

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Luísa Maria Silveira de Almeida

Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* de
extratos, metabólito e óleo essencial de *Artemisia*
absinthium L. (Asteraceae)

Juiz de Fora
2015

Luísa Maria Silveira de Almeida

Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos, metabólito e óleo essencial de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ademair Alves da Silva Filho

Juiz de Fora
2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Luísa Maria Silveira de.

Avaliação da atividade esquistossomicida in vitro de extratos, metabólito e óleo essencial de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) / Luísa Maria Silveira de Almeida. -- 2015. 130 f. : il.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. Esquistossomose. 2. Produtos Naturais. 3. *Artemisia absinthium* L.. 4. Esquistossomicida. 5. Flavona. I. Silva Filho, Ademar Alves da, orient. II. Título.

Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos, metabólito e óleo de essencial de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae)

Luísa Maria Silveira de Almeida

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ___ / ___ / 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alzira Batista Cecílio

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

“No presente a mente, o corpo é diferente
E o passado é uma roupa que não nos serve mais”

Belchior

*Dedico este trabalho aos meus pais Rogério e Mércia,
aos meus irmãos Laura e Tomás e à minha avó
Carminha*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus amados pais Rogério e Mércia, e aos meus irmãos Laura e Tomás. É maravilhoso saber que posso contar com eles em todos os momentos e aspectos.

À minha saudosa e maravilhosa avó Carminha que tanto me incentivou a misturar os cremes e a fazer poções mágicas para as suas úlceras, o que acabou por conduzir a minha escolha profissional.

Aos meus tios: Danda e Beto; Adriana e Rosalvo pela ajuda, incentivos, incontáveis favores e carinho de sempre.

Ao Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho pela grande oportunidade de aprendizado que me foi disponibilizada e pela paciência.

Aos Profs. Drs. Paulo e Priscila pela confiança e incentivo que tanto me deram durante a graduação.

À Prof^a Dr^a Magda Narciso Leite e equipe pelos diversos empréstimos.

Ao Departamento de Química da UFJF pelo uso do aparelho de RMN.

Ao Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti pela realização das análises em CG-EM.

Ao Prof. Dr. Josué de Moraes pela realização dos ensaios esquistossomicidas.

À CENTRALBIO pelas análises em CLAE.

À Carol da CENTRALBIO, pela disponibilidade, cuidado, atenção e ajuda intelectual que tanto me auxiliaram nas análises de CLAE.

Aos grandes amigos feitos, Clarissa, PH, Poli e Jordana nem tem como agradecer, me ajudaram muito nessa etapa.

Às antigas amigas Jordana e Renatinha agradeço muito o auxílio.

Aos colegas do NIPPAN Marcela, Vinícius, Lara, Reinaldo, Débora, Fernanda, Matheus, Monique, Antonielle, Ismael, Ohana e Larinha, muito obrigada.

À CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta conquista.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu completasse essa etapa da minha vida.

E a Deus que com certeza foi o que me manteve com as condições mínimas de força para superar as dificuldades e não desistir.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo e mais de 600 milhões estão expostas ao risco de contraí-la, sendo que no Brasil, o Estado de Minas Gerais é um dos mais afetados com esta parasitose. Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento desta doença é o praziquantel (PZQ). No entanto, este medicamento já está no mercado há décadas e tem demonstrado relatos de ineficácia. Neste contexto, extratos e metabólitos secundários obtidos de espécie do gênero *Artemisia* (Asteraceae) têm demonstrado expressiva atividade esquistossomicida. Assim, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das folhas de *Artemisia absinthium* L. (AAF), bem como a avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos AAF e das raízes, do óleo essencial e do metabólito obtido. O estudo fitoquímico, do AAF, culminou no isolamento e identificação de dois metabólitos: uma flavona, artemetina e uma lactona sesquiterpênica, hidroxipelenolídeo. No estudo esquistossomicida *in vitro* foi utilizado vermes adultos de *S. mansoni* da linhagem BH e os parâmetros avaliados foram mortalidade, motilidade e alterações tegumentares. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato diclorometânico bruto (AAF), na concentração de 200 µg/mL, possui expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* ao ser capaz de causar a morte de 100% dos parasitos após 24 h de incubação. Em relação à atividade esquistossomicida do extrato bruto da raiz (200 µg/mL), este foi capaz de provocar a morte de todos os vermes após 48 h. O óleo essencial da *A. absinthium* L. (100 µg/mL) apresentou atividade esquistossomicida moderada sendo capaz de causar 60% de mortalidade nos parasitos após 48 h de incubação. Dentre as substâncias isoladas, a artemetina, foi submetida ao ensaio de atividade esquistossomicida e não foi ativa. Estudos adicionais de avaliação esquistossomicida devem ser realizados com o extrato bruto e metabólitos de *A. absinthium* L. com o intuito de se identificar as moléculas responsáveis pela atividade esquistossomicida *in vitro* observada pelo extrato AAF.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; *Artemisia absinthium* L.; esquistossomicida, flavona.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease that affects more than 200 million individuals in the world and 600 million people remain under risk of infection. In Brazil, the Minas Gerais state is one of the most affected by this disease. Nowadays, the only drug available for schistosomiasis treatment is praziquantel (PZQ). However, this drug is already on market for decades and has shown ineffectiveness. In this context, extract and secondary metabolites of the genus *Artemisia* (Asteraceae) have shown an expressive schistosomicidal activity. Thus, the present work describes the phytochemical study of the dichloromethane extract of *Artemisia absinthium* L. leaves (AAF), as well as *in vitro* schistosomicidal evaluation of AAF, crude roots extracts, essential oil and metabolite. The phytochemical study of AAF allowed the isolation and identification of two metabolites: one flavone, artemetin and one sesquiterpene lactone, hydroxypelenolide. In the *in vitro* schistosomicidal study, was used adult worms of the *S. mansoni* BH strain and the parameters evaluated were mortality, motility and alterations tegumental surface. The results showed that AAF, at 200 µg/mL, presents expressive schistosomicidal activity being able to cause 100% of death in parasites after 24 h of incubation. Regarding the schistosomicidal activity of the extract crude roots extract (200 µg/mL), was able to kill all the parasites after 48 h. The *A. absinthium* L. essential oil (100 mg / mL) showed moderate schistosomicidal activity being able to cause 60% mortality of parasites after 48 h of incubation. Among the isolated compounds, artemetin, was subjected to the schistosomicidal activity test and was inactive. Additional schistosomicidal assays should be carried out with *A. absinthium* L. crude extract and metabolites in order to identify the molecules responsible for schistosomicidal *in vitro* activity observed by AAF.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; *Artemisia absinthium* L.; schistosomicidal; flavone

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAF	- Extrato diclorometânico bruto das folhas de <i>A. absinthium</i> L.
AAR	- Extrato etanólico bruto das raízes de <i>A. absinthium</i> L.
AcOEt	- Acetato de etila
CCD	- Cromatografia em camada delgada comparativa
CH ₂ Cl ₂	- Diclorometano
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
CHCl ₃	- Clorofórmio
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
d	- Duplete
dd	- Duplo duplete
DTNs	- Doenças Tropicais Negligenciadas
ECA	- Enzima Conversora de Angiotensina
EtOH	- Etanol
H	- Hidrogênio
Hex	- Hexano
Hz	- Hertz
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
LST	- Lactona Sesquiterpênica
m	- Multiplete
Me ₂ CO	- Acetona
MeOH	- Metanol
nm	- Nanomêtro
OMS	- Organização Mundial de Saúde

ppm	- Parte por milhão
p/p	- Peso por peso
PDA	- Detector de Fotodiodo
PZQ	- Praziquantel
RMN de ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
s	- Simpleto
t	- Tripleto
td	- Tripleto de dupletos
Tr	- Tempo de Retenção
UI/mL	- Unidades Internacional por mililitro
UV	- Ultra Violeta
v/v	- Volume por volume
µg	- Micrograma
µg/mL	- Micrograma por mililitro
µM	- Micromolar
°C	- Graus Celcius
δ	- Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição global da esquistossomose no ano de 2012	2
Figura 2	- Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência por município	3
Figura 3	- Eletromicrografia de um casal de <i>Schistosoma mansoni</i> adulto	4
Figura 4	- Ciclo <i>S. mansoni</i> adaptado pela autora	6
Figura 5	- Estrutura química do Praziquantel	8
Figura 6	- Representação do efeito do PQZ sobre <i>S. japonicum</i>	9
Figura 7	- Artemisinina (A), Artemetér (B), Dihidroartemisina (C), Artemotil (D) e Artesunato (E)	12
Figura 8	- Distribuição global da espécie <i>A. absinthium</i> L.	18
Figura 9	- Partes aéreas <i>Artemisia absinthium</i> L.	19
Figura 10	- Tricomas glandulares <i>A. absinthium</i> L.	35
Figura 11	- Esquema para obtenção do AAF.....	36
Figura 12	- Obtenção OEAA	37
Figura 13	- Coluna Cromatográfica Líquida a Vácuo (VLC) do extrato AAF	39
Figura 14	- Coluna Cromatográfica Flash da fração AA6	40
Figura 15	- CCD da substância obtida da subfração AA6.12. Eluente: HCl ₃ :Me ₂ CO (9:1 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%	41
Figura 16	- Coluna Cromatográfica Clássica da fração AA6.40	42
Figura 17	- CCD da subfração AA6.40.36. A seta preta indica a substância majoritária. Eluente: CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (95:5 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%	43
Figura 18	- Coluna Cromatográfica Clássica da fração AA7	44
Figura 19	- CCD das frações AA7.28 a AA7.33 antes de serem agrupadas. Eluente: CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (8:2 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%	44
Figura 20	- Perfil cromatográfico da fração AA7.33 a 220 nm em CLAE-PDA, e os tempos de retenção dos picos majoritários	45

Figura 21	- Fluxograma demonstrando as etapas realizadas para o isolamento de substâncias (AAF) e as amostras encaminhadas para ensaio esquistosomicida	49
Figura 22a	- Perfil cromatográfico do AAF obtido a 254 nm em CLA-PDA, e os tempos de retenção dos picos majoritários	52
Figura 22b	- Espectro no UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção, 23,262; 26,813; 34,958 e 39,494 minutos	52
Figura 23a	- Perfil químico da substância isolada da subfração AA6 a 220nm	53
Figura 23b	- Perfil no UV do pico no tempo de retenção 26,845 minutos	54
Figura 24	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.12 ₍₁₋₁₂₎ (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=3,85-3,95$ ppm)	55
Figura 25	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.12 ₍₁₋₁₂₎ (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=6,48-6,97$ ppm)	55
Figura 26	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.12 ₍₁₋₁₂₎ (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais de hidrogênios ($\delta=6,66-7,70$ ppm)	56
Figura 27	- Estrutura Química da Artemetina.....	56
Figura 28	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.12 (CDCl_3 , 500MHz)	59
Figura 29	- Espectro de RMN de ^{13}C da AA6.12 (CDCl_3 , 125MHz)	60
Figura 30	- Comparativo entre perfil cromatográfico da artemetina (linha vermelha) e o extrato AAF (linha preta) a 220 nm	62
Figura 31a	- Perfil cromatográfico da substância majoritária da subfração AA6.40.36 a 210 nm.....	63
Figura 31b	- Perfil no UV do pico no tempo de retenção 19,941 minutos.....	63
Figura 32	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36 . Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=0,99-1,68$)	64
Figura 33	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36 . Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=1,86-2,07$)	65
Figura 34	- Estrutura química do Hidroxipelenolídeo	65
Figura 35	- Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36 (CDCl_3 , 500MHz)	68
Figura 36	- Espectro de RMN de ^{13}C da AA6.40.36 (CDCl_3 , 125MHz)	69

Figura 37	- Estrutura química do esqueleto de germacranolídeo	70
Figura 38	- A Estrutura de um grupo α -metileno- γ -lactona. B Estrutura de um grupo α - β insaturado	70
Figura 39	- Comparativo entre perfil cromatográfico do hidroxipelenolídeo (linha vermelha) e o extrato AAF (linha preta) a 210 nm	71
Figura 40a	- Cromatograma obtido em escala semipreparativa após estabelecidas as condições de carga, fluxo e fase móvel isocrática a 210 nm	73
Figura 40b	- Espectro no UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção, 3,936; 4,691; 7,141; 10,946 e 16,915 minutos	73
Figura 41a	- Perfil cromatográfico da substância presente no pico 1 a 210 nm	74
Figura 41b	- Espectro no UV da substância presente no pico 1	74
Figura 41c	- Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 1 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm	74
Figura 42a	- Perfil cromatográfico da substância presente no pico 3 a 210 nm	75
Figura 42b	- Espectro no UV da substância presente no pico 3	75
Figura 42c	- Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 3 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm	76
Figura 43a	- Perfil cromatográfico da substância presente no pico 5 a 210 nm	76
Figura 43b	- Espectro no UV da substância presente no pico 5	77
Figura 43c	- Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 5 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm	77
Figura 44	- Cromatograma do CG-EM do óleo essencial da <i>Artemisia absinthium</i> L.	78
Figura 45	- Estruturas químicas dos metabólitos secundários do óleo essencial da <i>Artemisia absinthium</i> L.	80
Figura 46	- A. Vernodalina; B. Eremantina; C. Ciclocostunolídeo; D. Costunolídeo; E. α -dihidrociclocostunolídeo e F. goyazenolídeo. Destaque para os grupos ligados ao carbono α	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Lista de plantas medicinais, produtos e substâncias ativas com conhecida atividade esquistossomicida.....	14
Tabela 2	- Compilado de trabalhos que demonstram atividade antiparasitária de diferentes espécies de <i>Artemisia sp</i>	17
Tabela 3	- Substâncias já isoladas das partes aéreas de <i>A. absinthium</i> L.	22
Tabela 4	- Frações obtidas da CLV do extrato AAF	39
Tabela 5	- Subfrações obtidas da Coluna Flash AA6	40
Tabela 6	- Subfrações obtidas da Coluna Clássica AA6.40	42
Tabela 7	- Subfrações obtidas da Coluna Clássica AA7	44
Tabela 8	- Dados de RMN de ¹ H da AA6.12 e dados da Artemetina descritos na literatura	57
Tabela 9	- Dados de RMN de ¹³ C da AA6.12 e dados da Artemetina descritos na literatura	58
Tabela 10	- Dados de RMN de ¹ H da substância AA6.40.36 e dados do Hidroxipelenolídeo descritos na literatura	66
Tabela 11	- Dados de RMN de ¹³ C da AA6.40.36 e dados do Hidroxipelenolídeo descritos na literatura	67
Tabela 12	- Composição química do óleo essencial de <i>Artemisia absinthium</i> L... ..	79
Tabela 13	- Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> dos extratos etanólico da raiz (AAR) e diclorometânico das folhas (AAF) de <i>A. absinthium</i> L., frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	82
Tabela 14	- Efeito do extrato AAF em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	83
Tabela 15	- Efeito do extrato AAR em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	84
Tabela 16	- Efeito da artemetina em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	87
Tabela 17	- Efeito do óleo OEAA em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ESQUISTOSSOMOSE	1
1.2	PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS	11
1.2.1	Família Asteraceae	15
1.2.2	Gênero <i>Artemisia</i>	16
1.2.3	A Espécie <i>Artemisia absinthium</i> L.	18
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	31
3.1.1	Materiais cromatográficos	31
3.1.2	Obtenção e Análise em Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) do Óleo Essencial de <i>A. absinthium</i> L. (OEAA)	32
3.1.3	Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
3.1.4	Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear.....	33
3.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	34
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS RAÍZES DE <i>A. absinthium</i> L.	34
3.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>A. absinthium</i> L. OBTIDO POR LAVAGEM FOLIAR	34
3.5	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>A. absinthium</i> L.	36
3.6	ANÁLISE EM CLAE DO EXTRATO, FRAÇÕES E METABÓLITOS DE <i>A. absinthium</i> L.	37
3.7	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DO OEAA	38
3.8	ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO AAF.....	39
3.8.1	Estudo da fração AA6	40

3.8.2	Estudo da fração AA6.12	41
3.8.3	Estudo da fração AA6.40	41
3.8.4	Estudo da fração AA6.40.36	43
3.8.5	Estudo da fração AA7	43
3.8.6	Estudo da fração AA7.3	45
3.9	AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA	46
3.9.1	Animais utilizadas e manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	46
3.9.2	Manutenção do ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	46
3.9.3	Preparo das amostras para o ensaio	47
3.9.4	Ensaio <i>in vitro</i>	47
3.9.5	Viabilidade de adultos de <i>Shistosoma mansoni</i> em presença dos extratos brutos, óleo essencial e substância isolada	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	ANÁLISE EM CLAE DO EXTRATO AAF	51
4.2	PERFIL EM CLAE, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMPARATIVO DOS PERFIS ANALÍTICOS COM O EXTRATO AAF	53
4.2.1	Substância AA6.12	53
4.2.2	Substância AA6.40.36	62
4.3	TRANSPOSIÇÃO DA ESCALA ANALÍTICA PARA A SEMIPREPARATIVA DA FRAÇÃO AA7.33 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS	72
4.4	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Artemisia absinthium</i> L.	78
4.5	ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS BRUTOS AAF E AAR, DO OEAA E ARTEMETINA FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i>	81
4.5.1	Atividade Esquistossomicida <i>in vitro</i> dos extratos brutos AAF E AAR	81
4.5.2	Atividade Esquistossomicida <i>in vitro</i> da Artemetina	87

4.5.3	Atividade Esquistossomicida <i>in vitro</i> do óleo essencial	89
5	CONCLUSÕES	93
6	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma designação coletiva para infecções crônicas causadas por vermes digenéticos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, os quais possuem como hospedeiros intermediários caramujos de água doce (NASCIMENTO *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Existem dois tipos principais da doença, a esquistossomose intestinal e a urogenital. Os principais agentes etiológicos da forma intestinal englobam o *Schistosoma mansoni* e o *Schistosoma japonicum* sendo as espécies menos comuns, o *Schistosoma mekongi*, o *Schistosoma guineensis* e o *Schistosoma intercalatum*. O *Schistosoma haematobium* é o único agente conhecido responsável por causar a esquistossomose urogenital (OMS, 2015; USEH, 2013).

A esquistossomose, também conhecida como bilharziose, é uma das mais proeminentes doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (GUGLIELMO *et al.*, 2014; MIDZI *et al.*, 2014; JENKINS-HOLICK & KAUL, 2013). As DTNs constituem um grupo de doenças crônicas causadoras de considerável morbidade e mortalidade endêmicas de populações mais pobres (NORMAN *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos apontam que a esquistossomose afeta a vida de mais de 200 milhões de pessoas e ameaça à saúde de mais de 600 milhões em todo o mundo, o que leva a um número maior que 200 mil mortes por ano (FONSECA *et al.*, 2014; GUGLIELMO *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015; OMS, 2015). A figura 1 mostra a distribuição global da esquistossomose no ano de 2012.

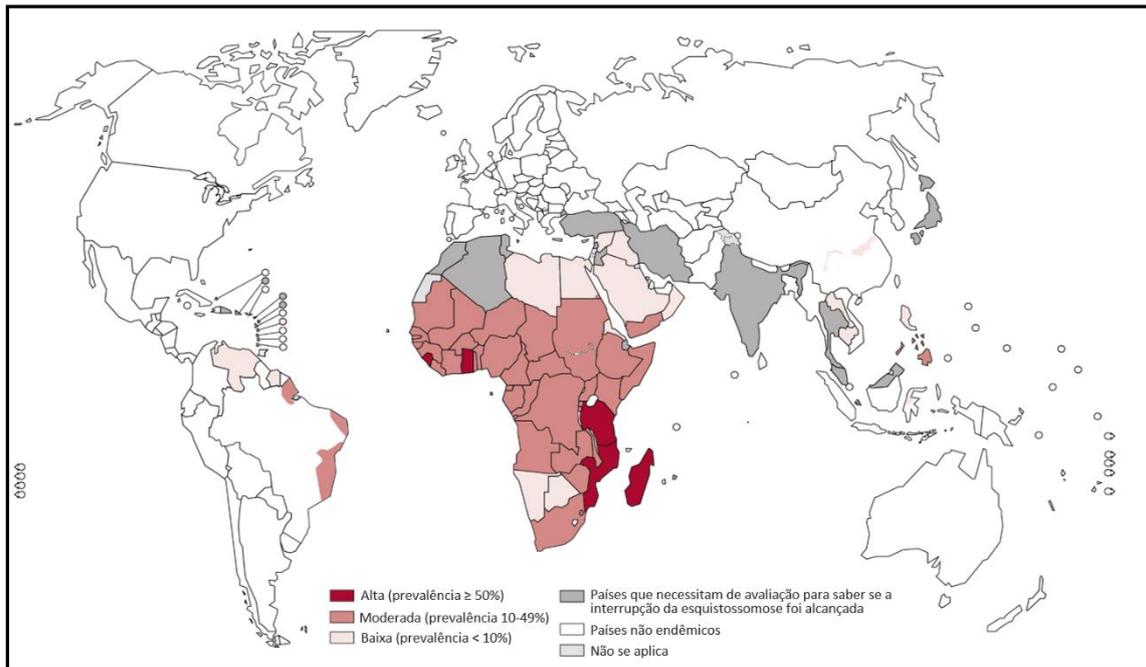


Figura 1: Distribuição global da esquistossomose no ano de 2012 – adaptado pela autora (OMS, 2013)

A ocorrência da esquistossomose, bem como a manutenção da endemidade nas áreas atingidas, está diretamente associada a condições socioeconômicas precárias. Ou seja, a esquistossomose acomete regiões onde a população carece de educação sanitária, o acesso à água potável e ao saneamento básico é restrito ou inexistente e os recursos para investimento em saúde pública são escassos (MIDZI *et al.*, 2014; UTZINGER *et al.*, 2011; NORMAN *et al.*, 2010).

Nesses países, além da alta taxa de mortalidade, a esquistossomose gera inúmeras outras comorbidades, entre elas: comprometimento do desenvolvimento cognitivo de jovens e crianças, impactando diretamente o desempenho escolar dos mesmos, baixo peso de recém-nascidos de mães infectadas e diminuição da produtividade de adultos em idade ativa o que contribui para a perpetuação da pobreza, entre outros (COUTO *et al.*, 2014; MIDZI *et al.*, 2014; USEH, 2013; OMS, 2010a).

De acordo com UTZINGER *et al.* (2011), há uma tendência de propagação da esquistossomose para áreas não endêmicas, em face da inadequada gestão dos recursos hídricos, uma situação que pode ser ainda mais agravada em função das mudanças climáticas.

