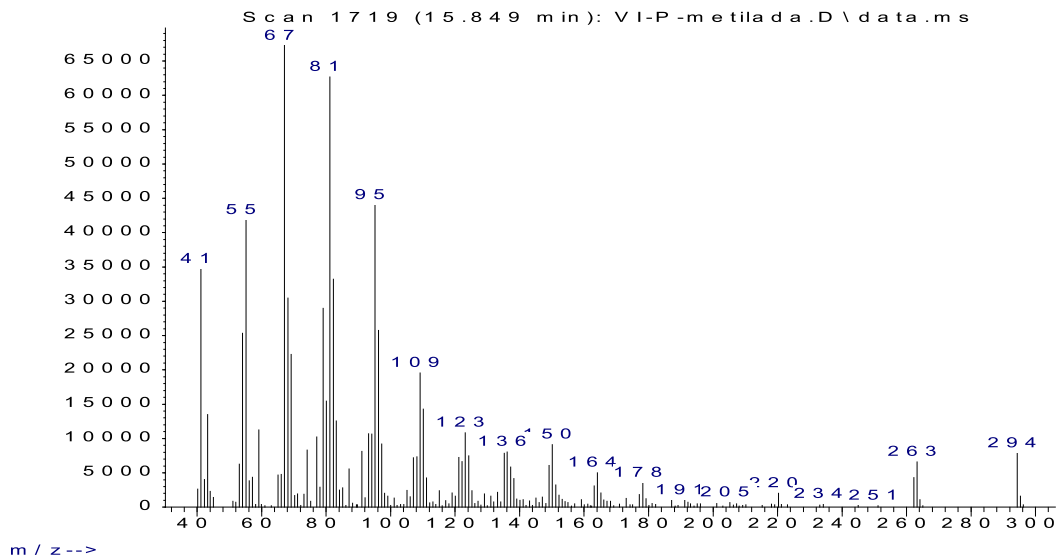
7.1. Anexo 1

Abundance



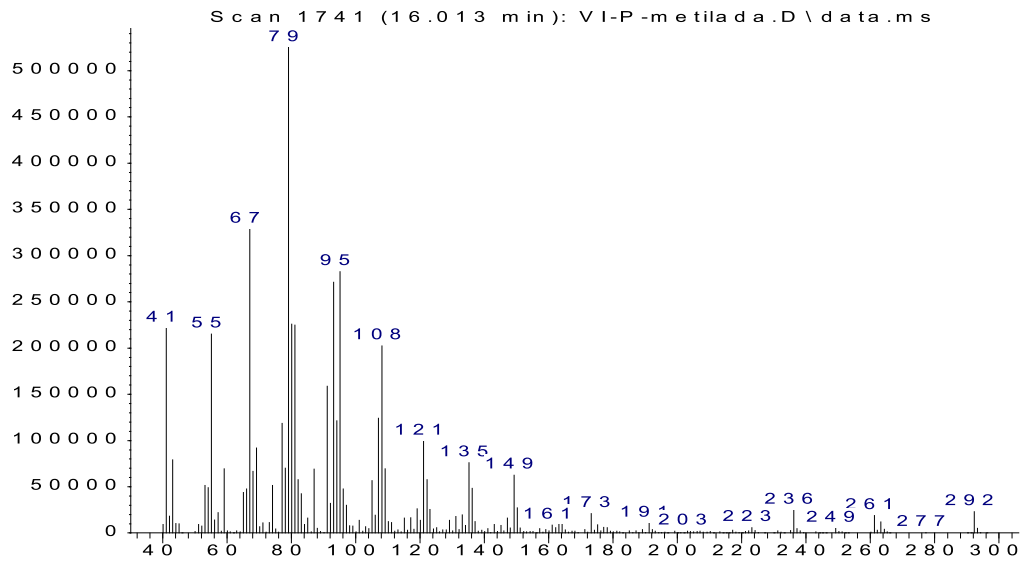
7.1.1. – Espectro de massas do Ácido palmítico (1).

Abundance



7.1.2. – Espectro de massas do Ácido linoleico (2).