O Brasil representa uma área endêmica de esquistossomose (figura 2), sendo a única espécie autóctone o *S. mansoni*, responsável então por causar a esquistossomose mansônica. Estima-se, que aproximadamente 6 milhões de brasileiros sejam infectados e que 25 milhões estejam sobre ameaça de contrair essa enfermidade (ESPIRITO-SANTO *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Atualmente, a doença é detectada em todas as regiões do país. Os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados sendo que a ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores. As áreas endêmicas e focais abrangem 19 estados; compreendendo Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

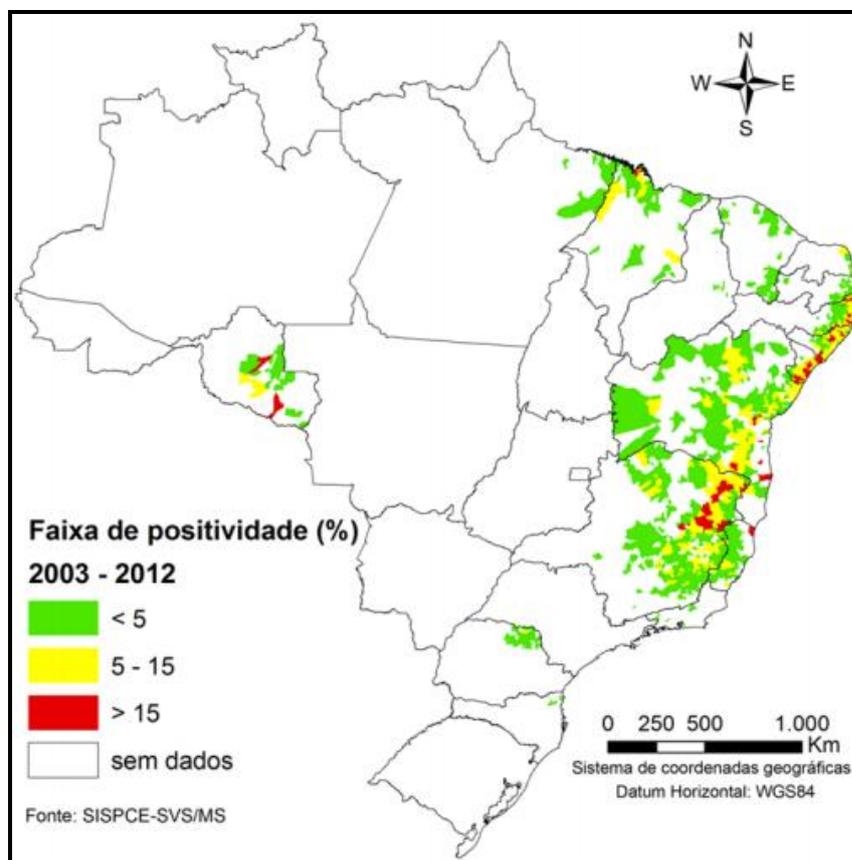


Figura 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência por município (ESPIRITO-SANTO, 2013)

O *S. mansoni* pertence ao filo *Platyhelminthes* e à classe *Trematodea*. Os vermes adultos vivem na corrente sanguínea do hospedeiro humano onde podem sobreviver por até 30 anos, com uma média de 3 a 5 anos. Esse fato representa uma conquista evolutiva notável que requer mecanismos intrínsecos de evasão por parte dos vermes em relação a imunidade inata e adquirida do hospedeiro (GRYSEELS, 2012).

O *S. mansoni* é dioico e apresenta acentuado dimorfismo sexual na fase adulta, sendo que a fêmea nesta fase está permanentemente abrigada dentro do corpo do macho. A fêmea mede cerca de 1,5 cm e apresenta o tegumento liso, já o macho mede cerca de 1 cm apresentando tegumento coberto por tubérculos e espinhas e um canal ginécóforo para abrigar a fêmea e fecundá-la. Os vermes apresentam ventosas, um sistema digestivo cego e órgão reprodutivos (GRYSEELS, 2012) (figura 3).



Figura 3: Eletromicrografia de um casal de *Schistosoma mansoni* adulto (MHN, 2013)

Eles se alimentam de células sanguíneas e globulinas, sendo que os restos da digestão são regurgitados na corrente sanguínea humana. O metabolismo anaeróbio é utilizado principalmente para os movimentos dos machos e para a produção de ovos nas fêmeas (GRYSEELS, 2012).

A transmissão da esquistossomose ocorre pelo contato do homem com águas onde existam moluscos infectados. O ciclo biológico do *S. mansoni* apresenta uma alternância de gerações entre o hospedeiro intermediário, moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria* spp., e os hospedeiros

definitivos, dentre eles, o homem (HUYSE *et al.*, 2013; MONE *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011; LAMBERTUCCI, 2010).

Em relação ao hospedeiro intermediário, no Brasil, 11 diferentes espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* já foram identificados: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea* são os hospedeiros naturais do *S. mansoni*; *B. peregrina*, *B. amazonica*, *B. cousini* são hospedeiros potenciais, uma vez que se infectam quando expostos experimentalmente ao parasito; e *B. schrammi*, *B. kuhniiana*, *B. intemedia*, *B. oligoza*, *B. occidentalis*, e *B. tenagophila guaibensis* os quais até o momento são considerados como não hospedeiros (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

O *B. glabrata* representa uma espécie de grande importância, devido à sua ampla distribuição geográfica, alto índice de infecção e eficiência na transmissão da esquistossomose. Altas concentrações dessa espécie de molusco, em conjunto com outros fatores de risco, favorecem a existência de elevadas taxas de prevalência da doença (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

O ciclo biológico do *S. mansoni* inicia-se quando as fezes de indivíduos contaminados, contendo ovos do parasito, entram em contato com a água doce. Os ovos, em contato com a água, eclodem, liberando miracídios, os quais penetram no hospedeiro intermediário, infectando-o (MONE *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011). Segundo BRUM *et al.* (2013) essa penetração é fortemente influenciada por temperaturas mais elevadas.

O miracídio sofre uma série de transformações estruturais e anatômicas dentro do hospedeiro intermediário e transforma-se em esporocisto. A partir dessa fase, o esporocisto passa pelas fases primária, secundária e terciária, as quais sofrem alterações morfofisiológicas até a eliminação do parasito na forma de cercária. Estima-se que o *Biomphalaria* elimina em média 4000 cercárias/dia (BRUM *et al.*, 2013).

O contato com águas contaminadas por cercárias é o fator predisponente para a infecção e facilita a penetração ativa da larva pela pele e mucosa humanas. Em geral, o período de incubação é de 2 a 6 semanas após a infecção, que corresponde à fase de penetração das cercarias e desenvolvimento dessas, no interior do hospedeiro definitivo onde se transformam em esquistossômulos, os quais migram para a circulação hepatoportal, e tornam-se vermes adultos machos e fêmeas. Após o

acasalamento, os pares de vermes adultos se movem contra a corrente sanguínea e ao atingirem os capilares das paredes intestinais depositam seus ovos, os quais são responsáveis pela lesão imunológica característica dessa patologia (CDC, 2012; BRUM *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2011). Um resumo do ciclo do *S. mansoni* e ilustrado na figura 4.

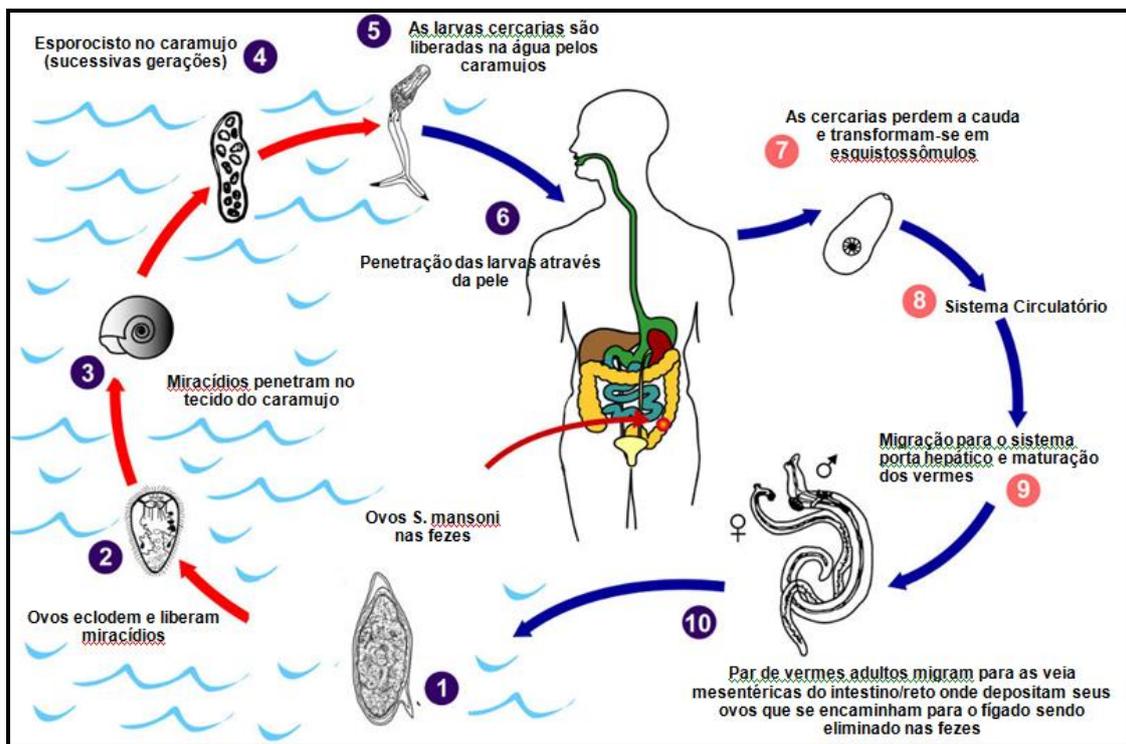


Figura 4: Ciclo *S. mansoni* - adaptado pela autora (CDC, 2012)

A evolução clínica da esquistossomose mansônica depende da resposta imunológica do hospedeiro à invasão, ao amadurecimento e à oviposição do helminto (BRUM *et al.*, 2013). Em relação ao quadro clínico, trata-se de uma doença inicialmente assintomática na maioria dos indivíduos infectados. Contudo, pode evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente ao óbito (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2014).

Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em fase aguda e crônica. Na fase aguda, os principais sinais e sintomas são decorrentes de uma reação de hipersensibilidade sistêmica desencadeada pela migração dos esquistossômulos e pelo depósito de ovos (LABERTUCCI *et al.*, 2013). Dentre eles estão dermatite (em função da penetração das cercárias), enterocolite, granulomas hepáticos, febre, sudorese, calafrios, diarreia com má absorção e

emagrecimento, hepatoesplenomegalia discreta e eosinofilia (BRUM *et al.*, 2013; LABERTUCCI *et al.*, 2013).

Na fase crônica o quadro clínico é variável e a doença pode evoluir para diversas formas clínicas. Uma das formas mais comuns ocorre quando os ovos ficam alojados no fígado e intestino causando fibrose e calcificação destes tecidos (granulomas). Os granulomas podem bloquear vasos sanguíneos desses órgãos, gerando uma hipertensão portal. Pode ainda haver acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (ascite) com o desenvolvimento de varizes esofágicas, as quais podem romper, desencadeando hemorragias importantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a).

Vale ressaltar que o parasito e/ou seus ovos podem alojar-se fora do sistema portal, desenvolvendo as formas ectópicas: neurológica, vasculopulmonar e renal da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a).

O controle da esquistossomose pode ser realizado por medidas isoladas e conjuntas, tais como combate ao hospedeiro intermediário (caramujo) utilizando agentes moluscicidas, melhoria do saneamento básico, educação sanitária das populações expostas, tratamento individual ou em massa nas áreas de alta prevalência, proteção individual contra a penetração das cercárias, entre outros (ECDC, 2014; ALLEGRETTI *et al.*, 2012).

Em relação ao tratamento medicamentoso, o Praziquantel (PZQ) (figura 5) é o fármaco de escolha sendo atualmente a única substância utilizada na rotina dos programas de controle e tratamento dessa doença. Esse fármaco é efetivo contra todas as principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem (WANG *et al.*, 2014; RETA & ERKO, 2013). O PZQ é um derivado pirazinoisoquinolínico, comercializado na forma de uma mistura racêmica, na qual somente um dos isômeros possui propriedade esquistossomicida, sendo que o outro contribui para parte dos efeitos adversos, e também pelo sabor desagradável do medicamento (CIOLI *et al.*, 2014; GUGLIELMO *et al.*, 2014; DISSOUS & GREVELDING, 2011).

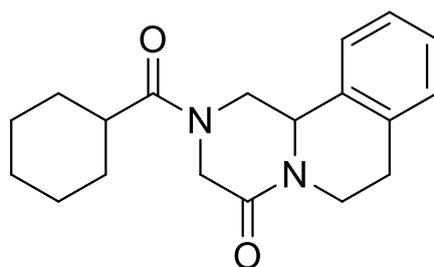


Figura 5. Estrutura química do Praziquantel

Mesmo sendo extensamente utilizado, o mecanismo de ação exato do PZQ continua incerto. No entanto, os primeiros efeitos exercidos pelo fármaco no *Schistosoma* são descritos e podem ser resumidos em três principais categorias: influxo de cálcio no parasito como um todo, contração muscular e modificações de superfície. Em síntese, esses três fenômenos podem ser reduzidos em um único segmento, em que o evento-chave é o influxo de cálcio, que por sua vez provoca alterações na contração muscular e no tegumento. Elementos de prova recolhidos nos últimos anos fornecem forte, mas não definitivo apoio a essa hipótese (CIOLI *et al.*, 2014). GUGLIELMO *et al.* (2014) acrescenta outros possíveis mecanismos como alteração da fluidez do tegumento do *Schistosoma* sp., redução na concentração de glutathione, ligação à actina seguida da destruição do tegumento e interferência com componentes do metabolismo aeróbico.

Embora a eficácia do PZQ seja elevada, as taxas de cura variam de 60 a 95% (MELMAN *et al.*, 2009). Este pode ser entendido como um bom resultado, entretanto alguns autores consideram que essa porcentagem de indivíduos curados seja superestimada, provavelmente em função da baixa sensibilidade dos métodos de diagnóstico (CIOLI *et al.*, 2014; DOENHOFF, 1998).

As potenciais explicações para a não obtenção de 100% de cura podem estar relacionadas com a dose, esta pode ser sub-curativa, ou com a presença de traços de resistência apresentado por algumas populações de vermes. O uso extensivo de PZQ por mais de 20 anos em algumas nações Africanas aumentou a preocupação em relação à seleção de parasitos resistentes ao PZQ. Experimentos laboratoriais, realizados com ratos, produziram cepas resistentes do *S. mansoni* em apenas 2 gerações de exposição repetida a

doses sub-letais do fármaco, demonstrando dessa maneira, que a resistência é mais do que uma hipotética possibilidade (MELMAN *et al.*, 2009).

Outro fato relevante em relação a eficácia do PZQ é que o *Schistosoma* sp. é suscetível a esse fármaco nos primeiros dias após a infecção, mas depois sua suscetibilidade diminui para um mínimo em torno de 28 dias, retomando novamente de forma gradual até um máximo após 6-7 semanas. Essas diferentes susceptibilidades podem ser verificadas no gráfico representado na figura 6. Logo, se o indivíduo faz uso da medicação enquanto abriga as formas imaturas do parasita (esquistossômulos) possivelmente não haverá a cura (CIOLI *et al.*, 2014). Fato esse leva a mais um fator limitante do PZQ o qual só é efetivo contra as formas adultas do parasito (FERREIRA *et al.*, 2015).

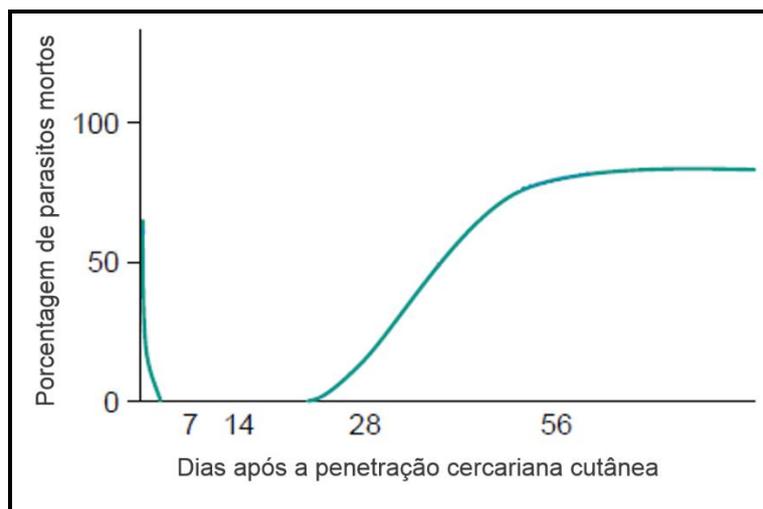


Figura 6: Representação do efeito do PZQ sobre *S. japonicum* – adaptado pela autora (Bergquist 2002)

A fim de se evitar o problema da baixa susceptibilidade dos estágios imaturos, foi proposto administrar uma segunda dose de PZQ duas semanas mais tarde, quando as formas imaturas já teriam amadurecido, um procedimento que, na verdade, resultou em maiores taxas de cura de acordo com CIOLI *et al.* (2014). Contudo, uma pesquisa realizada por GARBA *et al.* (2013), na Nigéria, procurou avaliar a segurança e a eficácia de duas doses espaçadas do PZQ, com o objetivo de se atingir as formas adultas do verme. O estudo foi realizado com 1558 crianças infectadas ou por *S. haematobium* ou *S. mansoni*, ou por ambos. Os resultados obtidos demonstraram que após a

administração da primeira dose de PQZ, 13,6% das crianças (119) apresentaram cólicas abdominais, 4,3% (38), apresentaram sonolência, 3,7% (32) dor de cabeça entre diversos outros sintomas. Em acréscimo aos efeitos adversos, foi observado em duas regiões diferentes desse país, após a segunda administração do medicamento, baixos níveis de cura e pouca redução do número de ovos excretados, quando a espécie era o *S. mansoni*.

Outros pesquisadores como ERKO *et al.* (2012) e ISMAIL *et al.* (1999) também encontraram reduzidas taxas de cura e pouca redução no número de ovos na Etiópia e Egito respectivamente. Esses resultados levam a um cenário novo, no qual a eficácia e a segurança do PZQ são questionadas. WANG *et al.* (2014) acrescenta que o PQZ apresenta baixa estabilidade metabólica, uma vez que seu tempo de meia-vida varia de 1 a 3h ($t_{1/2} = 1-3$ h), além do mesmo sofrer extensivo metabolismo de primeira passagem.

Assim, é motivo de grande preocupação a esquistossomose, segunda doença parasitária mais prevalente do mundo, ser dependente de um único fármaco. Em acréscimo, o PQZ não é eficaz contra as formas jovens do parasito bem como já existem evidências de baixas taxas de cura em áreas endêmicas e desenvolvimento de resistência em linhagens cultivadas em laboratório. Fatos esses, revelam a explícita e imperativa necessidade de busca por agentes terapêuticos mais efetivos e seguros, de forma a permitir a melhoria da qualidade de vida da população afetada pela esquistossomose (DOS SANTOS *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; RETA & ERKO, 2013; KONÉ *et al.*, 2012; DISSOUS & GREVELDING, 2011; BERGQUIST, 2002).

1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

NEWMAN & CRAGG (2012) defendem fortemente a expansão da exploração da natureza como fonte de novos agentes ativos que possam servir como um guia ou suporte para elaboração de medicamentos eficazes para uma grande variedade de doenças. De acordo com esses autores, de 1981 a 2010, 14 novos fármacos antiparasitários foram desenvolvidos, sendo que destes, somente 4 são de origem sintética; os demais, são derivados de produtos naturais.

Muitos extratos de plantas são utilizados na medicina popular como anti-helmínticos desde tempos remotos. Em função disso, diversas plantas se tornaram objeto de estudos químicos e biológicos, com o objetivo de se encontrar preparações com real atividade ou constituintes isolados a partir delas os quais podem conduzir a descoberta de novos fármacos antiparasitários (BARBOSA DE CASTRO *et al.*, 2013).

Contudo, substâncias isoladas fornecem maior possibilidade de caracterização de suas propriedades quando comparadas a extratos brutos ou às suas frações, e podem também servir como alicerce para a produção de análogos estruturais, os quais em muitos casos permitem a seleção de substâncias ainda mais promissoras (VUORELA *et al.*, 2004).

A exemplo do acima citado tem-se a artemisinina (figura 7), uma lactona sesquiterpênica utilizada no tratamento da malária. A artemisinina foi descoberta a partir de um estudo etnobotânico realizado na China, que ao pesquisar mais de 2 mil receitas populares chinesas utilizadas contra a malária, encontrou próspero resultado com o extrato da *Artemisia annua* (absinto doce). Fato esse que culminou posteriormente com o isolamento da artemisinina, a qual isoladamente se mostra muito mais ativa que seu extrato bruto, além de ter sido o ponto de partida para o desenvolvimento de outras substâncias bastante promissoras (LAHLOU 2013; MILLER & SU, 2011).

A artemisinina se tornou a base para o desenvolvimento de outras substâncias semi-sintéticas também utilizadas no tratamento da malária, como artemetér, diidroartemisinina, artemotil e artesunato (figura 7), sendo todas

essas recomendadas pela OMS, para o tratamento da malária, de acordo com o *Guidelines for the treatment of malaria, Segunda Edição 2010* (OMS, 2010b). Ademais, a artemisinina e os derivados semi-sintéticos artemetér e artesunato passaram por diversas investigações clínicas e laboratoriais que possibilitaram a identificação de atividade esquistossomicida frente a todas as principais espécies de *Schistosoma* (EL-LAKKANY & SEIF EL-DIN, 2013; MILLER & SU, 2011; OMS 2010b; CAFFREY, 2007).

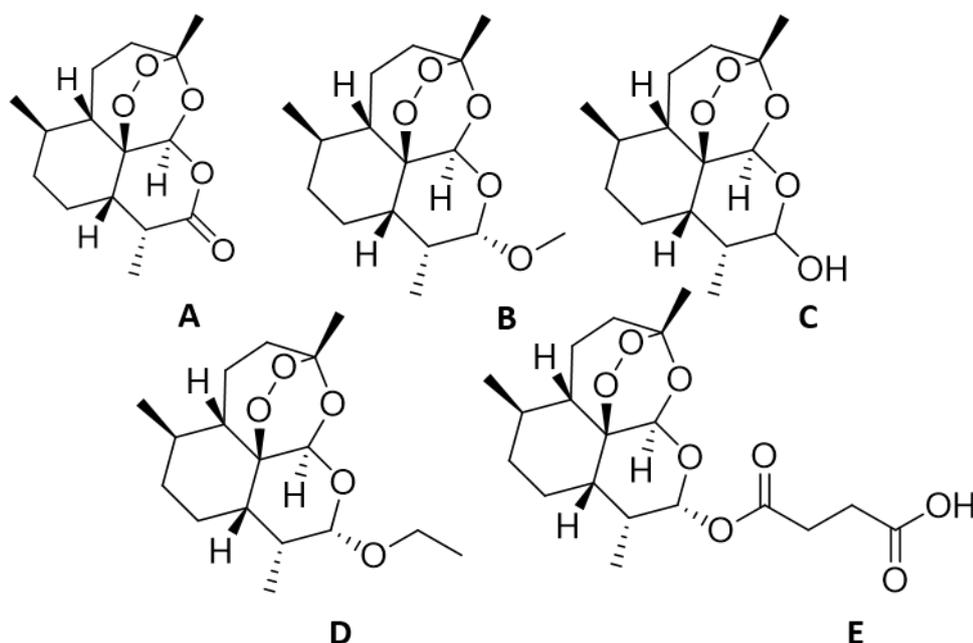


Figura 7: Artemisinina (A), Artemetér (B), Dihidroartemisinina (C), Artemotil (D) e Artesunato (E)

As drogas sintéticas bem como substâncias naturais com atividade esquistossomicida em geral causam perturbações: no acasalamento entre machos e fêmeas, na morfologia ou constituição do tegumento, e na atividade neuromuscular do parasita (NDJONKA *et al.*, 2013).

Em relação ao acasalamento, o estado de cópula é fundamental para a viabilidade do parasita no interior do hospedeiro humano e para o estabelecimento da infecção. Só quando os parasitas estão acasalados (fêmea mantida dentro do canal ginecóforo do macho) a maturação sexual e produção de ovos ocorre. A indução da separação de machos e fêmeas reduz ou até mesmo impede a liberação de ovos, que é um fator relevante na patologia na transmissão da doença (NDJONKA *et al.*, 2013).

O tegumento do *Schistosoma* está envolvido em várias funções vitais tais como a absorção e secreção de nutrientes, e como barreira física contra componentes do sistema imunológico do hospedeiro. Assim, drogas que geram alterações tegumentares tais como vacuolização, descamação, perda de espinhos ou alterações em protuberâncias são consideradas como sendo adequadas para ensaios *in vivo*. No entanto, ao lado das modificações visíveis do tegumento, critérios adicionais devem ser utilizados para avaliar o potencial esquistossomicida de uma substância ou de um extrato, uma vez que essas alterações nem sempre afetam a sobrevivência do parasita. Em acréscimo, diferenças morfológicas e bioquímicas entre macho e fêmea podem fazer com que a eficiência da droga também possa ser diferenciada entre os gêneros (NDJONKA *et al.*, 2013).

O sistema neuromuscular do *S. mansoni* é essencial para uma bem sucedida migração e fixação do verme no hospedeiro definitivo. Este sistema controla os músculos das ventosas, bem como os músculos que revestem as vísceras, incluindo o sistema reprodutivo, digestivo e excretor sendo de grande importância durante o acoplamento entre machos e fêmeas. Alterações em qualquer uma dessas atividades (muscular/neuromuscular) através da intervenção farmacológica poderia interferir no ciclo de vida normal e possivelmente causar a eliminação do parasita (PATOCKA *et al.*, 2014; DE MORAES, 2012a).

A tabela 1 mostra alguns exemplos de produtos naturais ou derivados que apresentaram atividade esquistossomicida.

Tabela 1: Lista de plantas medicinais, produtos e substâncias ativas com conhecida atividade esquistossomicida.

Substância/Extrato	Origem	Atividades esquistossomicidas			Referência
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Observações	
<p>Piplartina (alcaloide)</p>	<i>Piper tuberculatum</i> (pimenta longa)	<i>S. mansoni</i> adultos – 9,5 μM (mortalidade de 100% de machos e fêmeas) Esquistossômulo – 7,5 μM (100% mortalidade)	-----	Redução da atividade motora e redução na oviposição	DE MORAES <i>et al.</i> , 2011 e 2012b
Extrato hidroalcolóico partes aéreas	<i>Tanacetum vulgare</i> (catinga-de-mulata)	<i>S. mansoni</i> adultos – 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (mortalidade de 100%)	-----	Alterações tegumentares	GODINHO <i>et al.</i> , 2014
<p>Nerolidol (sesquiterpeno)</p>	Óleos essenciais de diversas espécies	<i>S. mansoni</i> adultos – 250 e 125 μM (mortalidade de 100% de machos e fêmeas)	-----	Redução da atividade motora e alterações tegumentares	SILVA <i>et al.</i> , 2014
<p>Curcumina (diarilheptanoide)</p>	<i>Curcuma longa</i> (açafrão-da-terra)	<i>S. mansoni</i> adultos - 50 μM (100% Mortalidade em machos e fêmeas)	400mg/Kg em ratos - 43,5% de mortalidade em machos e 4,6% em fêmeas de <i>S. mansoni</i>	Redução da oviposição, indução da separação de machos e fêmeas e redução na atividade motora	ALLAM, 2009; MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2009
<p>Artesunato (éster)</p>	<i>Artemisia annua</i> (absinto doce)	<i>S. mansoni</i> adultos - 40 $\mu\text{g/mL}$ (80% Mortalidade em machos e fêmeas)	<i>S. mansoni</i> formas jovens - 150 e 300 mg/kg em ratos - 67 a 77% de mortalidade em machos e fêmeas)	Redução da atividade motora e da oviposição. Alterações tegumentares	UTZINGER <i>et al.</i> , 2002

Plantas do gênero *Artemisia* (Asteraceae) consistem numa rica fonte de lactonas sesquiterpênicas bioativas e possuem uma longa história relacionada ao controle de parasitas em humanos, e mais recentemente em animais (FERREIRA *et al.*, 2011). Logo, tendo em vista a atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos (FERREIRA *et al.*, 2011) e de substâncias isoladas provenientes de espécies de *Artemisia* (LAHLOU, 2013), esse gênero é considerado um importante arcabouço para a obtenção de extratos ou substâncias ativas frente ao *Schistosoma*. Sendo assim, estudos fitoquímicos, associados a ensaios esquistossomicidas, com extratos brutos e metabólitos isolados de espécies de *Artemisia* podem ser considerados promissores no intuito de encontrar novas moléculas ativas frente ao *S. mansoni*.

1.2.1 Família ASTERACEAE

A família Asteraceae, anteriormente designada Compositae, pertence à ordem Asterales e constitui a maior das famílias dentre as Eudicotiledôneas. Apresenta mais de 1.600 gêneros e 23.600 espécies de ervas, arbustos e raramente árvores, agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (KENNY *et al.*, 2014; SILVA & ANDRADE, 2013; BERETTA *et al.*, 2008). Os principais metabólitos secundários isolados das espécies de Asteraceae são monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos poliacetilenos, flavonoides, benzofuranos, benzopiranos e cumarinas (SCOTTI *et al.*, 2012).

Do ponto de vista econômico, cerca de 40 espécies têm importância direta na alimentação humana, como alface (*Lactuca sativa* L.) e chicória (*Cichorium endivia*), e indireta na obtenção de produtos, como girassol (*Helianthus annuus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.) e carqueja (*Baccharis trimera*). Muitas das espécies silvestres apresentam potencial nutricional, interesse tecnológico ou ornamental, e centenas produzem metabólitos secundários de uso farmacêutico ou industrial ou fornecem néctar e pólen para a apicultura e também forragem para a produção pecuária (SILVA & ANDRADE, 2013).

Segundo BERETTA *et al.* (2008), as Asteráceas constituem um dos grupos que obtiveram maior sucesso entre as plantas com flores. E a contínua expansão dessa família tem sido fomentada por uma evolução química, a qual permitiu o desenvolvimento de substâncias repelentes. Ela possui ampla distribuição, sendo bem representada nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas.

No Brasil, todas as tribos estão presentes, tanto de forma nativa quanto introduzida artificialmente. Há registros de aproximadamente 250 gêneros e 2.000 espécies, distribuídas em todo o território nacional (SILVA & ANDRADE, 2013; BERETTA *et al.*, 2008).

1.2.2 Gênero *Artemisia*

O gênero *Artemisia* é o maior e o mais amplamente distribuído gênero dentre os pertencentes à família Asteraceae. Possui aproximadamente 500 espécies distribuídas em todo o mundo (ZHU *et al.*, 2013; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012).

As plantas pertencentes a este gênero são fontes de metabólitos secundários como terpenos, cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos e esteróis (CALA *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013). As espécies de *Artemisia* são comumente utilizadas, como antihelmínticos alternativos tanto em humanos quanto em animais (CALA *et al.*, 2014). De acordo com SQUIRES *et al.*, (2011) as lactonas sesquiterpênicas e os flavonoides são as classes de metabólitos que possivelmente estejam mais relacionadas com a atividade antihelmíntica, observadas em várias pesquisas. Um compilado de trabalhos que demonstraram a atividade antiparasitária de diferentes espécies de *Artemisia*, é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Compilado de trabalhos que demonstram atividade antiparasitária de diferentes espécies de *Artemisia sp.*

Espécie de <i>Artemisia sp.</i>	Atividade anti-parasitária <i>in vitro/in vivo</i> - frente à	Extrato/metabólito ativo	Referência
<i>A. ciniformis</i>	<i>In vitro</i> - inibição β -hemetina (antimalária)	Extrato diclorometânico – partes aéreas	MOJARRAB <i>et al.</i> , 2015
<i>A. biennis</i> <i>A. turanica</i>	<i>In vitro</i> - inibição β -hemetina (antimalária)	Extratos de acetato de etila – partes aéreas	MOJARRAB <i>et al.</i> , 2015
<i>A. campestris</i>	<i>In vitro</i> - <i>Haemonchus contortus</i>	Extratos aquoso e etanólico – partes aéreas	AKKARI <i>et al.</i> , 2014
<i>A. armeniaca</i> <i>A. aucheri</i>	<i>In vitro</i> - inibição β -hemetina (antimalária)	Extratos diclorometânicos – partes aéreas	MOJARRAB <i>et al.</i> , 2014
<i>A. lancea</i>	<i>In vitro</i> - <i>Haemonchus contortus</i>	Óleo essencial	ZHU <i>et al.</i> , 2013
<i>A. annua</i> <i>A. triloba</i>	<i>In vitro</i> - <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Echinostoma caproni</i> <i>Fasciola hepatica</i>	Extrato etanólico - folhas	FERREIRA <i>et al.</i> , 2011
<i>A. absinthium</i> L.	<i>In vitro</i> - <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Fasciola hepatica</i>	Extrato etanólico - folhas	FERREIRA <i>et al.</i> , 2011
<i>A. absinthium</i> L.	<i>In vivo</i> – <i>Haemonchus contortus</i>	Planta na forma de forragem	VALDERRÁBANO <i>et al.</i> , 2010
<i>A. annua</i> <i>A. absinthium</i> L.	<i>In vitro</i> - <i>Plasmodium falciparum</i> <i>In vivo</i> - <i>Plasmodium berghei</i>	Extrato etanólico 80% - partes aéreas	RAMAZANI <i>et al.</i> , 2010
<i>A. absinthium</i>	<i>In vitro e in vivo</i> - <i>Haemonchus contortus</i>	Extratos aquoso e etanólico – partes aéreas	TARIQ <i>et al.</i> , 2009
<i>A. maciverae</i>	<i>In vivo</i> – <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Extrato etanólico – toda a planta	ENE <i>et al.</i> , 2009
<i>A. absinthium</i> L. <i>A. vulgaris</i>	<i>In vivo</i> - <i>Trichinella spiralis</i>	Extratos metanólicos – partes aéreas	CANER <i>et al.</i> , 2008
<i>A. absinthium</i> L.	<i>In vitro</i> - Ovos de <i>Ascaris suum</i> Larvas <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Extrato etanólico 80% – partes aéreas	URBAN <i>et al.</i> , 2008
<i>A. brevifolia</i>	<i>In vitro</i> - <i>Haemonchus contortus</i>	Extratos aquoso e metanólico – toda a planta	IQBAL <i>et al.</i> , 2004
<i>A. absinthium</i> L.	<i>In vivo</i> - <i>Plasmodium berghei</i>	Extrato etanólico – folhas	ZAFAR <i>et al.</i> , 1990

1.2.3 A espécie *Artemisia absinthium* L.

Artemisia absinthium L., também conhecida mundialmente como absinto, é uma espécie de planta aromática medicinal pertencente à família Asteraceae, originária da Europa e Ásia, amplamente distribuída por esses continentes e também pela América e África, sendo no Brasil popularmente conhecida como “losna” (CHI *et al.*, 2012; HEINRICH *et al.*, 2012). A figura 8 demonstra a distribuição global dessa espécie.



Figura 8: Distribuição global da espécie *A. absinthium* L. (GBFI, 2013)

As partes aéreas de *A. absinthium* L. têm sido tradicionalmente utilizadas como anti-helmíntico, anti-séptico, antiespasmódico, febrífugo, estimulante cardíaco, para restauração do declínio da função mental, inflamação do fígado, dores de estômago, anorexia, má digestão e para melhorar a memória (VALIAKOS *et al.*, 2015; CORRÊA-FERREIRA *et al.*, 2014; TURAK *et al.*, 2014; JOSHI, 2013; SHAFI *et al.*, 2012; BORA & SHARMA, 2010; TARIQ *et al.*, 2009). ALI *et al.* (2013) acrescenta que essa espécie também é utilizada no tratamento da leucemia e esclerose, sendo muito comum encontrá-la em bebidas alcoólicas (absinto e bebidas relacionadas) em função de estimular a criatividade, capacidade cognitiva e excitação (TURAK *et al.*, 2014; ALI *et al.*, 2013; BORA & SHARMA, 2010).

O absinto (extraído da *A. absinthium* L.), uma bebida popular, (vendida sob a forma de um licor verde-esmeralda) foi intensamente utilizado no final do século 19 e início do 20 por poetas e artistas, incluindo Arthur Rimbaud, Degas, Monet, Baudelaire, Picasso, Hemingway, Oscar Wilde e Vincent van Gogh. Há

relatos que essa bebida provocava alucinações, convulsões, contribuindo para psicoses e suicídios. Devido a esses efeitos, no passado, teve sua comercialização proibida em vários países, porém atualmente, após correção de teor alcoólico, está liberada em quase todo o mundo (DA SILVA *et al.*, 2005).

A *A. absinthium* L. (figura 9) é uma planta subarborescente de caule piloso com pouco mais de 1,0 m de altura, folhas multifendidas de lóbulos finos, canescentes, de margem inteira, de 7 a 12 cm de comprimento. Apresenta flores em capítulos subglobosos, amarelos, agrupados em panículas. Sendo que todas as partes da planta apresentam sabor muito amargo (LORENZI & MATOS, 2008).



Figura 9: Partes aéreas *Artemisia absinthium* L. (autora)

O Ministério da Saúde divulgou em fevereiro de 2009 uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), na qual estão incluídas 71 espécies vegetais. A finalidade da Rennisus é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de produtos de interesse do SUS. A espécie *A. absinthium* L., objeto de estudo deste trabalho, está incluída nesta lista de plantas selecionadas pelo SUS, em função da sua utilização para problemas de estômago, fígado, rins e vermes (lombriga, oxiúro, giárdia e ameba) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A composição e os efeitos biológicos dos óleos essenciais (OE) obtidos a partir de *A. absinthium* L. têm sido extensamente estudados. Entre os

componentes majoritários estão a β e α tujona, mirceno, acetato *trans*-sabinil, pineno, 1,8-cineol, cânfora, acetato de crisantenil, sabineno, mirtenol, acetato de bornila, artemisiacetona, linalol, entre outros monoterpenos dependendo da origem da planta (BAILEN *et al.*, 2013). Em relação aos efeitos biológicos do óleo, foi demonstrada atividade antimicrobiana (JOSHI, 2013; LOPES-LUTZ *et al.*, 2008; BLAGOJEVIC *et al.*, 2006), antiprotozoária contra *Leishmania aethiopica* e *L. donovani* (TARIKU *et al.*, 2011) e para os óleos ricos em tujona foram obtidas atividades acaricidas (CHIASSON *et al.*, 2001), inseticidas (BACHROUCH *et al.*, 2015; UMPIÉRREZ *et al.*, 2012) entre outras.

Além da atividade biológica do óleo essencial de *A. absinthium* L., os extratos brutos desta espécie também têm despertado grande interesse dos pesquisadores. DARADKA *et al.* (2014) colocou em prova a atividade hipoglicemiante *in vivo* de extratos hidro alcoólicos de *A. absinthium* L. e obteve nas concentrações de 500 e 1.000mg/kg redução significativa dos níveis glicêmicos dos animais. GHAFoori *et al.* (2013) avaliou extratos obtidos com diferentes solventes, em diferentes concentrações, em relação à atividade antioxidante e encontrou pronunciado efeito, para esse parâmetro, nos extratos metanólicos.

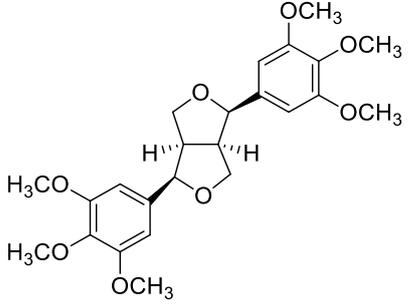
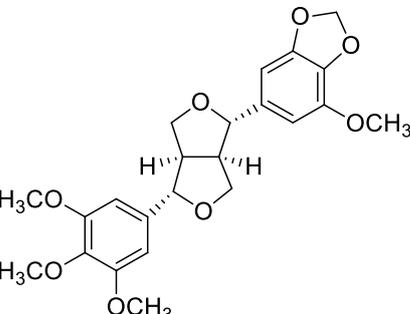
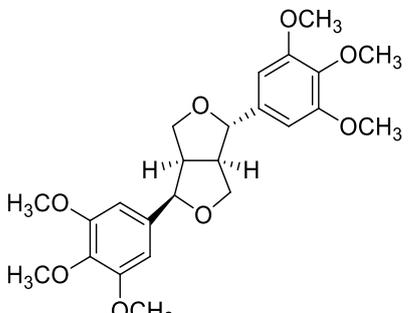
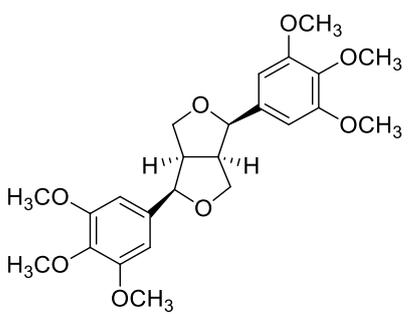
NALBANTSOY *et al.* (2013) investigou a atividade antiinflamatória *in vivo* e a eficácia terapêutica do extrato metanólico de *A. absinthium* L. em relação ao veneno da cobra *Montivipera xanthina* e em modelo de edema de pata induzido por carragenina, obtendo-se resultados estatisticamente significativos para redução do processo inflamatório nos dois modelos analisados. SHAFI *et al.* (2012) estudou os efeitos, também, do extrato metanólico de *A. absinthium* L. sobre linhagens de células de câncer de mama encontrando inibição irreversível da proliferação dessas células, o que sugere que esse extrato apresente propriedade anticancerígenas.

As propriedades hepatoprotetoras descritas popularmente para *A. absinthium* L. foram confirmadas por AMAT *et al.* (2010), os quais avaliaram o extrato aquoso da planta em ratos com injúria hepática, ocasionada imunologicamente ou induzida por tetracloreto de carbono. O pré-tratamento dos ratos com o extrato aquoso de *A. absinthium* L., protegeu o fígado de injúrias, sendo que o tratamento com 200 mg/kg mostrou atividade comparável ao tratamento com silimarina, substância hepatoprotetora utilizada como

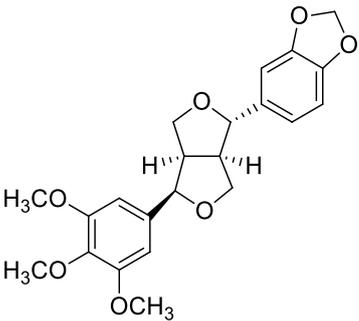
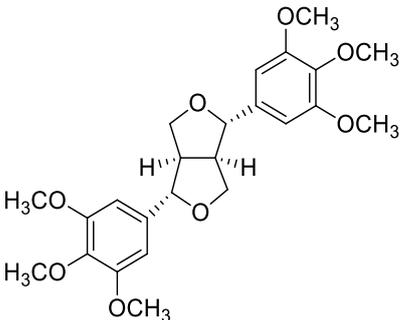
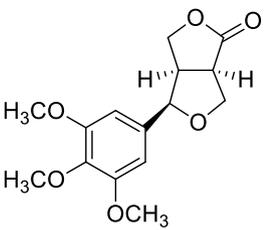
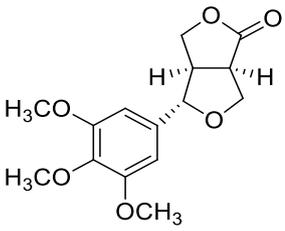
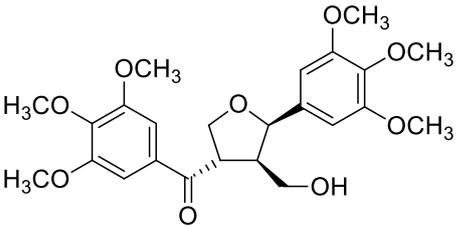
referência. Os autores sugerem que o extrato da planta protegeu o fígado contra danos oxidativos e possibilitou a manutenção dos níveis intracelulares de enzimas antioxidantes, resultando assim na proteção do fígado contra injúria aguda.

Diversos autores buscaram também isolar, identificar e avaliar metabólitos secundários dessa espécie sobre diferentes atividades biológicas. A tabela 2 apresenta algumas das substâncias já isoladas das partes aéreas de *A. absinthium* L, sendo que quando foi possível encontrar na literatura alguma atividade biológica, esta foi mencionada.

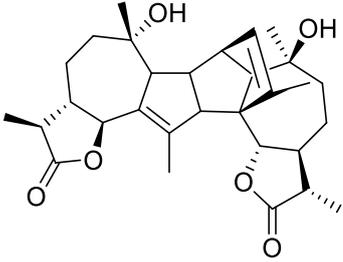
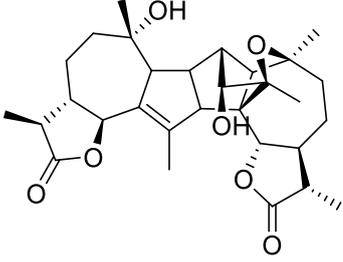
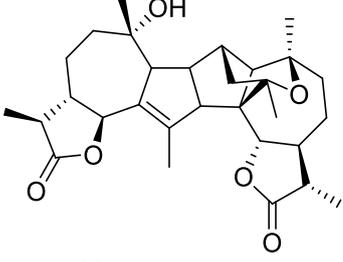
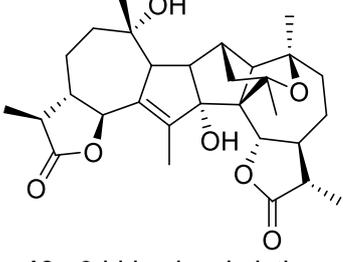
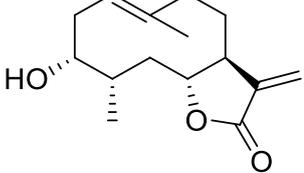
Tabela 3: Substâncias já isoladas das partes aéreas de *A. absinthium* L.