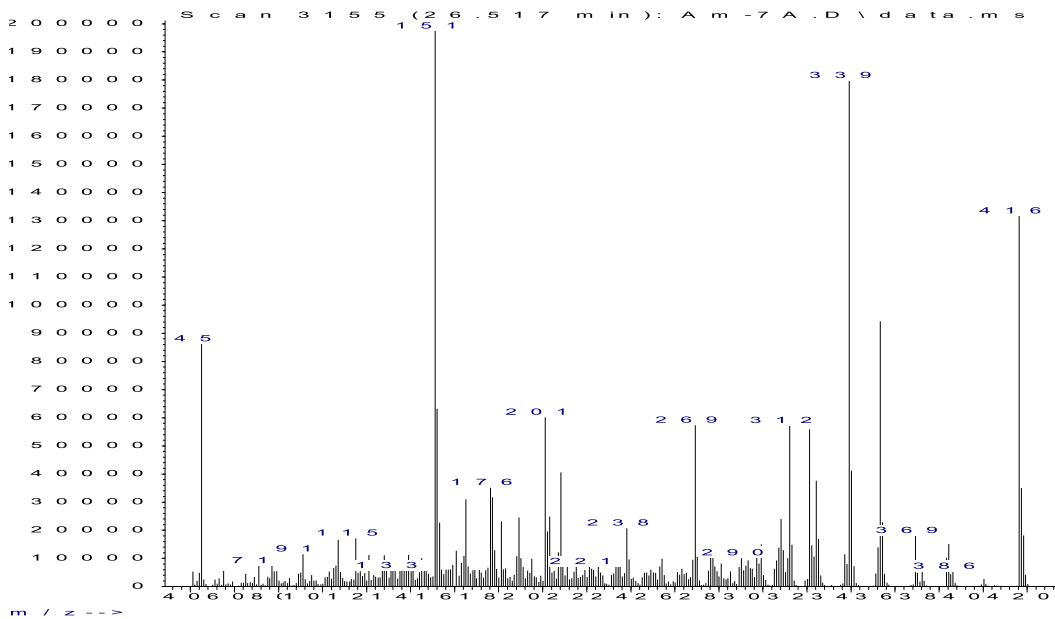
Abundance



m/z-->

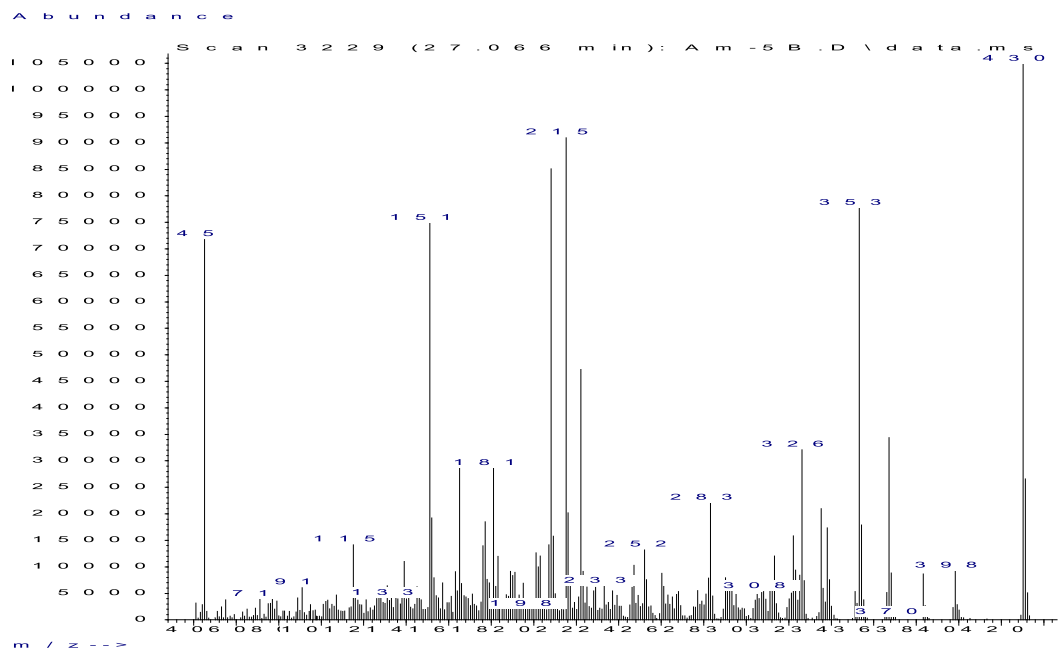
7.1.3. – Espectro de massas do Ácido linolênico (3).