METABÓLITOS ISOLADOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>A. absinthium</i> L.		
Estrutura Química Nomes	Isolamento	Atividade Biológica
LIGNANAS		
 <p>1 - Diaiangambina</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012; CHI <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>Atividade imunomodulatória e antiinflamatória - <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (DE LEÓN <i>et al.</i>, 2002)</p>
 <p>2 - Sesartemina</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012; CHI <i>et al.</i>, 2012; ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>Citotóxica para células de sarcoma (Meth-A) (MA <i>et al.</i>, 2001)</p>
 <p>3 - Epiangambina</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012; CHI <i>et al.</i>, 2012; ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>Antagonista <i>in vitro</i> do Fator de Agregação Plaquetária (CHEN <i>et al.</i>, 2000)</p>
 <p>4 - (-)Siringarenisol</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>-----</p>

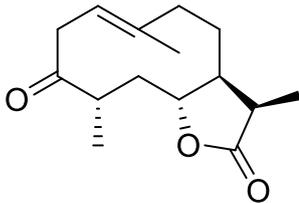
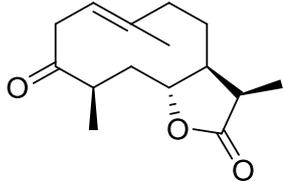
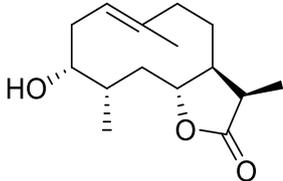
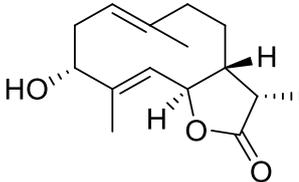
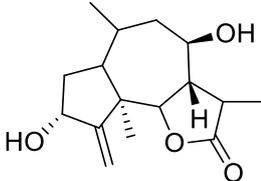
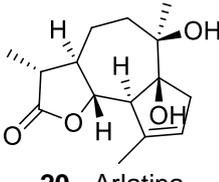
Continuação Tabela 3

 <p>5 - Epianchantina</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>Antagonista <i>in vitro</i> do Fator de Agregação Plaquetária (CHEN <i>et al.</i>, 2000)</p>
 <p>6 - langambina</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>Antagonista <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do Fator de Agregação Plaquetária (ARAÚJO <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> (NETO <i>et al.</i>, 2011)</p>
 <p>7 - Caruilignana C</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012 CHI <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>-----</p>
 <p>8 - 3β – caruilignana C</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>-----</p>
 <p>9 - Arborona</p>	<p>TULAKE <i>et al.</i>, 2012 CHI <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>-----</p>

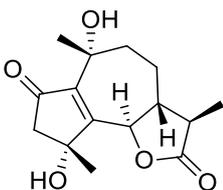
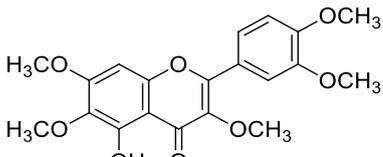
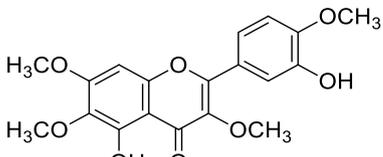
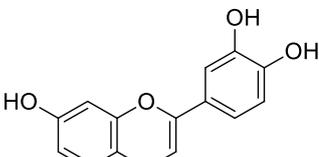
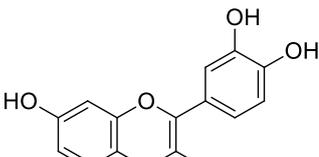
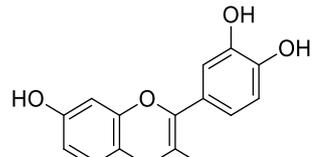
LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

 <p>10 - Absintina</p>	<p>ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>-----</p>
 <p>11 - Anabsina</p>	<p>ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>-----</p>
 <p>12 - Anabsintina</p>	<p>TURAK <i>et al.</i>, 2014; ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>-----</p>
 <p>13 - 3-hidroxiabsintina</p>	<p>ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>-----</p>
 <p>14 - Artabolídeo</p>	<p>ARAI <i>et al.</i>, 2013</p>	<p>-----</p>

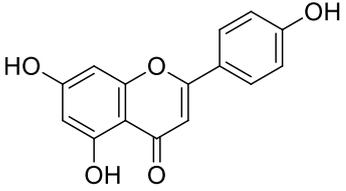
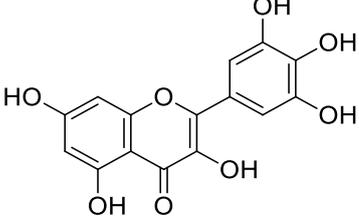
Continuação Tabela 3

 <p>15 - Ketopelenolídeo A</p>	<p>ARAI <i>et al.</i>, 2013</p>	<p>-----</p>
 <p>16 - Ketopelenolídeo B</p>	<p>ARAI <i>et al.</i>, 2013; ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>-----</p>
 <p>17 - Hidroxipelenolídeo</p>	<p>ARAI <i>et al.</i>, 2013; GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i>, 2012; MARTÍN <i>et al.</i>, 2011</p>	<p>-----</p>
 <p>18 - Artabina</p>	<p>SAFAROVA & SERKEROV, 1997</p>	<p>-----</p>
 <p>19 - Absindiol</p>	<p>SAFAROVA & SERKEROV, 1997</p>	<p>-----</p>
 <p>20 - Arlatina</p>	<p>KASAMOV <i>et al.</i>, 1984</p>	<p>-----</p>

Continuação Tabela 3

 <p>21 - Artemolína</p>	<p>KASYMOV <i>et al.</i>, 1979</p>	<p>-----</p>
<p>FLAVONOIDES</p>		
 <p>22 - Artemetina</p>	<p>MARTÍN <i>et al.</i>, 2011; ABERHAM <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>Efeito hipotensor <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (DE SOUZA <i>et al.</i>, 2011)</p>
 <p>23 - Casticina</p>	<p>MARTÍN <i>et al.</i>, 2011</p>	<p>Efeito protetivo <i>in vitro</i> contra glioma (LIU <i>et al.</i>, 2013) Citotoxicidade frente a células cancerígenas (HUANG <i>et al.</i>, 2013)</p>
 <p>24 - Luteolina</p>	<p>CRACIUNESCU <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>Atividade anticâncer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (CHIAN <i>et al.</i>, 2014) Atividade antibacteriana (SATO <i>et al.</i>, 2000)</p>
 <p>25 - Quercetina</p>	<p>CRACIUNESCU <i>et al.</i>, 2012; GESZPRYCH <i>et al.</i>, 2011</p>	<p>Atividade antiinflamatória <i>in vitro</i> (BRONNER <i>et al.</i>, 1985)</p>
 <p>26 - Rutina</p>	<p>CRACIUNESCU <i>et al.</i>, 2012; GESZPRYCH <i>et al.</i>, 2011</p>	<p>-----</p>

Continuação Tabela 3

 <p>27 - Apigenina</p>	<p>CRACIUNESCU <i>et al.</i>, 2012; GESZPRYCH <i>et al.</i>, 2011</p>	<p>Atividade antibacteriana (SATO <i>et al.</i>, 2000)</p>
 <p>28 - Miricetina</p>	<p>CRACIUNESCU <i>et al.</i>, 2012</p>	<p>-----</p>

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos brutos, óleo essencial e metabólitos isolados de *A. absinthium* L..

- Objetivos específicos

- a. Obter os extratos brutos das raízes e das partes aéreas de *A. absinthium* L.;
- b. Obter o óleo essencial das partes aéreas de *A. absinthium* L.;
- c. Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos e do óleo essencial obtidos;
- d. Realizar o estudo fitoquímico do extrato bruto mais ativo, buscando a purificação, isolamento, e identificação das substâncias principais desse extrato;
- e. Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos metabólitos majoritários isolados do extrato que apresentar melhor atividade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1 Materiais cromatográficos

A obtenção dos extratos brutos das raízes e folhas de *A. absinthium* L., bem como o fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários foram realizados no laboratório do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN). Este pertencente à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), o qual dispôs dos seguintes equipamentos/materiais para o desenvolvimento deste trabalho:

- Rotaevaporador RII *Buchi*
- Bomba V-700 *Buchi*
- Balança AY220 *Marte*
- Câmara U.V. SL-204 ($\lambda = 254$ e 366 nm)
- para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 GF254 (*Merck*)
- para cromatografia líquida à vácuo (CLV) utilizaram-se como adsorventes sílica gel 60H (90% das partículas são menores que $55 \mu\text{m}$, *Merck*) e sílica gel 60 A (partículas de $40\text{-}63 \mu\text{m}$, *Merck*), na proporção de 1:1 (m/m), empregando-se coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, contendo placa sinterizada
- para cromatografia em coluna *flash* utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 A (partículas de $40\text{-}63 \mu\text{m}$, *Merck*) empregando-se coluna de vidro com 4 cm de diâmetro e 40 cm de altura
- para as cromatografias em coluna clássica utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 A (partículas de $40\text{-}63 \mu\text{m}$, *Merck*) empregando-se colunas de vidro com 2 e 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura
- para as revelações das cromatoplasmas foram utilizadas solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm)

- para a extração, partições, fracionamentos e sistemas cromatográficos em colunas e placa, utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas *Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec*

3.1.2 Obtenção e Análise em Cromatografia de Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do Óleo Essencial de *A. absinthium* L. (OEAA)

A obtenção do óleo essencial foi realizada no laboratório de Farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pela professora Magda Narciso Leite, a qual gentilmente disponibilizou o espaço e os seguintes equipamentos para a realização desse procedimento:

- Clevenger
- Manta aquecedora

As análises de CG-EM foram gentilmente realizadas no Departamento de Química da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto sob os cuidados do professor Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, sendo utilizados os seguintes equipamentos/materiais para as análises:

- Cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) Shimadzu QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar do tipo filtro de massas.
- coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano
- hexano grau espectroscópico (marca Mallinkrodt)

3.1.3 Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises em CLAE foram realizadas na Central Analítica de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO), da Faculdade de Farmácia da Universidade

Federal de Juiz de Fora (UFJF), a qual dispôs dos seguintes equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho:

- Microcentrífuga – *KASVI*
- Purificador de água Purelab Classic - *ELGA*
- Lavadora Ultrassônica Digital Aquecida – *SoniClean 2*
- Kit filtração à vácuo
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (*Waters*), composto por: bomba binária 1525, detector PDA 2998, injetor auto sampler 2707, e *Software Empower3* para aquisição e tratamento dos dados. Utilizaram-se duas colunas de fase reversa, C_{18} , ambas *Sunfire*, sendo uma analítica (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) e a outra semipreparativa (10 mm x 250 mm, 5 μ m)
- Metanol grau HPLC (*J.T. Baker*), água purificada e ácido orto-fosfórico 85% (*Merck*).

3.1.4 Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises espectroscópicas foram realizadas no Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFJF, o qual disponibilizou o espectrômetro BRUKER Ascend™ 500, operado em 500MHz (RMN de 1H) e 125MHz (RMN de ^{13}C), e o *Software TopSpin 3.2*. Para a obtenção dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C das substâncias isoladas utilizou-se clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, *Cambridge Isotope Laboratories*).

3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (folhas e raízes) foi coletado no dia 09 de Janeiro de 2014, no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF (21°46'39.48" S; 43°22'00.10" O). A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo CESJ 65106.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS RAÍZES DE *A. absinthium* L.

Após a seleção e lavagem das raízes para remoção de sujidades, o material vegetal foi seco em temperatura ambiente, durante 10 dias. Após secagem, as mesmas foram submetidas à moagem para obtenção do pó. O pó assim obtido (180 g) foi submetido à extração por remaceração (três etapas), em etanol, por um período de 9 dias.

A solução etanólica foi filtrada e, em seguida, transferida progressivamente para balão de fundo redondo e concentrada com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C. O extrato obtido foi transferido para um frasco de boca larga, previamente pesado, e mantido aberto para a completa evaporação do solvente orgânico até a obtenção de peso constante. Após estes procedimentos, foram obtidos 1,5 g de extrato etanólico bruto da raiz de *A. absinthium* L. (AAR).

3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS FOLHAS DE *A. absinthium* L. OBTIDO POR LAVAGEM FOLIAR

Optou-se pela lavagem foliar com o intuito de extrair o conteúdo dos tricomas glandulares encontrados na *A. absinthium* L., uma vez que, grande parte dos metabólitos secundários presentes (monoterpenos, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e cumarinas) nas espécies pertencentes à família Asteraceae, concentram-se nos tricomas glandulares encontrados na superfície das folhas (BARTOLI *et al.*, 2011; KELSEY & SHAFIZADEH, 1980). As

imagens a seguir (figura 10) foram capturadas das folhas de *A. absinthium* L., utilizada nesse trabalho, com a colaboração de Flavia Bonizol Ferrari - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) do departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora. O material foi cortado transversalmente, montado em água glicerinada e fotografado em microscópio de luz modelo BX41 com câmera digital acoplada modelo Power Shot A640. Nessas imagens é possível visualizar a presença desses tricomas glandulares.

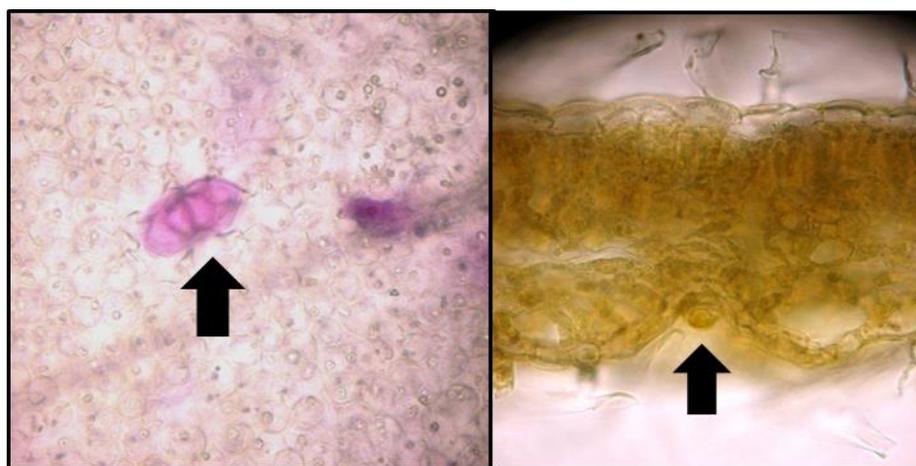


Figura 10: Tricomas glandulares *A. absinthium* L.

Após a coleta, parte das folhas foram selecionadas e secas em temperatura ambiente por 7 dias, obtendo-se no total 242,3g de folhas. Essas foram divididas em 6 partes e submetidas a lavagem com CH_2Cl_2 . Cada parte (aproximadamente 40g de folhas) foi colocada em um recipiente de vidro alto e de boca larga juntamente com 1L de CH_2Cl_2 , promoveu-se agitação em movimento circular por 30 segundos em capela de exaustão e, em seguida, o solvente foi filtrado, rotaevaporado à temperatura de 40°C e novamente adicionado às folhas (figura 11). Esse procedimento foi realizado três vezes para cada uma das 6 porções. O extrato obtido foi transferido para um frasco de boca larga, previamente pesado e mantido aberto para a completa evaporação do solvente orgânico até a obtenção de um peso constante. Após estes procedimentos, foram obtidos 6,2 g de extrato diclorometânico bruto das folhas de *A. absinthium* L. (AAF).

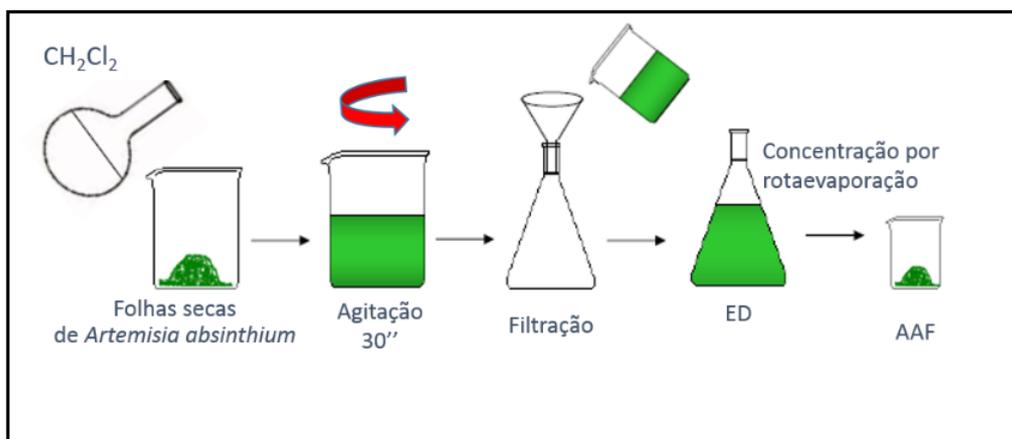


Figura 11: Esquema para obtenção do AAF (ED – extrato diclorometânico)

No intuito de selecionar um dos extratos brutos para dar continuidade ao processo fitoquímico, estes foram avaliados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

De acordo com os resultados descritos no item 4.4.1, o extrato diclorometânico obtido por lavagem foliar (AAF), por apresentar melhor atividade esquistossomicida *in vitro*, foi selecionado para dar prosseguimento ao estudo fitoquímico.

3.5 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. absinthium* L.

Logo após a coleta da *A. absinthium* L. 100g de folhas foram selecionadas, rasuradas e colocadas em um balão de fundo redondo com o auxílio de um bastão de vidro e às folhas foi acrescentado 1000 mL de água deionizada. O balão foi acondicionado sobre uma manta aquecedora e acoplado ao aparelho de Clevenger. A temperatura do termostato da manta foi mantida no máximo, 9, numa escala de 0 a 9 até a ebulição da água, sendo diminuída para 2, e mantida nesta, por 4h (figura 12). O óleo foi retirado do Clevenger e a ele foi acrescentado sulfato de sódio anidro para retirar uma possível presença de água. Após essa etapa, o óleo foi filtrado com algodão e acondicionado em freezer -10°C até o encaminhamento para o ensaio biológico. Foram obtidos 0,3 mL do óleo essencial de *Artemisia absinthium* L. (OEAA).



Figura 12: Obtenção do OEAA

3.6 ANÁLISE EM CLAE DO EXTRATO, FRAÇÕES E METABÓLITOS DE *A. absinthium* L.

A análise do extrato AAF, substâncias isoladas e frações foram realizadas em CLAE acoplada ao detector UV-visível PDA, em fase reversa.

Para as análises, 2mg das amostras foram solubilizados em MeOH grau HPLC e colocado em ultrassom aquecido a 35^oC por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram retirados com uma seringa e filtrados através de uma membrana, de poro 45 μ m, diretamente para os vials.

O gradiente de eluição consistiu de uma fase binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) e fluxo de 1mL/min.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS DO OEAA

A constituição química do óleo essencial das folhas de *Artemisia absinthium* L. (OEAA) foi determinada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A identificação dos constituintes químicos do OEAA foi realizada com base na metodologia estabelecida por ADAMS (2007) conforme descrito a seguir.

Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240°C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min. Para a padronização dos tempos de retenção foi adicionada às amostras de óleos essenciais uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₈ a C₂₀). Os índices de retenção (IR) foram calculados de acordo com a equação abaixo, proposta por DOOL & KRATZ (1963):

$$IR = 100n + 100 (tx - tn) / (tn + 1 - tn)$$

Onde **n** é o número de carbonos do primeiro hidrocarboneto da mistura de padrões cujo tempo de retenção **tn** é imediatamente menor que o tempo de retenção **tx** do constituinte do óleo essencial, e **tn+1** é o tempo de retenção do hidrocarboneto da mistura de padrões imediatamente maior.

A amostra eluída da coluna cromatográfica foi direcionada pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 280°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de *m/z* entre 40 e 600.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa obtidos, com a base de dados NIST, Pherobase e WILEY7.LIB, este através do software CG-EM Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem, e pela comparação dos índices de retenção (IR) calculados com a literatura de ADAMS, 2007. Os IR das substâncias foram obtidos através de uma co-injeção da amostra com uma série homologa de alcanos (C₈ – C₂₀).

3.8 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO AAF

Com o objetivo de isolar seus constituintes, 6,2 g do extrato AAF foi submetido à CLV de 10 cm de diâmetro por 8 cm de altura de sílica, empacotada com 300 g de sílica (sílica gel 60H + sílica 60A na proporção de 1:1p/p), utilizando-se como eluentes solventes e misturas de solventes com polaridades crescentes, sendo coletadas 8 frações de 1500 mL cada (figura 13). Após análise das mesmas, por meio de CCD, foi possível agrupá-las em 7 frações, como mostra a Tabela 4.



Figura 13: Coluna Cromatográfica Líquida a Vácuo (VLC) do extrato AAF

Tabela 4: Frações obtidas da CLV do extrato AAF

Eluentes	Frações	Massas (g)
Hex100%	AA1	0,2538
Hex:AcOEt 5% e 10%	AA3 (2+3)	0,4918
Hex:AcOEt 20%	AA4	0,3754
Hex:AcOEt 40%	AA5	0,7163
Hex:AcOEt 70%	AA6	0,9432
AcOEt 100%	AA7	1,3586
MeOH 100%	AA8	0,5042
TOTAL		4,6433

3.8.1 Estudo da fração AA6

Em continuidade ao estudo fitoquímico, a fração AA6 (0,9432g) obtida da CLV, foi submetida à cromatografia em coluna Flash (coluna de vidro de 4 cm de diâmetro empacotada com 120g de sílica gel 60A, obtendo-se uma altura de 20 cm) figura 11. Foram obtidas 107 frações de 40 mL cada (figura 14). Os eluentes utilizados foram CHCl_3 e Me_2CO em gradiente de polaridade. Após análise em CCD, foi possível agrupar as 107 frações em 13 subfrações (tabela 5).



Figura 14: Coluna Cromatográfica Flash da fração AA6

Tabela 5: Subfrações obtidas da Coluna Flash AA6

Eluentes	Frações	Massas (g)
CHCl_3 : Me_2CO 5%	AA6.12 ₍₁₋₁₂₎	0,1593
CHCl_3 : Me_2CO 5%	AA6.18 ₍₁₃₋₁₈₎	0,0831
CHCl_3 : Me_2CO 5%	AA6.40 ₍₁₉₋₄₀₎	0,1596
CHCl_3 : Me_2CO 5%	AA6.44 ₍₄₁₋₄₄₎	0,009
CHCl_3 : Me_2CO 5%	AA6.70 ₍₄₅₋₇₀₎	0,0465
CHCl_3 : Me_2CO 5% e 10%	AA6.93 ₍₇₁₋₉₃₎	0,044
CHCl_3 : Me_2CO 10%	AA6.101 ₍₉₄₋₁₀₁₎	0,048
Me_2CO 100%	AA6.102	0,0063
Me_2CO 100%	AA6.103	0,0145
Me_2CO 100%	AA6.104	0,1076
Me_2CO 100%	AA6.105	0,0784
Me_2CO 100%	AA6.106	0,034
Me_2CO 100%	AA6.107	0,0137
TOTAL		0,804

Após a análise das subfrações por meio da CCD, a subfração AA6.12 (0,1593 g) foi selecionada para dar continuidade ao processo de isolamento.

3.8.2 Estudo da fração AA6.12

Em função do perfil cromatográfico obtido em CCD, novamente optou-se nessa subfração realizar lavagem com MeOH seguida de sedimentação permitindo dessa forma a separação de substâncias com polaridades distintas, por entre o sobrenadante e o sedimento. Após análise cromatográfica em CCD, observou-se que o sedimento desta subfração **AA6.12** após a lavagem com MeOH apresentou uma única mancha nas condições cromatográficas analisadas (figura 15), obtendo-se no total 0,0875g de substância pura. Logo, essa subfração foi submetida a análises em CLAE e espectroscópica para verificação do perfil químico e identificação de sua estrutura molecular, respectivamente.

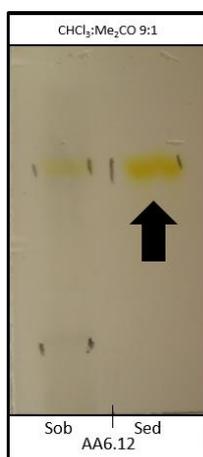


Figura 15: CCD da substância obtida da subfração AA6.12. Eluente: CHCl₃:Me₂CO (9:1 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%

3.8.3 Estudo da fração AA6.40

Em continuidade ao estudo fitoquímico, a fração AA6.40 (0,1596g) obtida na coluna Flash da fração AA6, foi submetida à cromatografia em coluna clássica (coluna de vidro de 2 cm de diâmetro empacotada com 40g de sílica gel 60A, obtendo-se uma altura de 22 cm) figura 12. Foram obtidas 38 frações de 40 mL cada. Os eluentes utilizados foram CHCl₃ e Me₂CO em gradiente de

polaridade (figura 16). Após análise em CCD, foi possível agrupar as 38 frações em 9 subfrações (tabela 6).



Figura 16: Coluna Cromatográfica Clássica da fração AA6.40

Tabela 6: Subfrações obtidas da Coluna Clássica AA6.40

Eluentes	Frações	Massas (g)
CHCl ₃ :Me ₂ CO 2%	AA6.40.1	0,002
CHCl ₃ :Me ₂ CO 2%	AA6.40.8 ⁽²⁻⁸⁾	0,008
CHCl ₃ :Me ₂ CO 5%	AA6.40.17 ⁽⁹⁻¹⁷⁾	0,015
CHCl ₃ :Me ₂ CO 10%	AA6.40.26 ⁽¹⁸⁻²⁶⁾	0,010
CHCl ₃ :Me ₂ CO 10%	AA6.40.27	0,003
CHCl ₃ :Me ₂ CO 10% e 15%	AA6.40.28	0,004
CHCl ₃ :Me ₂ CO 15%	AA6.40.30 ⁽²⁹⁻³⁰⁾	0,005
CHCl ₃ :Me ₂ CO 15%	A6.40.36 ⁽³¹⁻³⁶⁾	0,048
CHCl ₃ :Me ₂ CO 20%	AA6.40.38 ⁽³⁷⁻³⁸⁾	0,006
TOTAL		0,101

3.8.4 Estudo da fração AA6.40.36

Após análise cromatográfica em CCD observou-se uma mancha majoritária na fração AA6.40.36 nas condições cromatográficas utilizadas (figuras 17). Logo, essa fração 0,048g, foi submetida à análise em CLAE e espectroscópica para verificação do seu perfil químico e identificação de sua estrutura respectivamente.