Abundance

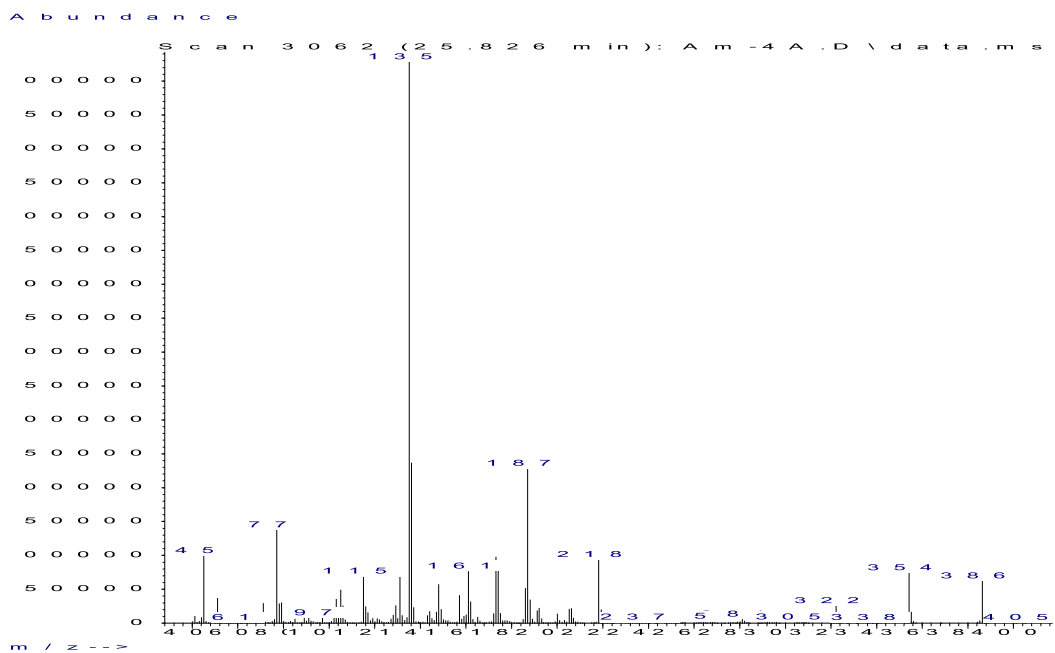


m/z-->

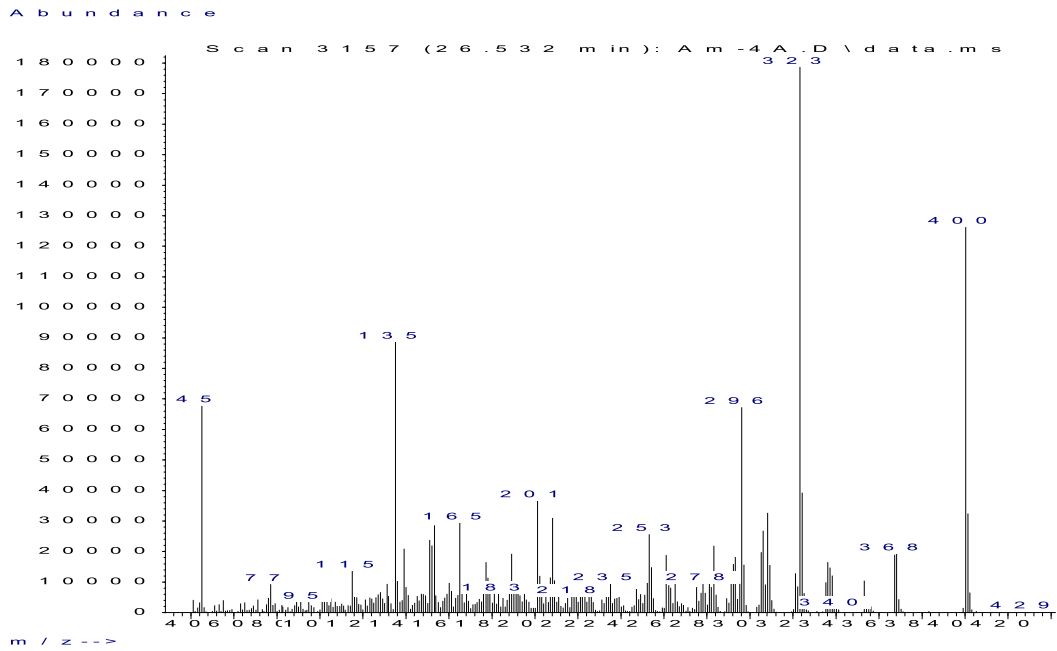
7.1.4. – Espectro de massas da Filteralina (6).



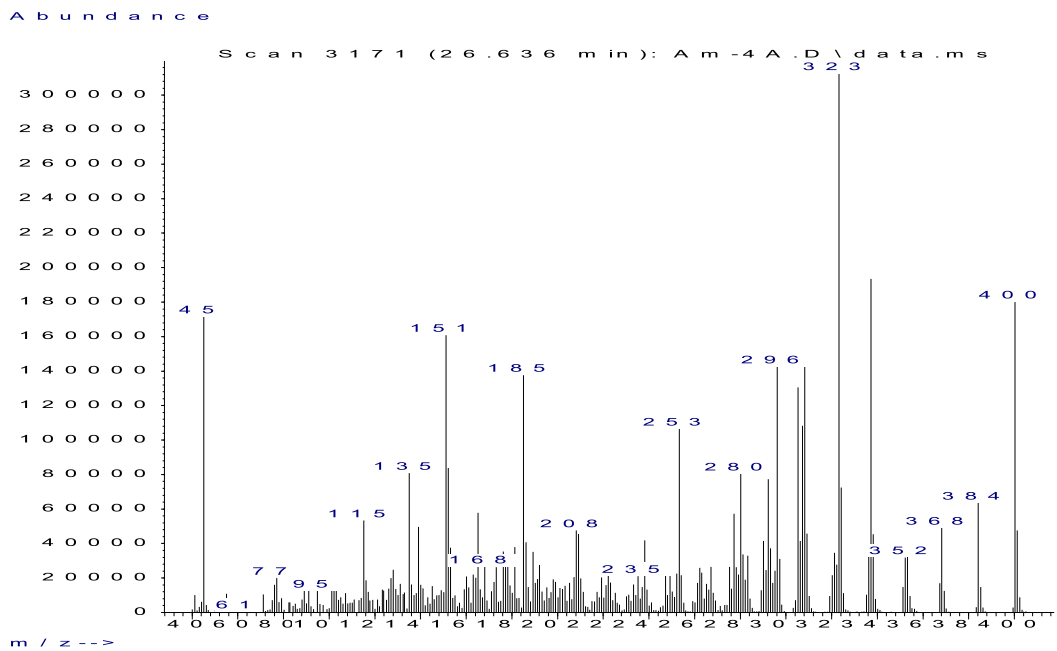
7.1.5. – Espectro de massas da Nirtetralina (7).



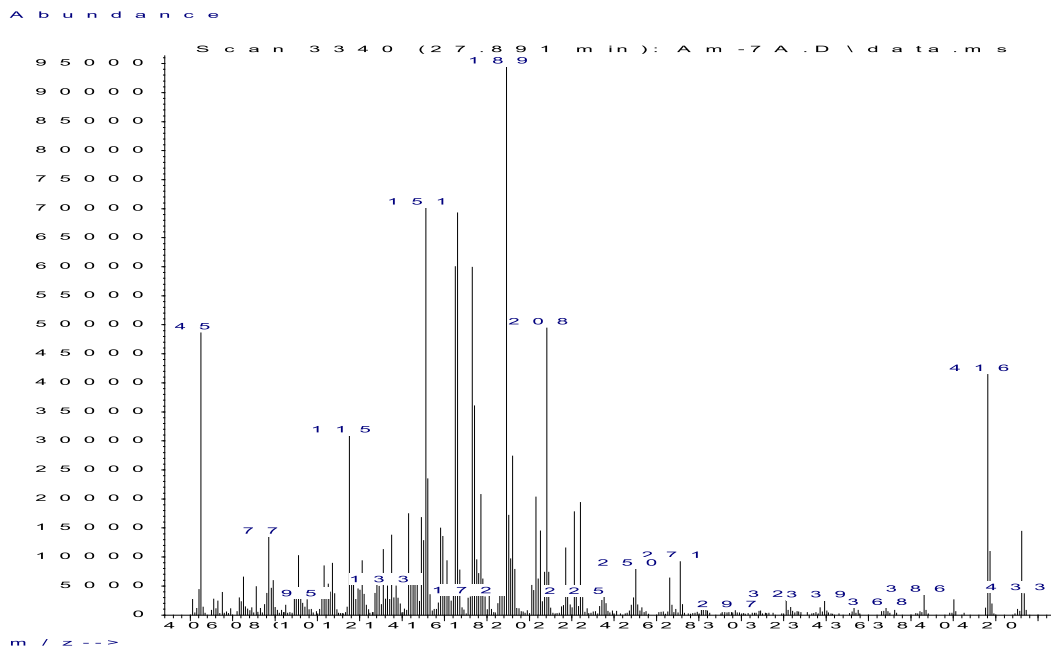
7.1.6. – Espectro de massas da Lignana 10.