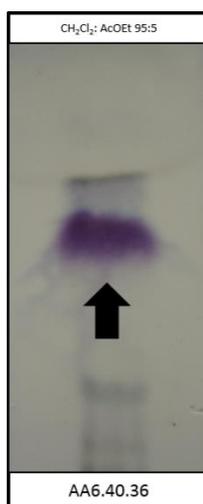


Figura 17: CCD da subfração AA6.40.36. A seta preta indica a substância majoritária. Eluente: CH₂Cl₂:AcOEt (95:5 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%

3.8.5 Estudo da fração AA7

Em continuidade ao estudo fitoquímico, a fração AA7 (1,3586g) obtida da CLV, foi submetida à cromatografia em coluna Clássica (coluna de vidro de 3 cm de diâmetro empacotada com 85g de sílica gel 60 A, obtendo-se uma altura de 30 cm) (figura 18). Foram obtidas 39 frações de 100 mL cada. Os eluentes utilizados foram Hex e AcOEt em gradiente de polaridade. Após análise em CCD, foi possível agrupar as 39 frações em 5 subfrações (tabela 7). A figura 19 mostra as subfrações de AA7.33 antes de serem agrupadas.

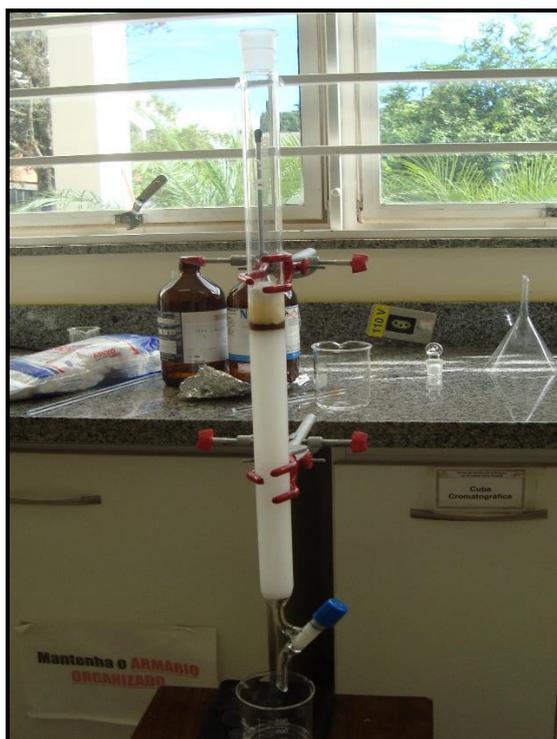


Figura 18: Coluna Cromatográfica Clássica da fração AA7

Tabela 7: Subfrações obtidas da Coluna Clássica AA7

Eluentes	Frações	Massas (g)
Hex:AcOEt 30%	AA7.1	0,0367
Hex:AcOEt 30% a 45%	AA7.26 ⁽²⁻²⁶⁾	0,235
Hex:AcOEt 50%	AA7.27	0,0458
Hex:AcOEt 55%	AA7.33 ⁽²⁸⁻³³⁾	0,472
Hex:AcOEt 60%	AA7.39 ⁽³³⁻³⁹⁾	0,490
TOTAL		1,2795

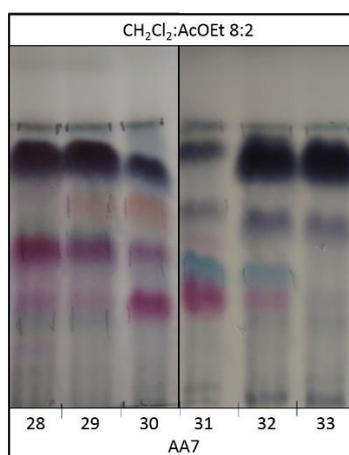


Figura 19: CCD das frações AA7.28 a AA7.33 antes de serem agrupadas. Eluente: CH_2Cl_2 :AcOEt (8:2 v/v). Revelador: Vanilina Sulfúrica 5%

3.8.6 Estudo da fração AA7.33

A fração AA7.33 foi encaminhada para análise do perfil cromatográfico em CLAE. Devido ao perfil do cromatograma analítico obtido (figura 20), altura e distância dos picos, essa fração foi submetida a um novo fracionamento em CLAE-semipreparativo com o intuito de se isolar as substâncias majoritárias.

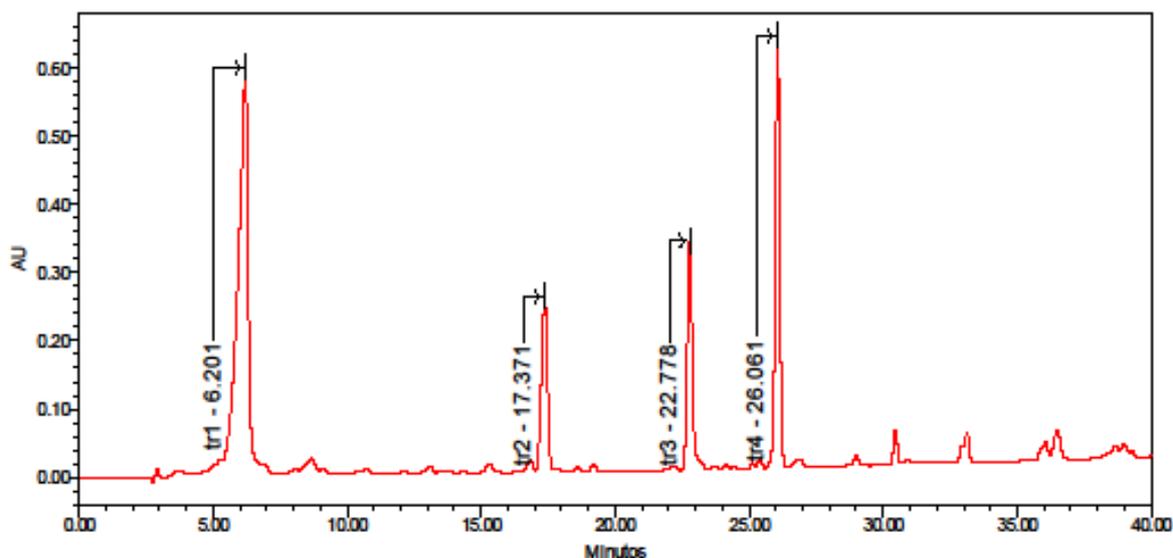


Figura 20: Perfil cromatográfico da fração AA7.33 220 nm em CLAE-PDA, e os tempos de retenção dos picos majoritários. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

As condições estabelecidas para as eluições semipreparativas foram:

- Fluxo 7 mL/min
- Fase móvel isocrática 35% de água purificada (0,1% H₃PO₄) e 65% MeOH (HPLC)
- Tempo de eluição de 20 minutos

As frações coletadas foram bem estreitas para evitar a presença de impurezas associadas a pequenas porções de outros compostos. Este procedimento diminui o rendimento, mas aumenta a pureza do composto. Após a coleta os solventes foram rotaevaporados e novamente as frações foram submetidas a uma nova eluição em CLAE analítico para obtenção de seus perfis químicos.

3.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

Os extratos brutos AAF e AAR, o óleo essencial OEAA bem como a substância, foram avaliados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Os ensaios esquistossomicidas foram realizados no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, sob a coordenação e responsabilidade do Dr. Josué de Moraes.

3.9.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni*

A linhagem de *S. mansoni* Sambon, 1907 utilizada neste trabalho foi a BH (Belo Horizonte, MG), mantida no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP) como previamente descrito por DE MORAES (2012a). Os parasitos foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (hospedeiro definitivo).

3.9.2 Manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni*

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com PELLEGRINO & KATZ (1968). Os hamsters infectados foram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada dos ovos infectados do fígado e posterior obtenção dos miracídios. Os fígados foram triturados em liquidificador em solução salina 0,85% (m/v), e a suspensão dos tecidos homogeneizados foi deixada para sedimentação no escuro. O sedimento foi suspenso com água declorada e exposto à luz para obtenção dos miracídios. O número e a viabilidade dos miracídios e cercárias foram determinados com o auxílio de um estereomicroscópio.

Para a infecção do hospedeiro intermediário, *B. glabrata*, foram utilizados 8 miracídios por caramujo e após 35 a 40 dias, estes foram expostos à luz artificial para a eliminação das cercárias.

Cerca de 150 cercárias foram inoculadas nos camundongos por via subcutânea e após aproximadamente 45 dias, os vermes adultos foram

recuperados do sistema porta hepático por perfusão como descrito por SMITHERS & TERRY (1965).

3.9.3 Preparo das amostras para o ensaio

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido 100% (DMSO, *Merck*) e posteriormente, adicionou-se meio “Roswell Memorial Park Institute” (RPMI 1640), esterilizado por filtração, para obter a concentração de 200 µg/mL dos extratos brutos, em DMSO 0,5% (v/v). O praziquantel 1 µg/mL ou 3 µM (*Merck*), preparado nas mesmas condições, foi utilizado como controle positivo.

3.9.4 Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Na placa de Petri, os pares de vermes obtidos dos hamsters, por perfusão, foram lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 U/mL, estreptomicina 200 µg/mL e anfotericina B 2 µg/mL (Cultilab).

Posteriormente, os parasitos acasalados foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo 1 casal de verme, por poço, em 2 mL do meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich) (DE MORAES *et al.*, 2011; 2012b; 2013a; 2013b).

Diferentes concentrações das amostras foram diluídas no meio de cultura antes da adição dos parasitos, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. O praziquantel (1 µg/mL ou 3 µM) foi utilizado como controle positivo e os poços contendo somente meio de cultura, RPMI 1640, e meio com DMSO 0,5% foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific-Revco®) e foram monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon).

3.9.5 Viabilidade de adultos de *Schistosoma mansoni* em presença dos extratos brutos, óleo essencial e substância isolada

Para avaliar a toxicidade dos extratos AAF e AAR sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), contração muscular e alterações morfológicas no tegumento (MORAES, 2012b). Para o OEAA e substância isolada foram avaliados a taxa de mortalidade e a redução da atividade motora.

A redução da atividade motora e as alterações morfológicas no tegumento foram qualitativamente avaliadas como “leve” ou “significativa”. No primeiro caso utilizou-se um estereomicroscópio, enquanto que, no segundo, um microscópio invertido, usando técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Um resumo das etapas executadas com o objetivo de isolar os metabólitos secundários das folhas de *A. absinthium* L., bem como as amostras que foram encaminhadas para os ensaios esquistossomicidas é mostrado no fluxograma a seguir (figura 21).

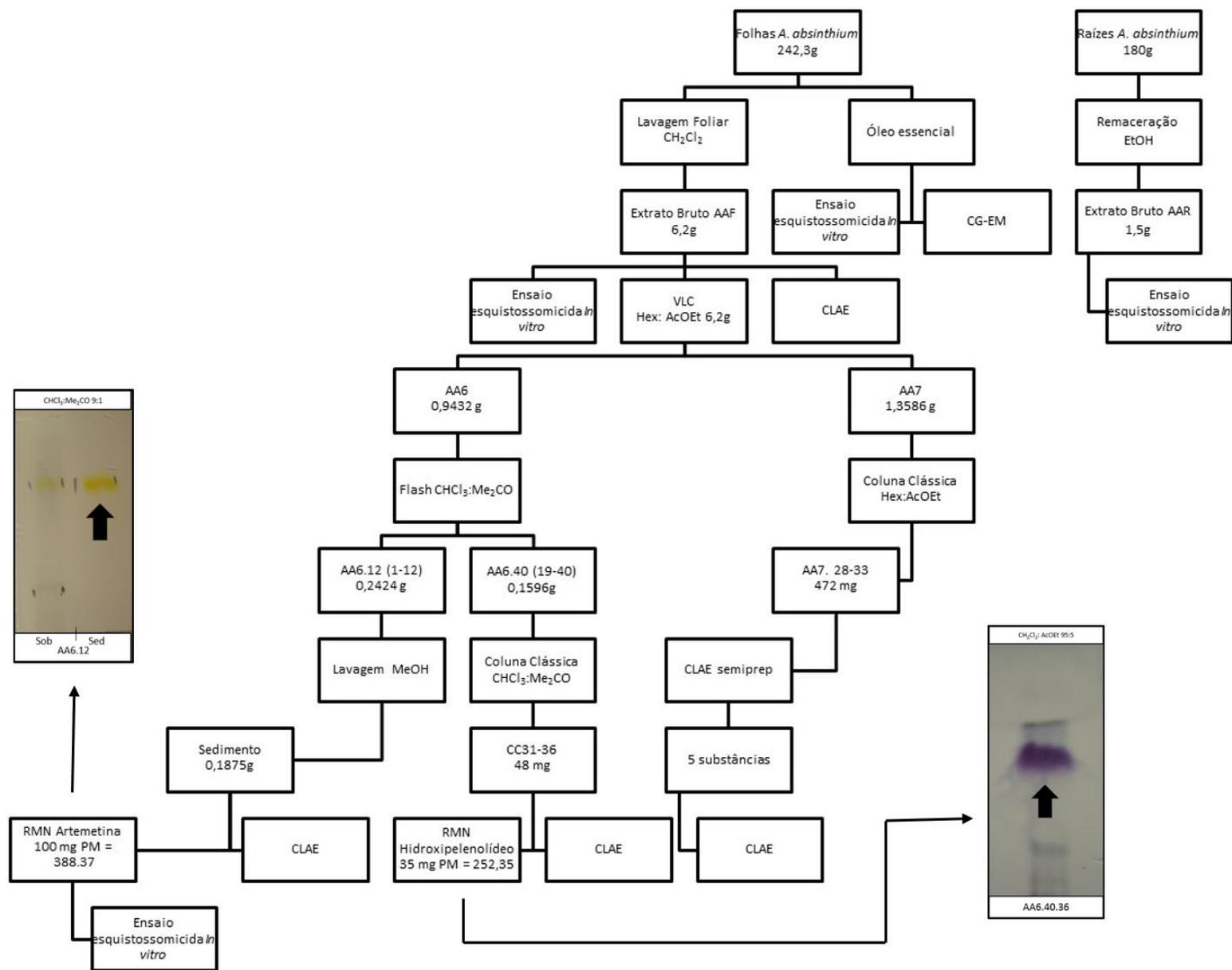


Figura 21: Fluxograma demonstrando as etapas realizadas para o isolamento de substâncias (AAF) e as amostras encaminhadas para ensaio esquistossomicida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, os extratos brutos das folhas e raízes foram produzidos e, em seguida, os mesmos foram submetidos à avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*, no intuito de identificar o extrato mais ativo frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. De acordo com os resultados obtidos, o extrato AAF apresentou melhor atividade esquistossomicida e, por isso, foi selecionado para dar continuidade ao processo de isolamento e identificação de seus constituintes.

4.1 ANÁLISE EM CLAE DO EXTRATO AAF

Extratos brutos vegetais podem ser analisados com sucesso utilizando-se uma técnica hifenada apropriada. Dentre essas técnicas, a CLAE-PDA também conhecida como LC-PDA é um método bastante adequado. A CLAE-PDA é extremamente útil para a análise de produtos naturais que possuem grupos cromóforos, tais como substâncias fenólicas, incluindo flavonoides, cumarinas e outros metabólitos (SARKER & NAHAR, 2012).

O perfil cromatográfico do AAF a 254 nm é representado no cromatograma da figura 22a bem como o espectro no UV dos picos majoritários e seus respectivos tempos de retenção (Tr) na figura 22b.

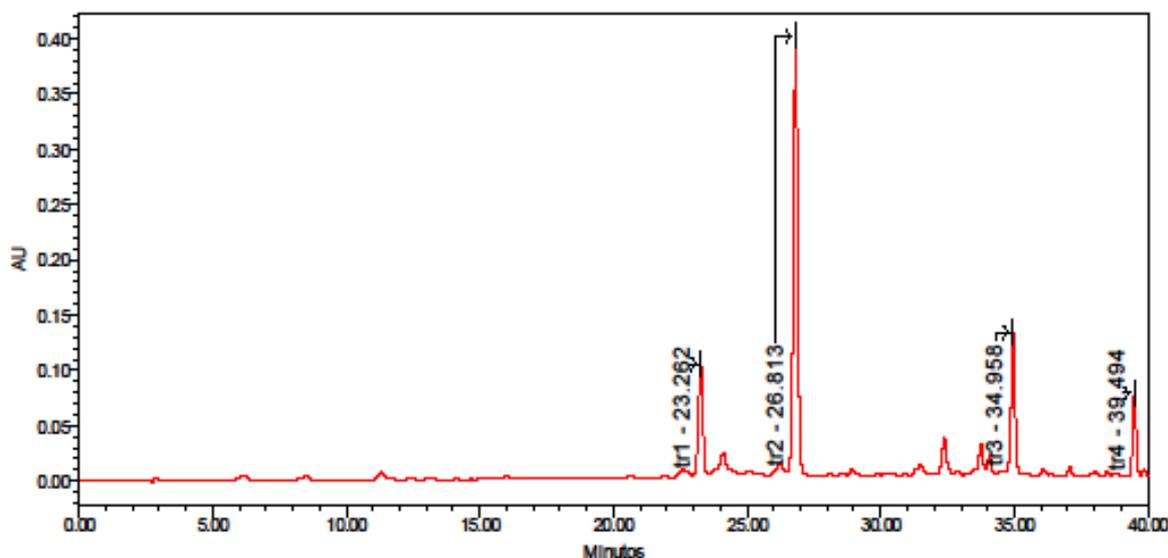


Figura 22a: Perfil cromatográfico do AAF, obtido a 254 nm em CLAE-PDA, e os tempos de retenção dos picos majoritários. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) e fluxo de 1mL/min.

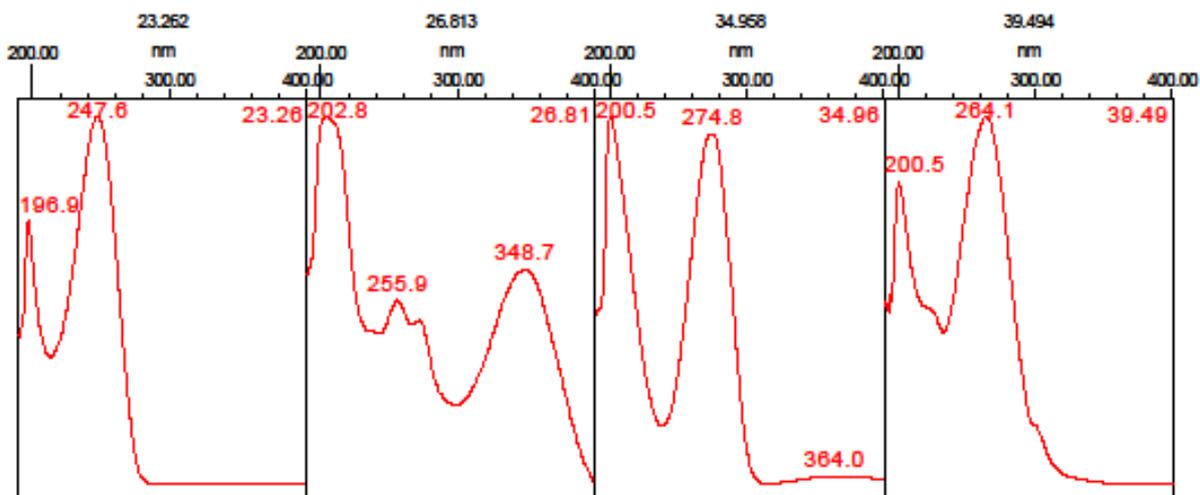


Figura 22b: Espectro no UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção, 23,262; 26,813; 34,958 e 39,494 minutos.

A análise do cromatograma da figura 22a demonstra a presença de substâncias mais apolares no extrato. É possível observar a presença de 4 picos mais proeminentes nos Trs 23,262; 26,813; 34,958 e 39,494 minutos. No Tr 26,813 se encontra a substância majoritária do extrato AAF. As análises dos espectros no UV (figura 22b) permitem inferir a presença de uma LST no Tr de 23,262 minutos [UV máx: 254 nm (SCHORR & DA COSTA, 2005)] e de flavonoides nos Tr 26,813; 34,958 e 39,494 minutos [banda II UV máx: 260-280 nm, banda I UV máx: 320-370 (GOBBO-NETO & LOPES, 2008)].

4.2 PERFIL EM CLAE, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E COMPARATIVO DOS PERFIS ANALÍTICOS COM O EXTRATO AAF

4.2.1 Substância AA6.12₍₁₋₁₂₎

Em função do perfil obtido em CCD, o sedimento da fração **AA6.12₍₁₋₁₂₎** foi encaminhado para análise do perfil cromatográfico em CLAE-PDA e elucidação estrutural por RMN.

O cromatograma obtido na análise em CLAE-PDA (figura 23a) demonstrou a presença de um pico isolado, nas condições cromatográficas analisadas, no Tr de 26,845 minutos. O espectro no UV é apresentado na figura 23b.

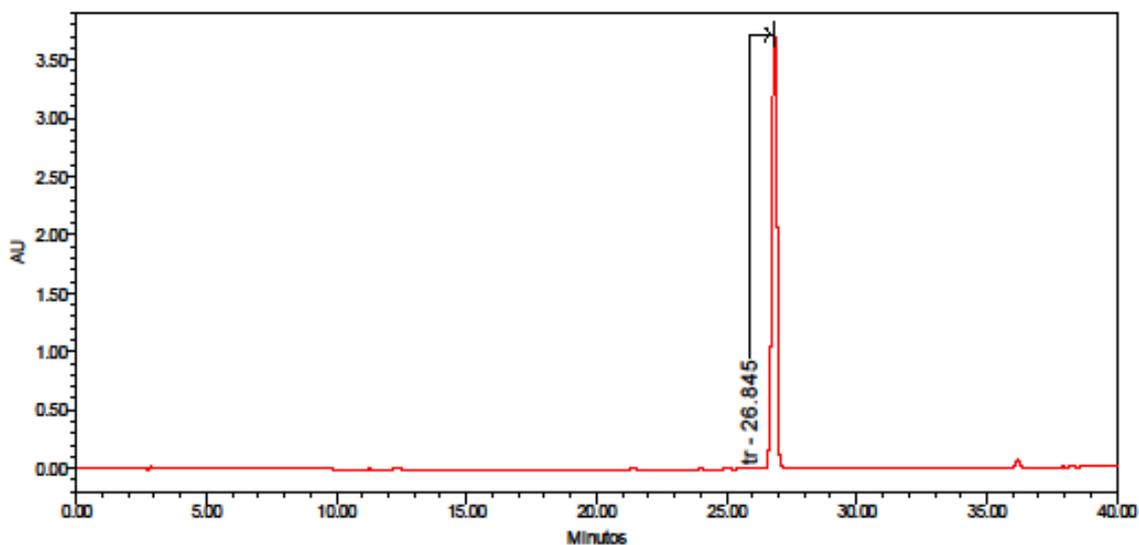


Figura 23a: Perfil cromatográfico da substância isolada da subfração AA6 a 220 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

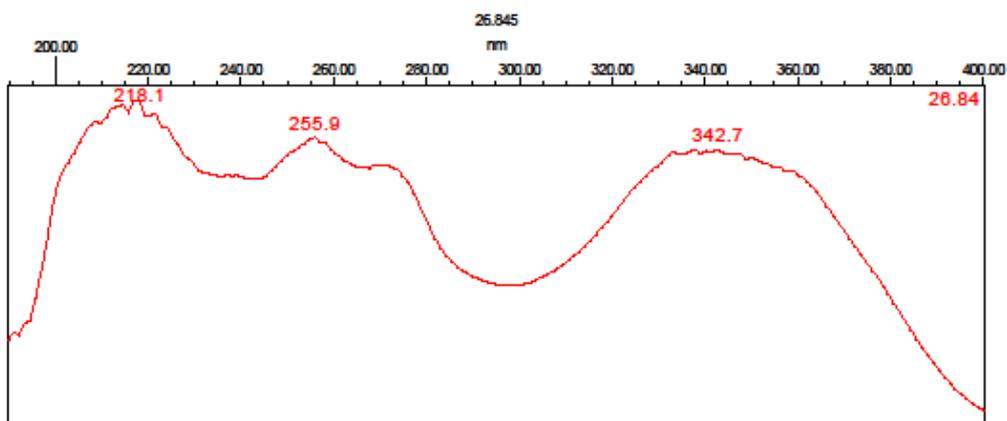


Figura 23b: Perfil no UV do pico no tempo de retenção 26,845 minutos.

A análise do espectro no UV obtido no Tr 26,845 minutos e a coloração amarela da substância visualizada em CCD mesmo antes de aplicar o revelador, permitem sugerir que a substância isolada da fração **AA6.12**₍₁₋₁₂₎ seja um flavonoide.

O espectro de RMN de ¹H desta substância (tabela 8 e figura 28) evidencia a presença de 5 simpletos, integrados cada um para 3H cada, na região de δ 3,85-3,95 ppm (figura 24). Estes sinais foram atribuídos a hidrogênios de grupos metoxilas (figura 27), já vez que os mesmos ocorrem como simpletos nessa faixa de deslocamento químico (PAVIA, 2010). Por outro lado, o simpleto observado em δ 6,48 ppm (figura 25), integrado para 1H, foi atribuído ao H-8 do anel aromático A (figura 27), uma vez que não acopla com nenhum outro hidrogênio do anel. Esse padrão de substituição é indicativo de que esse anel aromático A seja pentasubstituído. Já o duplete em δ 6,97 ppm (figura 25), integrado para 1H, foi atribuído ao H-3' (figura 27) do anel aromático B, em função da sua constante de acoplamento ($J = 8,5$ Hz), a qual é típica de acoplamento *orto*, sendo este acoplamento observado com o H-2', o qual ocorre como um duplo duplete em δ 7,70 ppm ($J = 8,5$ e 2,0 Hz) (figura 26). O hidrogênio H-6', por sua vez, ocorre como um duplete em δ 7,66 ppm (figura 26) e acopla em posição *meta* ($J = 2,0$ Hz) com o H-2'. Esse padrão de hidrogênios sugere que esse anel aromático B seja trissubstituído (figura 32) (PAVIA, 2010).

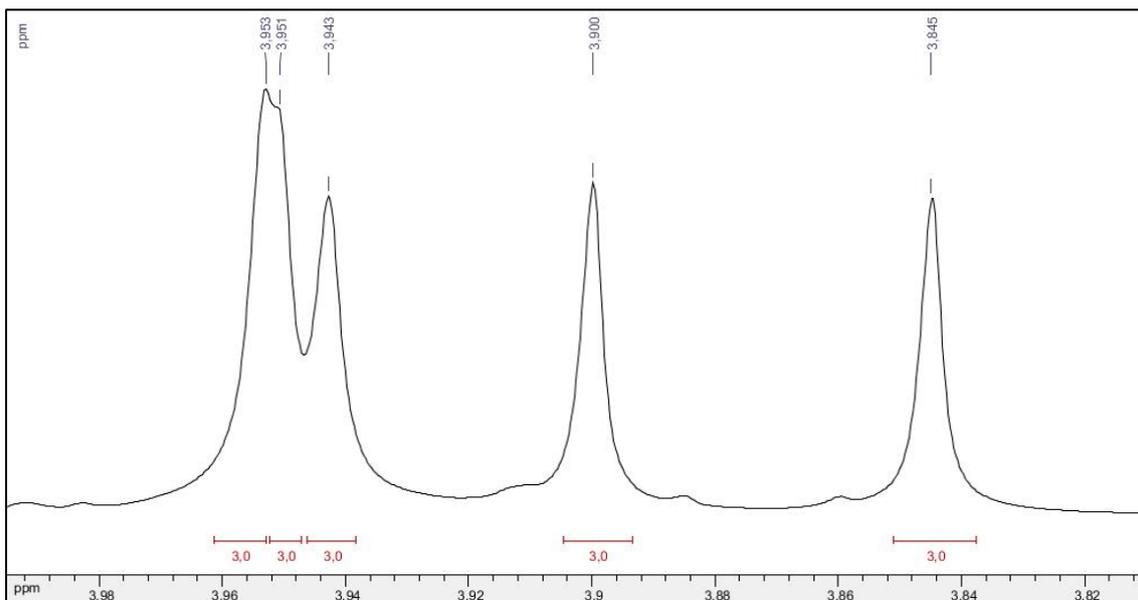


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da **AA6.12(1-12)** (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=3,85\text{-}3,95$ ppm)

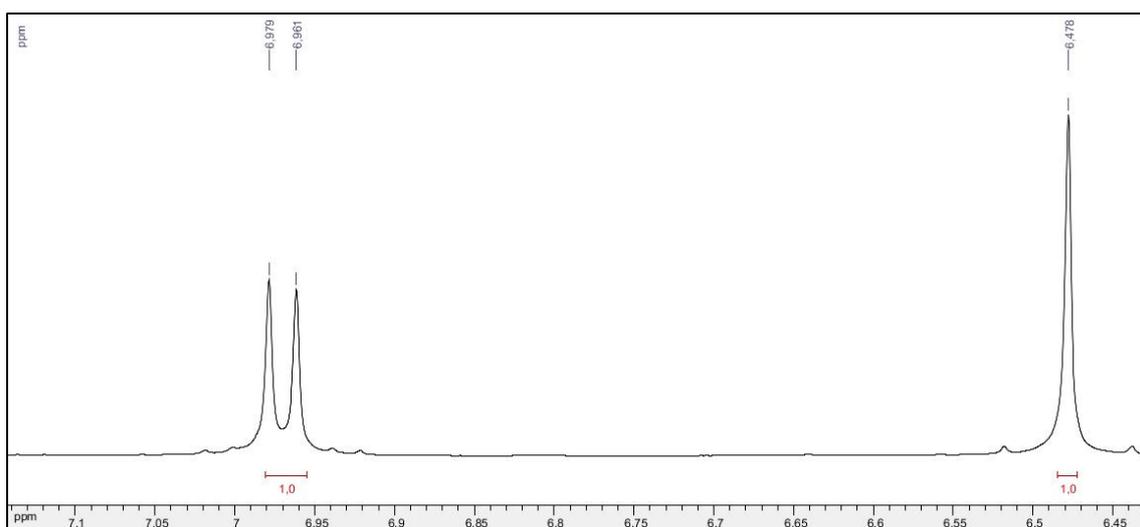


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H da **AA6.12(1-12)** (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=6,48\text{-}6,97$ ppm)

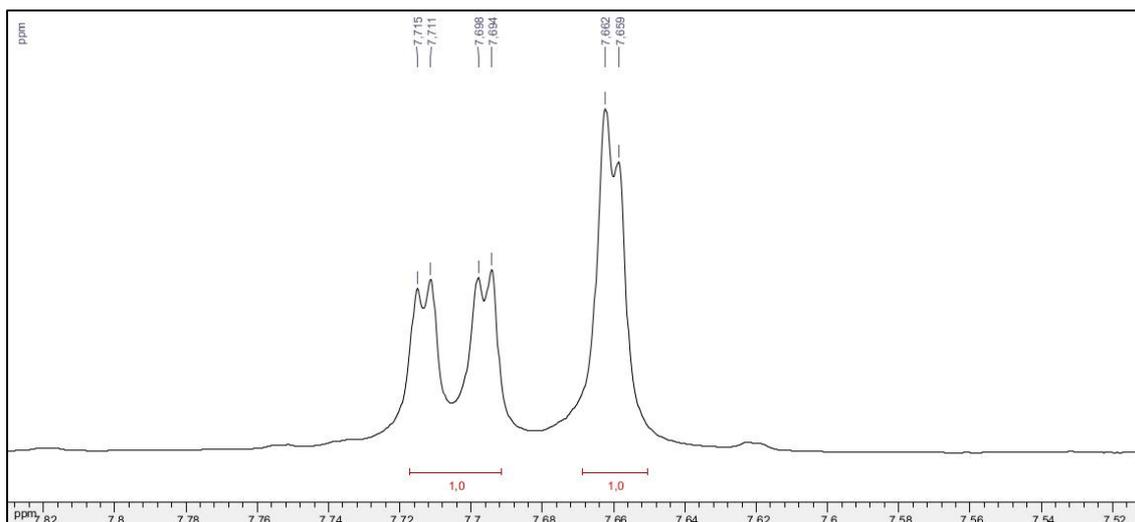


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H da **AA6.12(1-12)** (CDCl_3 , 500MHz). Expansão dos sinais de hidrogênios ($\delta=6,66\text{-}7,70$ ppm)

O espectro de RMN de ^{13}C (tabela 9 e figura 29), evidencia a presença de 20 carbonos magneticamente distintos. Em função do deslocamento, foi possível observar a presença de um grupo carbonila em δ 179 ppm e de pelo menos 5 carbonos ligados a oxigênio na região entre δ 56,1 a 61,0 ppm (PAVIA, 2010).

A análise dos dados espectroscópicos obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C , aliada aos dados oriundos da literatura (YOSHIOKA *et al.*, 2004), permitem inferir que a substância **AA.6.12(1-12)** refere-se à flavona artemetina (5-hidroxi-3,6,7,4',5' -pentametoxiflavona) (Figura 27).

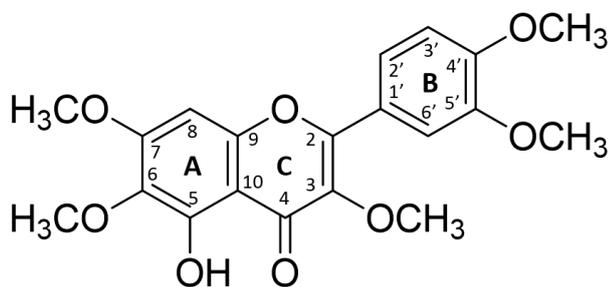


Figura 27: Estrutura Química da Artemetina

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H da **AA6.12(1-12)** e dados da Artemetina descritos na literatura

Hidrogênios	Dados Obtidos (CDCl_3 , 500MHz)	Referência
	Deslocamento Químico δ =PPM Integral Multiplicidade Constante de Acoplamento J = Hz	YOSHIOKA <i>et al.</i> , 2004 (CDCl_3 , 500MHz)
4' OCH_3	3,85 (3H; s)	3,86 (3H; s)
5' OCH_3	3,89 (3H; s)	3,87 (3H; s)
7 OCH_3	3,94 (3H; s)	3,93 (3H; s)
6 OCH_3	3,95 (3H; s)	3,95 (3H; s)
3 OCH_3	3,95 (3H; s)	3,97 (3H; s)
8	6,48 (1H; s)	6,51 (1H; s)
3'	6,97 (1H; d; 8,5)	6,99 (1H; d; 8,5)
6'	7,66 (1H; d; 2,0)	7,69 (1H; d; 2,1)
2'	7,70 (1H, dd; 8,5; 2,0)	7,74 (1H; dd; 8,5; 2,1)

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C da AA6.12(1-12) e dados da Artemetina descritos na literatura

Carbono	Dados Obtidos (CDCl_3 , 125 MHz)	Referência
	Deslocamento Químico δ =PPM	YOSHIOKA <i>et al.</i> , 2004 (CDCl_3 , 125 MHz)
OCH_3	56,1	55,9
OCH_3	56,5	56,0
OCH_3	56,4	56,3
OCH_3	60,2	60,1
OCH_3	61,0	60,8
8	90,4	90,3
10	106,5	106,5
3'	111,0	110,8
2'	111,3	111,1
1'	122,2	122,1
6'	123,0	122,8
6	132,3	132,2
3	139,0	138,8
5'	149,0	148,7
4'	151,4	151,3
9	152,3	152,3
5	152,8	152,7
2	156,0	155,8
7	159,0	158,7
4	179,0	178,8

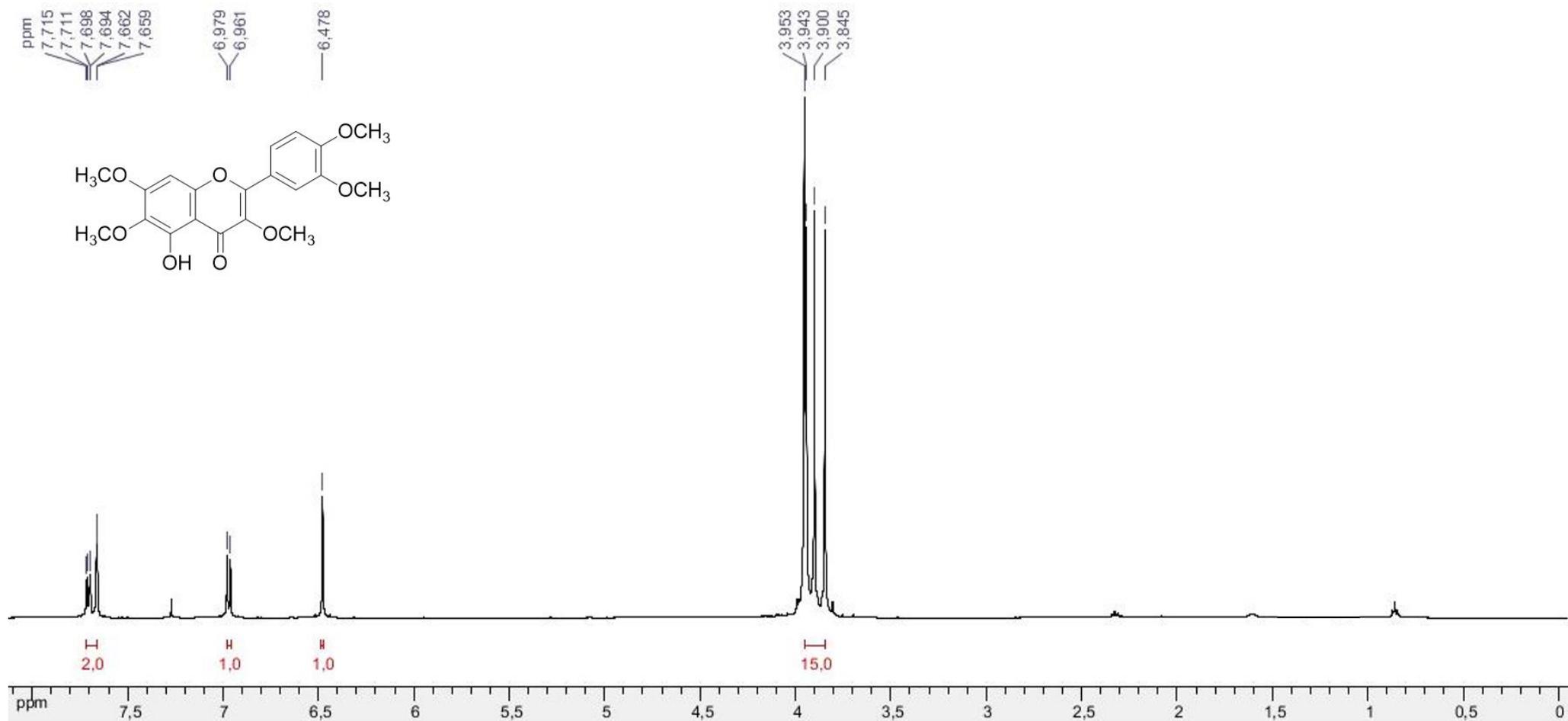


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da AA6.12(1-12) (CDCl_3 , 500MHz).

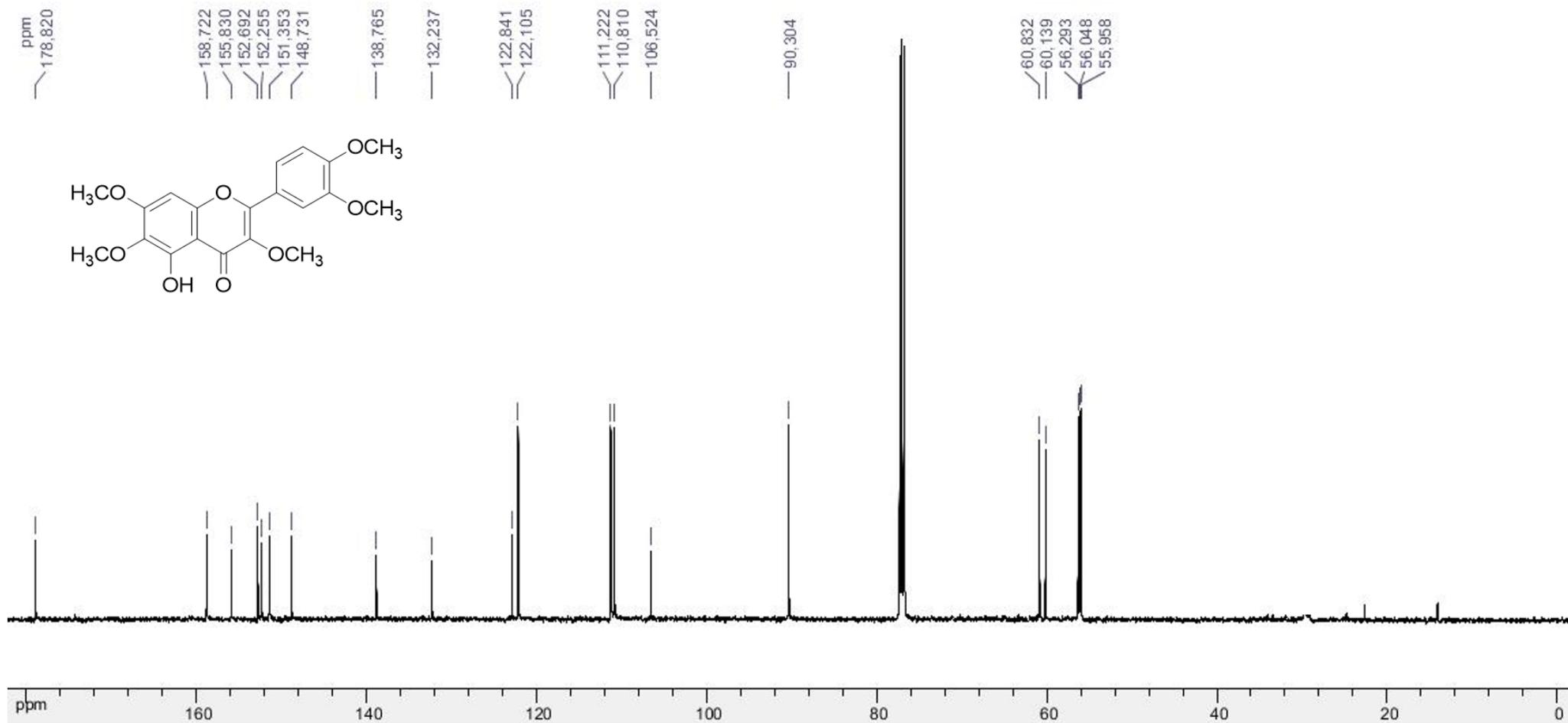


Figura 29: Espectro de RMN de ¹³C da AA6.12(1-12) (CDCl₃, 125MHz).

Com relação ao metabólito identificado, a artemetina é uma flavona que já foi isolada de várias outras espécies vegetais. BENYAHIA *et al.* (2014) a isolou a partir das partes aéreas da *Artemisia arborescens*; ANSHUL *et al.* (2013) e BILIA *et al.* (2006) da *Artemisia annua* também das partes aéreas; YOSHIOKA *et al.* 2004 das folhas de *Vitex rotundifolia*; DE SOUZA *et al.* (2011) das partes aéreas de *Achillea millefolium* e HUANG *et al.* (2013) das folhas e galhos de *Vitex trifolia*.

As flavonas exibem grande diversidade de atividades biológicas em função da sua particular habilidade de modular vários sistemas enzimáticos (KOIRALA *et al.*, 2014; VERMA & PRATAP, 2012).

A respeito das atividades biológicas da artemetina, DE SOUZA *et al.* (2011) avaliaram o efeito hipotensor da artemetina *in vivo*. Este flavonoide foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente a pressão arterial dos animais. Os autores sugerem que a diminuição da pressão arterial observada ocorre em função da habilidade da artemetina em inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) e conseqüentemente diminuir os níveis de angiotensina II.

HUANG *et al.* (2013) avaliaram a citotoxicidade da artemetina sobre três linhagens de células cancerígenas humanas, PANC-1 (pancreáticas), K562 (leucêmicas) e BxPC-3 (pancreáticas de adenocarcinoma). Essa substância se mostrou inativa frente a essas células. A baixa citotoxicidade foi explicada em função da ausência de um grupo hidroxila na posição 5', uma vez que a casticina substância também avaliada se mostrou altamente citotóxica e sua estrutura química só se diferencia da artemetina pela presença de uma hidroxila nessa posição.

A artemetina juntamente com outros flavonoides presentes na *Artemisia annua* apresentou atividade frente à larva *Helicoverpa armigera*. Esta é uma praga que prejudica o cultivo de uma vasta gama de 300 espécies de plantas, incluído plantas ornamentais, medicinais e alimentícias. Essa mistura flavonoídica tem sido apontada como candidata a um possível biopesticida (ANSHUL *et al.*, 2013).

MARTINS *et al.* (2014), WEATHERS *et al.* (2012) e BILIA *et al.* (2006) relatam que alguns flavonoides, incluindo a artemetina, têm demonstrado efeito sinérgico com artemisinina contra *Plasmodium falciparum*. Além disso, de acordo com AKKARI *et al.* (2014) e FERREIRA *et al.* (2011) ensaios *in vitro*

sugerem que alguns flavonoides possam também apresentar propriedades antihelmínticas.

Através das análises em CLAE foi possível observar que a artemetina é a substância majoritária do extrato AAF. A figura 30 compara o perfil cromatográfico, obtido nas mesmas condições analíticas, da artemetina (linha vermelha) em relação ao extrato AAF (linha preta), o qual deixa explícito a abundância da artemetina em relação as outras substâncias encontradas no extrato.

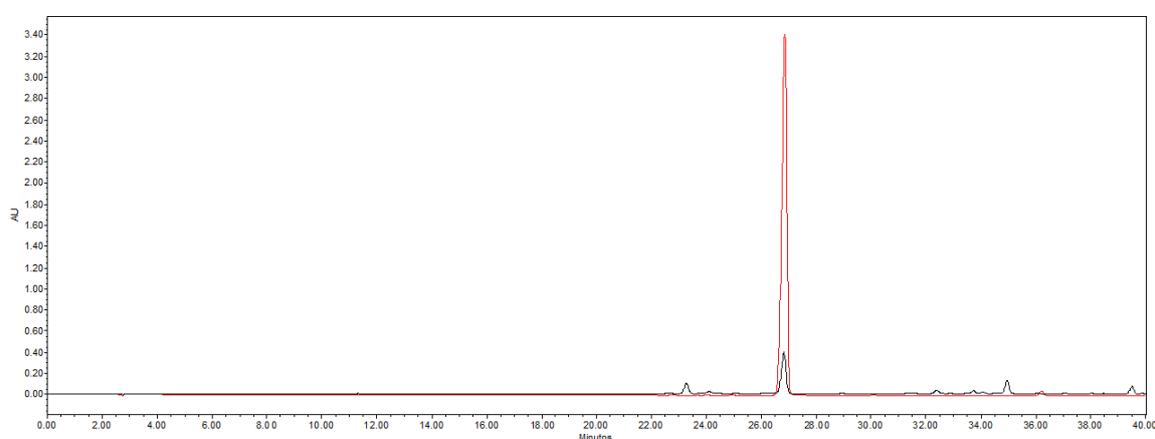


Figura 30: Comparativo entre perfil cromatográfico da artemetina (linha vermelha) e o extrato AAF (linha preta) a 220 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

Assim, tendo em vista a atividade esquistossomicida apresentada pelo extrato AAF, a artemetina substância majoritária, foi submetida à avaliação *in vitro* frente ao *S. mansoni* pela primeira vez.

4.2.2 Substância AA6.40.36⁽³¹⁻³⁶⁾

Em função do perfil obtido em CCD a fração **AA6.40.36**, mostrou-se com adequado grau de pureza e foi encaminhada para análise do perfil cromatográfico em CLAE-PDA e elucidação estrutural por RMN.

O cromatograma obtido na análise em CLAE-PDA (figura 31a) demonstrou a presença de um pico majoritário, nas condições cromatográficas analisadas, com Tr de 19.941 minutos. O espectro no UV é apresentado na figura 31b.

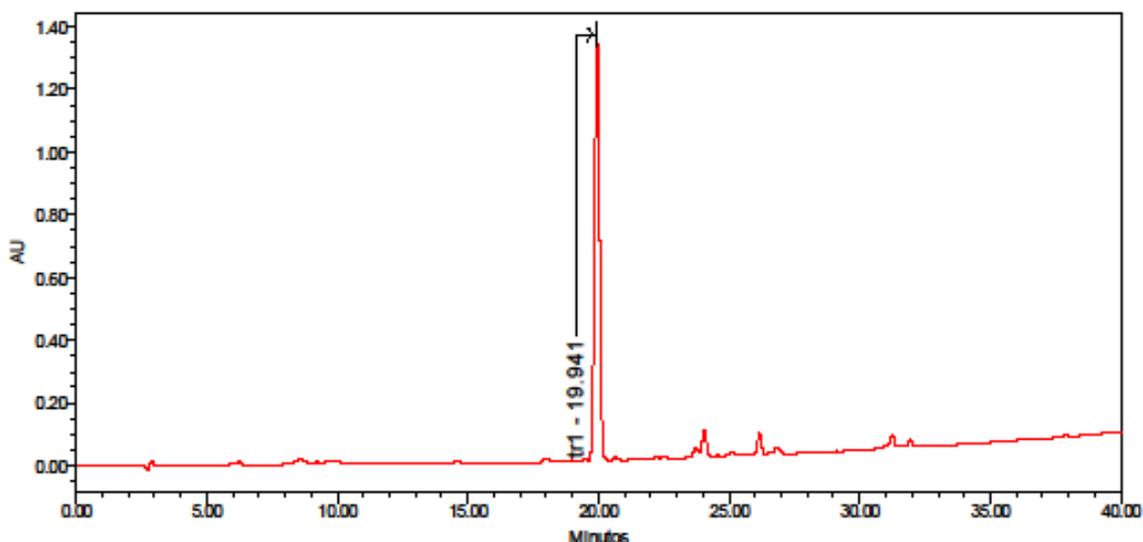


Figura 31a: Perfil cromatográfico da substância majoritária da subfração AA6.40.36 a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

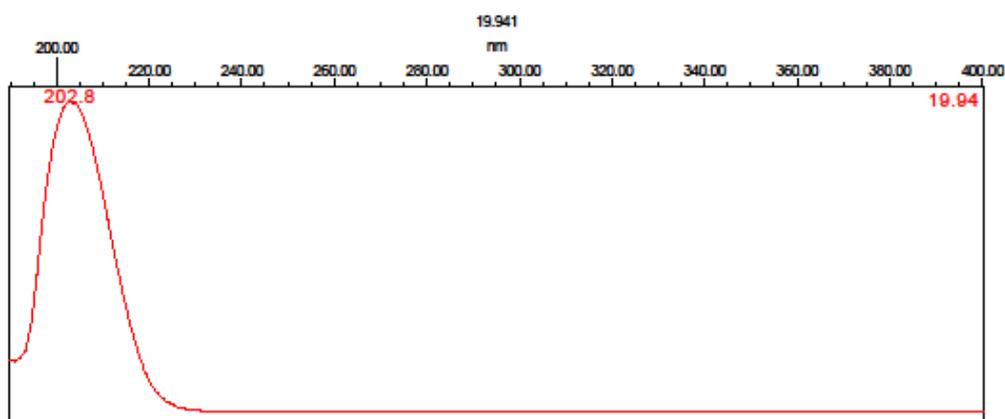


Figura 31b: Perfil no UV do pico no tempo de retenção 19,941 minutos.

A análise do espectro no UV, obtido no Tr 19,941, juntamente com a análise quimiosistemática, permitem sugerir que a substância majoritária da fração **AA6.40.36** trata-se de uma lactona.

No espectro de RMN de ¹H (figura 35 e tabela 10) pode-se observar a presença de dois dupletos, integrados para 3H cada, em δ 0,99 e 1,13 ppm,

além de um simpleto (3H) em δ 1,68 ppm (figura 32), sendo estes sinais característicos de hidrogênios metílicos e atribuídos, respectivamente aos hidrogênios H-15, H-13 e H-14. O multipletto em δ 1,49 ppm e o simpleto largo em δ 1,63 ppm (figura 33), ambos integrados para 1H cada, foram atribuídos aos hidrogênios H-8a e H-8b (figura 34). O tripleto de dupletos observado em δ 2,07 ppm ($J = 13,0$ e $2,5$ Hz), integrado para 1H, foi atribuído a um dos hidrogênios metilênicos de H-9a (figura 34), sendo que o segundo hidrogênio metilênico de H-9b ocorre como um multipletto em δ 2,28 ppm (figura 33). O tripleto encontrado em δ 2,15 ppm ($J = 10$ Hz) (figura 33), integrado para 1H, foi designado ao H-7 (figura 34). O multipletto em δ 2,30 ppm (1H) e o tripleto em δ 2,42 ppm (1H, $J = 11,5$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-2a e H-2b. Por outro lado, o multipletto em δ 2,79 (figura 33), integrado para 1H, foi atribuído ao H-11, enquanto os dois simpletos em δ 4,03 e 4,09 ppm (1H cada) foram designados para os hidrogênios metínicos H-3 e H-6, respectivamente.

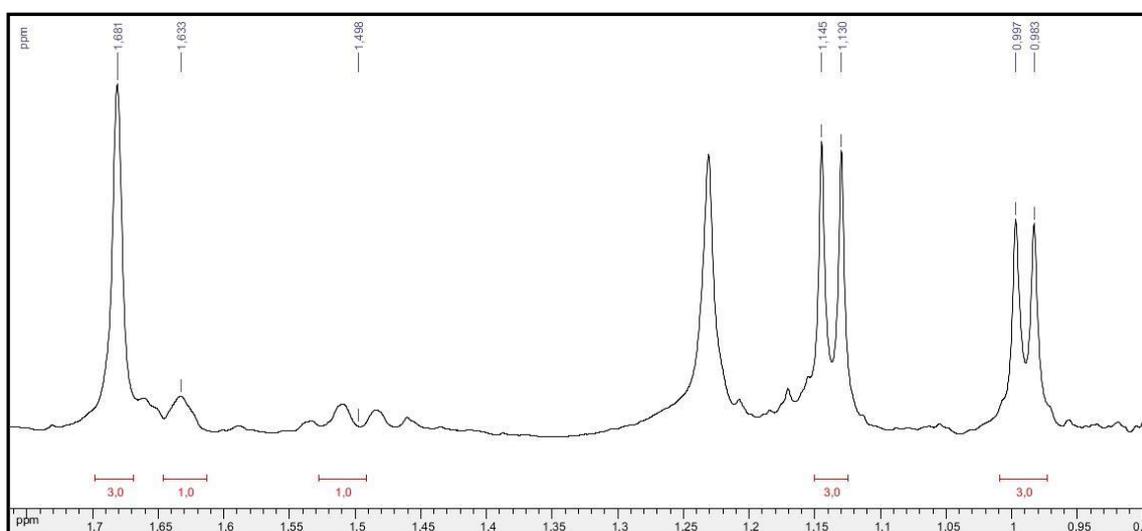


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36. Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=0,99-1,68$)

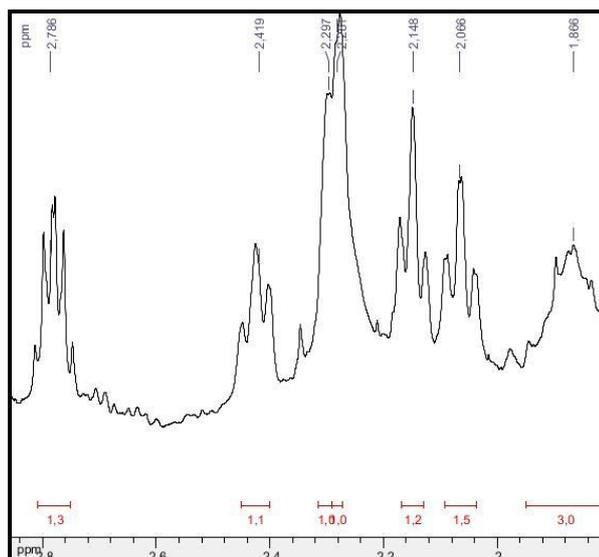


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36. Expansão dos sinais dos hidrogênios ($\delta=1,86\text{-}2,07$)

O espectro de RMN de ^{13}C (tabela 11, figura 36), evidencia a presença de sinal típico para carbonila em δ 180,3 ppm, atribuído ao C-12 (figura 34). Sinais típicos de carbonos olefínicos foram observados em δ 123,1 e 136,1 ppm, os quais foram atribuídos ao C-1 e C-10, respectivamente.

A análise destes espectros e comparação com dados obtidos da literatura (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012), permitem concluir que a substância isolada seja o hidroxipelenólídeo (figura 34).

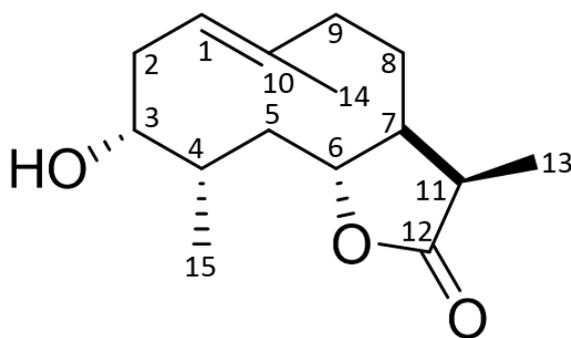


Figura 34: Estrutura química do Hidroxipelenólídeo

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H da substância **AA6.40.36** e dados do Hidroxipelenolídeo descritos na literatura

Hidrogênios	Dados Obtidos (CDCl_3 , 500MHz)	Referência
	Deslocamento Químico δ =PPM Integral Multiplicidade Constante de Acoplamento J = Hz	(CDCl_3 , 500MHz) GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 2012
15	0,99 (3H; d; 7,0)	0,98 (3H; d; 7,1)
13	1,13 (3H; d; 7,5)	1,13 (3H; d; 7,5)
8a	1,49 (1H; m)	1,49 (1H; dtd; 14,0; 12,6 e 2,8)
8b	1,63 (1H; s)	1,64 (1H; dtd; 14,0; 4,1 e 2)
14	1,68 (3H; s)	1,68 (3H; s)
4 e 5	1,87 (3H; m)	1,85 (3H; s)
9a	2,07 (1H; td; 13,0 e 2,5)	2,06 (1H; td; 12,8 e 3,2)
7	2,15 (1H; t; 10,0)	2,14 (1H; tt; 10,2 e 2,4)
9b	2,28 (1H; m)	2,28 (1H; m)
2a	2,30 (1H; m)	2,30 (1H; m)
2b	2,42 (1H; t; 11,5)	2,41 (1H; ddd; 13,6; 10,5 e 2,7)
11	2,79 (1H; m)	2,77 (1H; m)
3	4,03 (1H; s)	4,02 (1H; s)
6	4,09 (1H; s)	4,08 (1H; s)
1	5,51 (1H; s)	5,51 (1H; s)

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C da **AA6.40.36** e dados do Hidroxipelenolídeo descritos na literatura

Carbono	Dados Obtidos (CDCl_3 , 125 MHz)	Referência
	Deslocamento Químico δ =PPM	GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 2012 (CDCl_3 , 125 MHz)
13	11,1	10,7
14	16,6	16,3
15	19,3	19,3
8	27,4	27,3
2	34,3	34,4
11	37,1	37,0
5	38,2	38,6
4	40,4	40,2
9	40,7	40,4
7	47,3	47,3
3	73,3	73,6
6	86,0	86,1
1	123,1	123,3
10	136,1	135,8
12	180,3	179,4

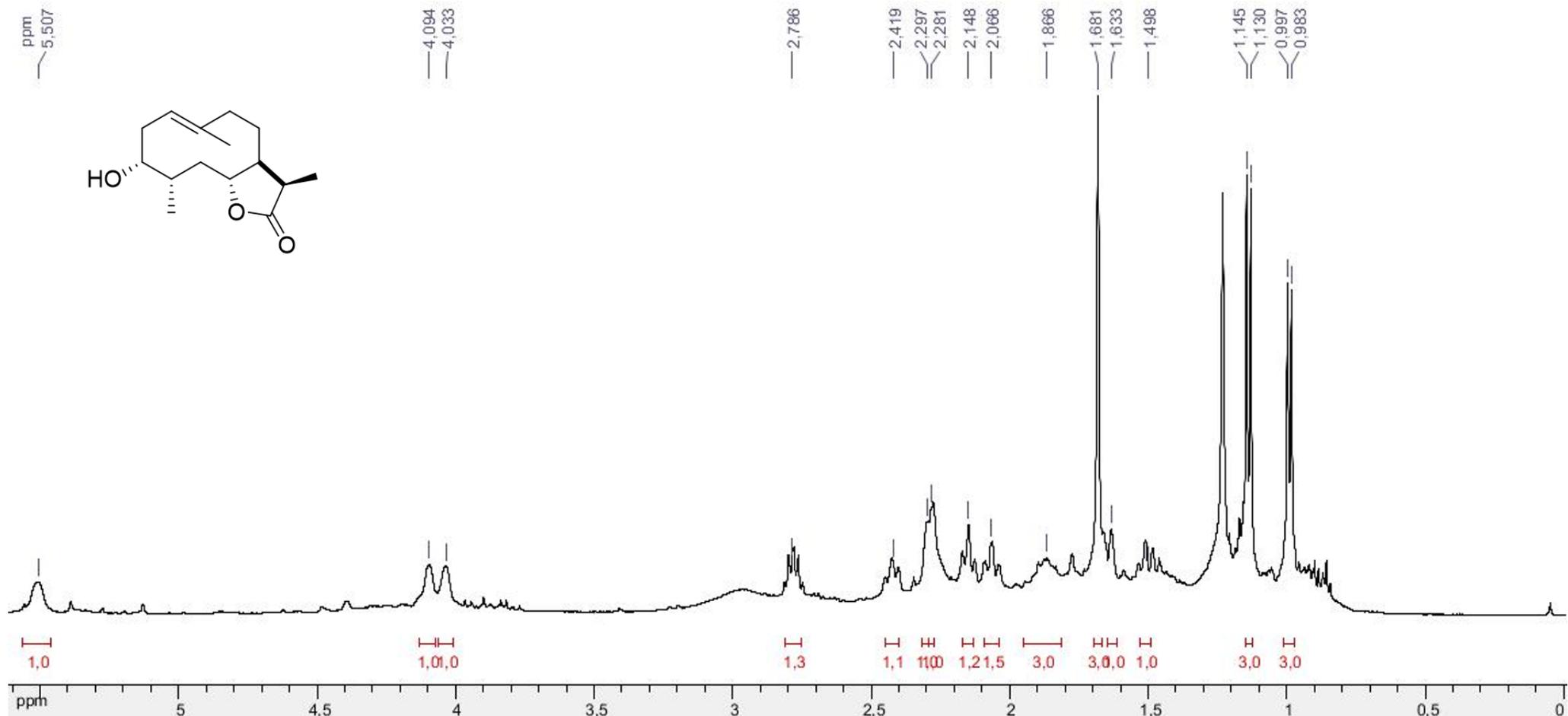


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H da AA6.40.36 (CDCl_3 , 500MHz).

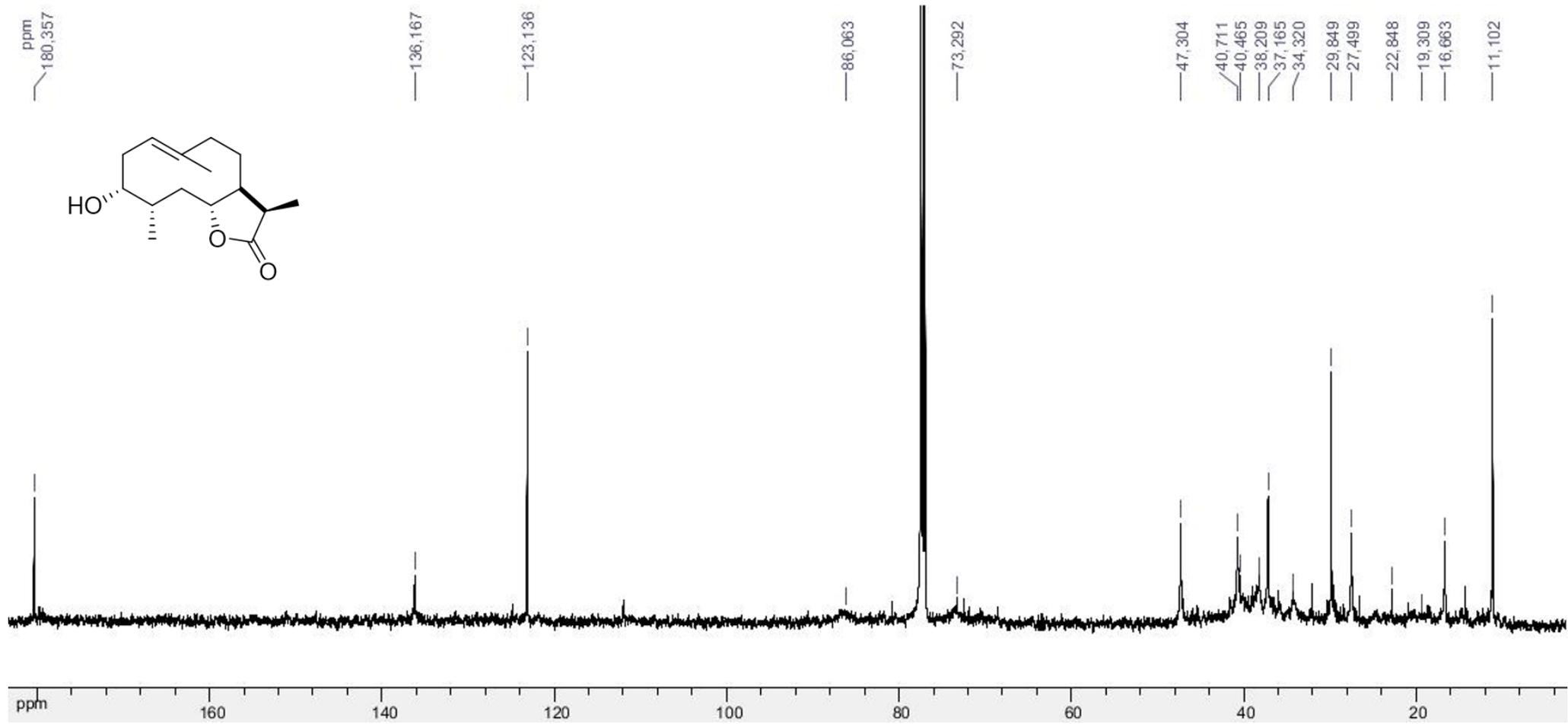


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C da AA6.40.36 (CDCl_3 , 125MHz).

O hidroxipelenolídeo também já foi isolado por outros pesquisadores das partes aéreas de *A. absinthium* L. (ARAI *et al.*, 2013; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012 e MARTÍN *et al.*, 2011).

O hidroxipelenolídeo é uma lactona sesquiterpênica (LST) pertencente à classe dos Germacranolídeos (figura 37) (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012). De acordo com CHATURVEDI, (2011) uma planta normalmente produz um único tipo de esqueleto de LST.

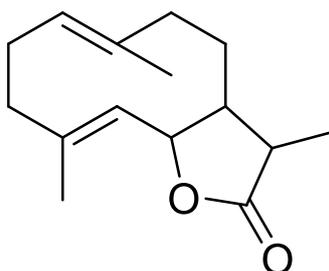


Figura 37: Estrutura química do esqueleto de germacranolídeo

Não há relatos na literatura a respeito de qualquer atividade biológica apresentada pelo hidroxipelenolídeo. As atividades biológicas atribuídas para a maioria das lactonas sesquiterpênicas ocorrem em grande parte em função de propriedades alquilantes de grupos α -metileno- γ -lactonas, e de insaturações α , β no anel de ciclopentano (figura 38) (CHATURVEDI, 2011; FISHER *et al.*, 1998). Na presença de biomoléculas contendo aminoácidos nucleofílicos ou resíduos de guanina, essas regiões das LST atuam como um aceptor de Michael, formando adutos estáveis (GHANTOUS *et al.*, 2010). Entretanto, essas estruturas não são encontradas no hidroxipelenolídeo.

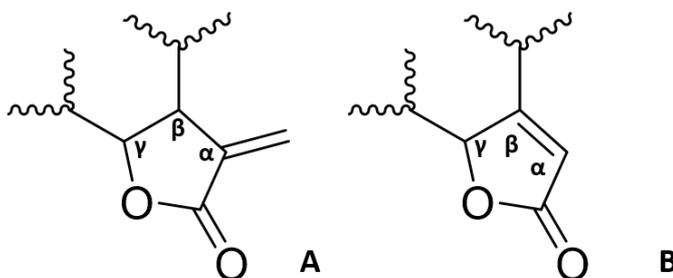


Figura 38: **A** Estrutura de um grupo α -metileno- γ -lactona. **B** Estrutura de um grupo α - β insaturado

Há alguns autores que segerem que os germacranolídeos representam a classe biogeneticamente mais primitiva e que todas as outras lactonas sesquiterpênicas evoluem a partir deles (PICMAN, 1986).

Através das análises em CLAE foi possível observar que o hidroxipelenolídeo está entre as 6 substâncias mais abundantes do extrato AAF. A figura 39 compara o perfil cromatográfico, obtido nas mesmas condições analíticas, do hidroxipelenolídeo (linha vermelha) em relação ao extrato AAF (linha preta).

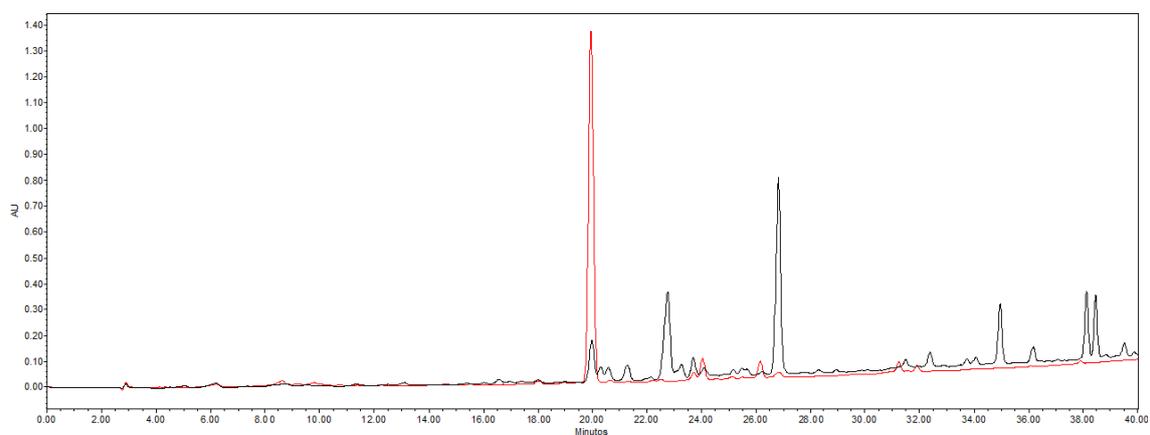


Figura 39: Comparativo entre perfil cromatográfico do hidroxipelenolídeo (linha vermelha) e o extrato AAF (linha preta) a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

4.3 TRANSPOSIÇÃO DA ESCALA ANALÍTICA PARA A SEMIPREPARATIVA DA FRAÇÃO AA7.33 E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS

A transposição da escala analítica para a escala preparativa, na purificação dos compostos, deve ser feita através do modelo matemático descrito na literatura de HEUER *et al.* (1996). Neste modelo matemático, um fator, chamado de “fator de transposição direta” é calculado e é utilizado para prever a concentração em termos de massa e volume no sistema preparativo. Também é calculada a vazão a ser utilizada no sistema preparativo de tal maneira que seja possível reproduzir as condições obtidas no sistema analítico com uma relação direta entre as vazões e o diâmetro das colunas.

A transposição de escala só pode ser realizada depois de estabelecidas as condições ótimas de seletividade e de rendimento para a separação. A transposição direta de escala (também chamada de “linear”, ou “matemática direta”), tem as vantagens da simplicidade, por se basear em apenas um fator de cálculo a partir de um cromatograma e da similaridade gráfica com a escala analítica. Por isso a transposição direta é a mais empregada nas separações semipreparativas de substâncias naturais (RIBANI, 2008).

O cromatograma obtido nas condições cromatográficas ajustadas para o sistema preparativo pode ser observado na figura 40a, e o espectro no UV dos picos majoritários na figura 40b.

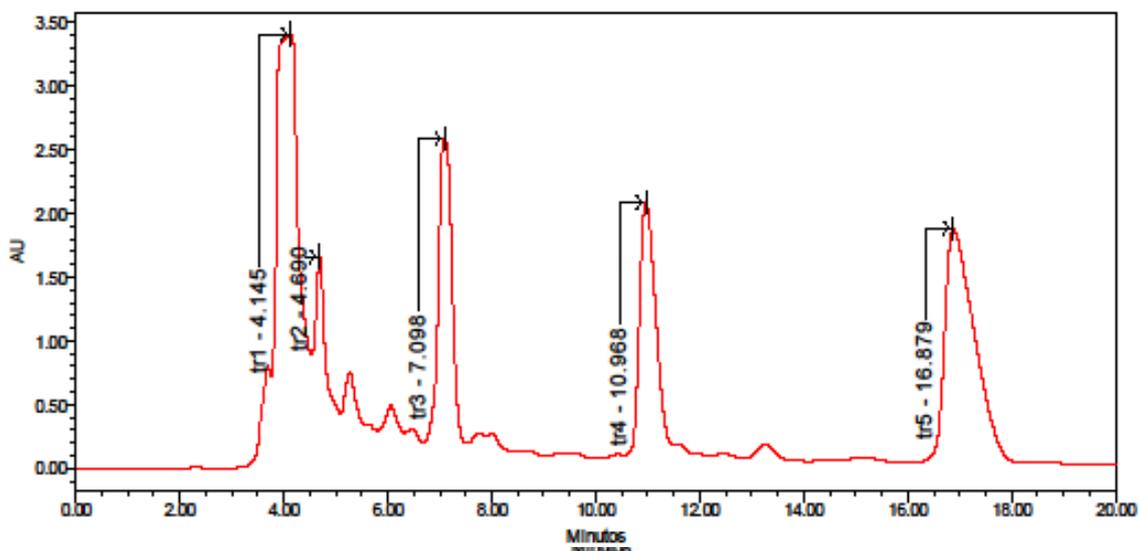


Figura 40a: Cromatograma obtido em escala semipreparativa após estabelecidas as condições de carga, fluxo e fase móvel isocrática a 210 nm. Fase móvel binária isocrática composta de 35% H₂O (0,1% H₃PO₄) e 64% MeOH em 20 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (10 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 7mL/min.

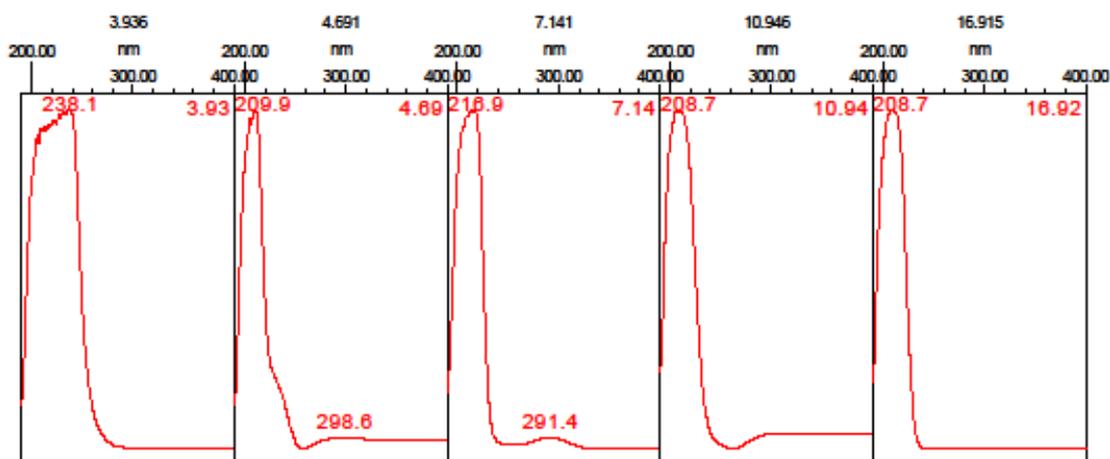


Figura 40b: Espectro no UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção, 3,936; 4,691; 7,141; 10,946 e 16,915 minutos

Os picos nos Tr: 4,145 (pico 1); 4,690 (pico 2); 7,098 (pico 3); 10,968 (pico 4) e 16,879 (pico 5) minutos, foram coletados em sucessivas eluições e submetidos a uma nova eluição em CLAE analítico. O cromatograma do pico 1 (em condições analíticas) é exibido na figura 41a, o espectro no UV da substância obtida é mostrado na figura 41b e o comparativo do perfil químico da substância isolada com a fração AA7.33, da qual foi originada, nas mesmas condições de análise é apresentado na figura 41c.

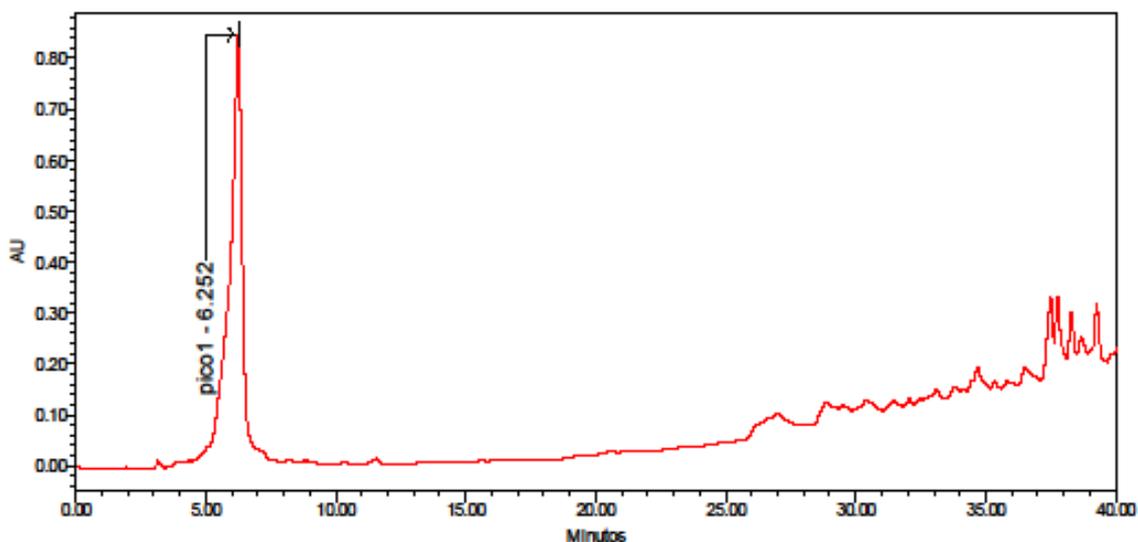


Figura 41a: Perfil cromatográfico da substância presente no pico 1 a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

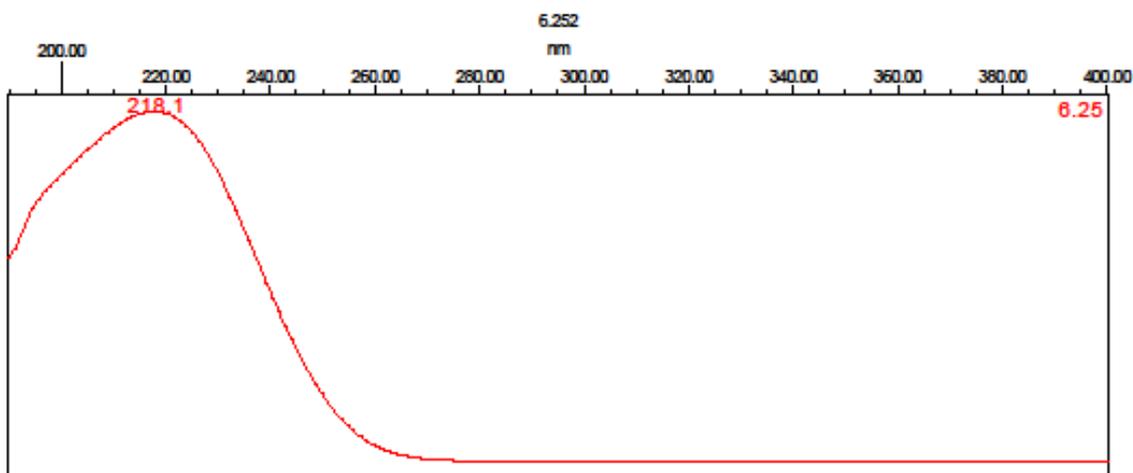


Figura 41b: Espectro no UV da substância presente no pico 1

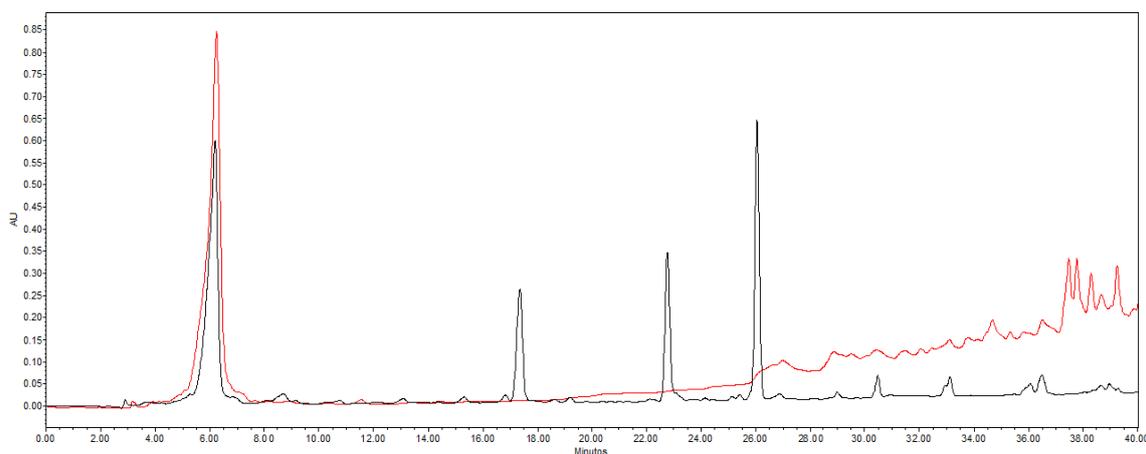


Figura 41c: Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 1 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

O cromatograma do pico 3 (em condições analíticas) é exibido na figura 42a, o espectro no UV da substância obtida na figura 42b e o comparativo do perfil químico da substância isolada com a fração AA7.33, da qual foi originada, nas mesmas condições de análise é apresentado na figura 42c.

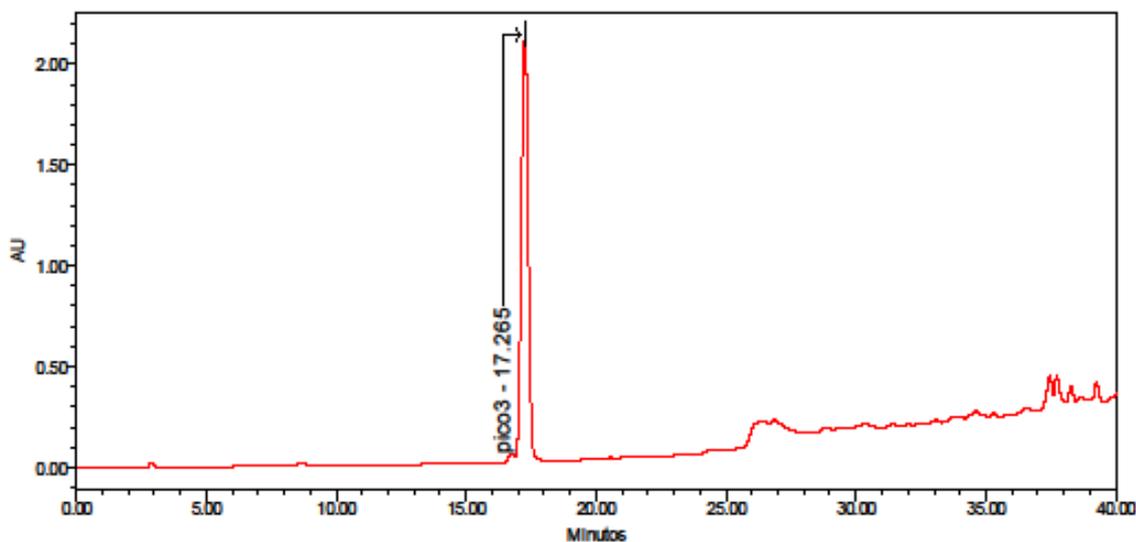


Figura 42a: Perfil cromatográfico da substância presente no pico 3 a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) e fluxo de 1mL/min.

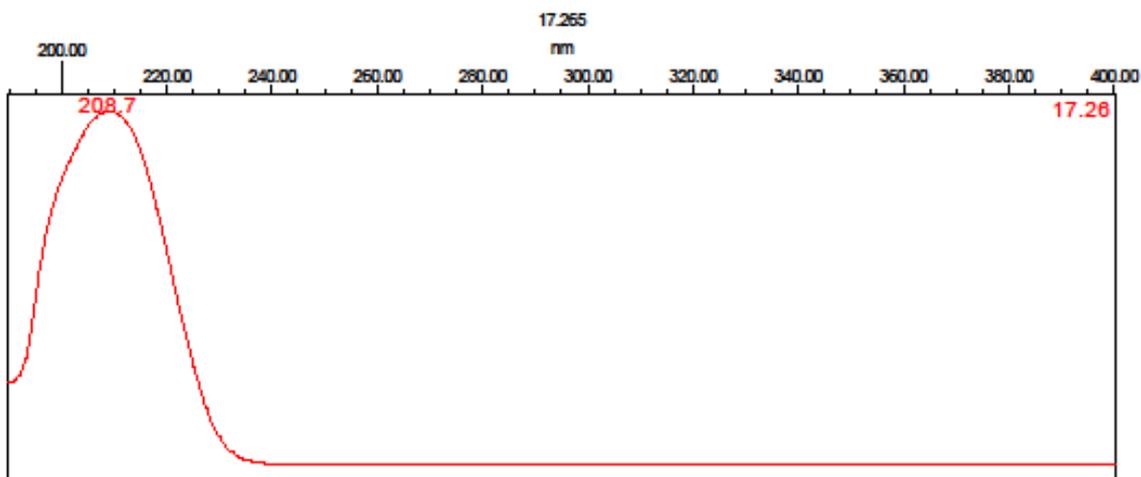


Figura 42b: Espectro no UV da substância presente no pico 3

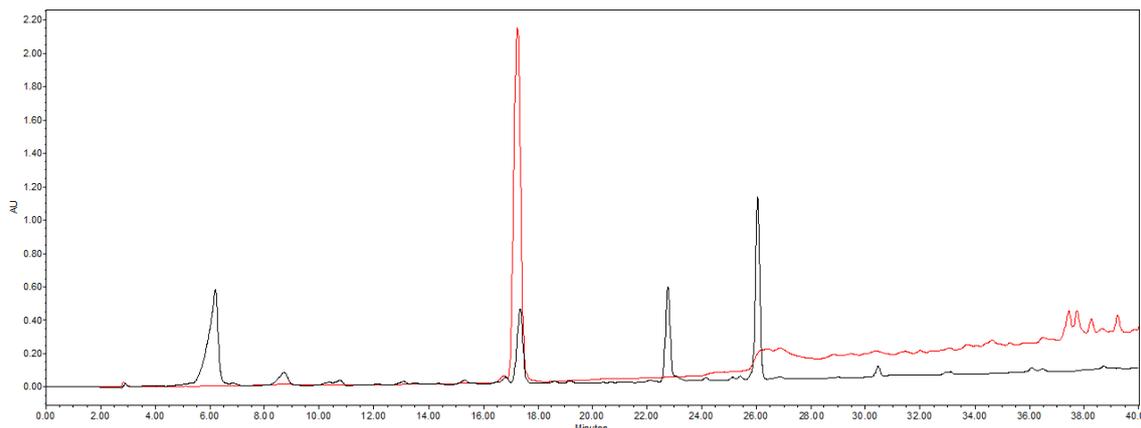


Figura 42c: Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 3 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

O cromatograma do pico 5 (em condições analíticas) é exibido na figura 43a, o espectro no UV da substância obtida na figura 43b e o comparativo do perfil químico da substância isolada com a fração AA7.33, da qual foi originada, nas mesmas condições de análise é apresentado na figura 43c.

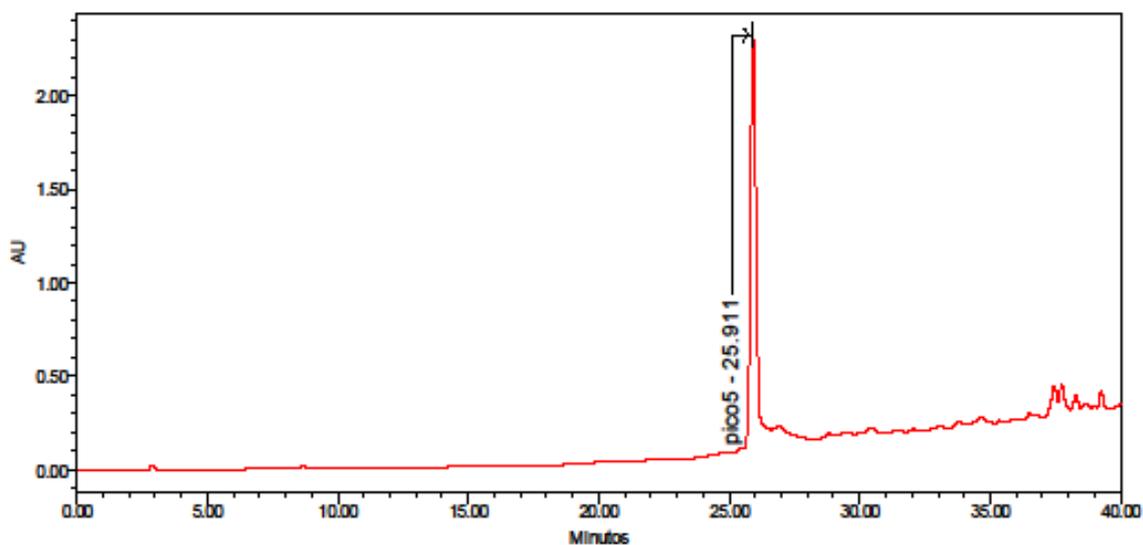


Figura 43a: Perfil cromatográfico da substância presente no pico 5 a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

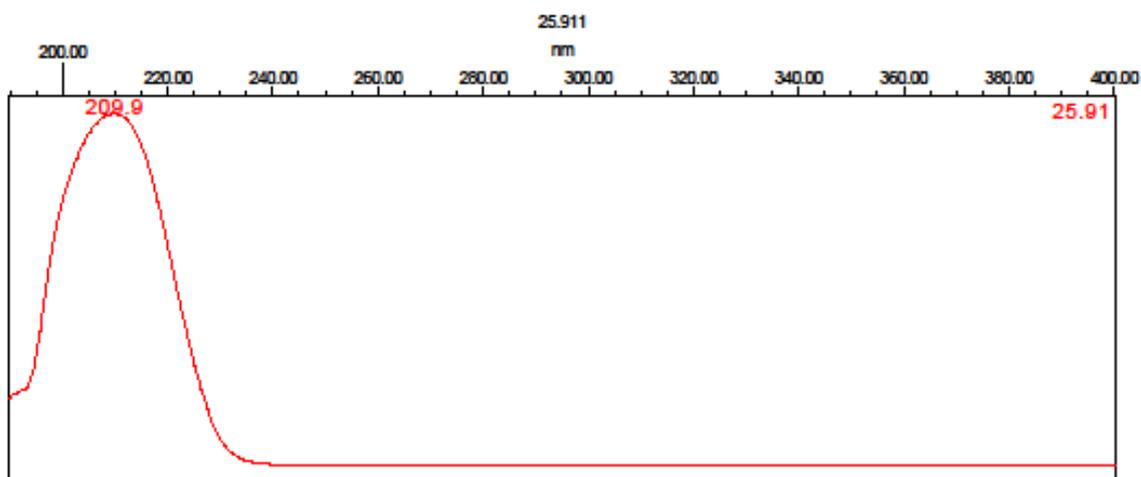


Figura 43b: Espectro no UV da substância presente no pico 5.

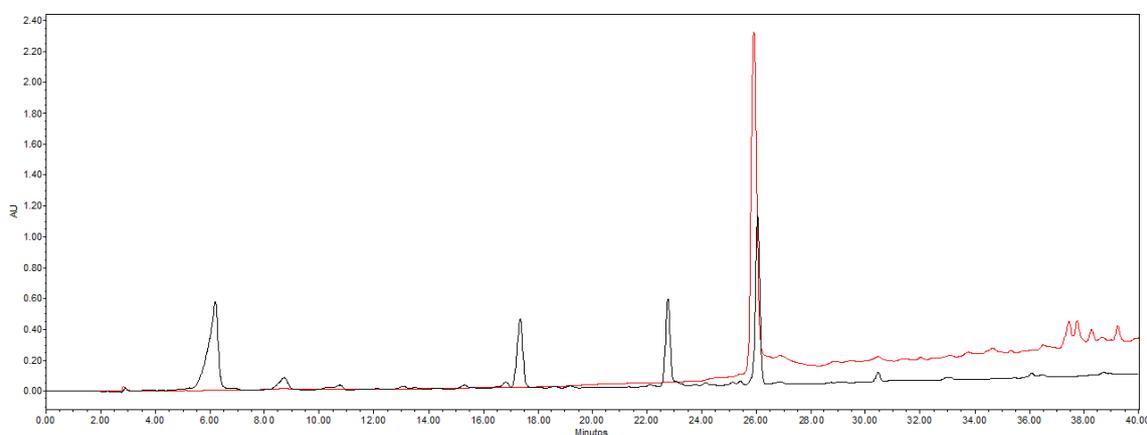


Figura 43c: Comparativo entre perfil cromatográfico da substância presente no pico 5 (linha vermelha) e a fração AA7.33 (linha preta) a 210 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,1% H₃PO₄) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Foi utilizado coluna de fase reversa C₁₈, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e fluxo de 1mL/min.

As 5 substâncias obtidas em CLAE semipreparativo da fração AA7.33 apresentam espectros no UV típicos de lactonas (SCHORR & DA COSTA, 2005). Essas substâncias estão em fase de elucidação estrutural e, portanto suas estruturas não serão apresentadas.

4.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Artemisia absinthium* L.

O óleo essencial de *Artemisia absinthium* L. (OEAA) obtido apresentou coloração avermelhada, com forte odor. O teor de óleo essencial calculado foi de 1,5% em relação à massa de folhas frescas.

O cromatograma do OEAA, obtido por CG-EM encontra-se na figura 44. Foram obtidos 67 picos, dos quais 13 foram identificados conforme mostrado