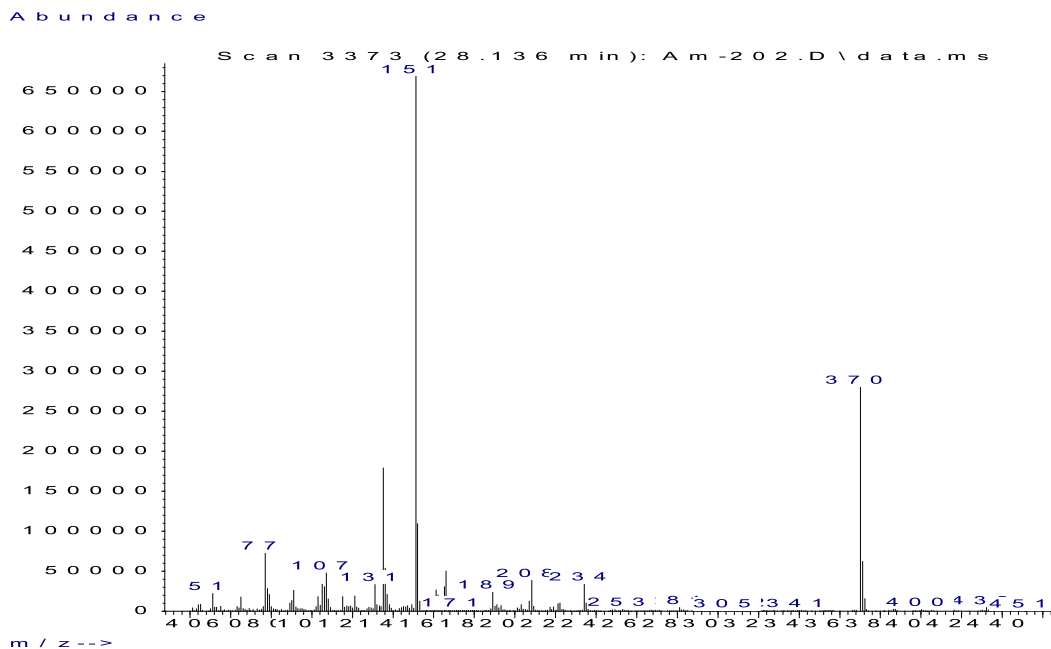
7.1.7. – Espectro de massas da Lignana 11.



7.1.8. – Espectro de massas da Lignana 12.



7.1.9. – Espectro de massas da Lignana 13.



7.1.10. Espectro de massas da Lignana 14.

7.2. Anexo 2



CEUA/Unicamp

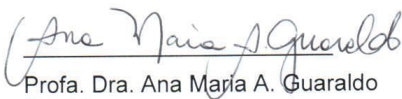
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Obtenção e formulação de compostos ativos isolados do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH" (protocolo nº 2984-1), sob a responsabilidade de Dra. Vera Lucia Garcia Rehder / Paulo Euzébio Rubbo dos Santos, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de fevereiro de 2013.

Campinas, 04 de fevereiro de 2013.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva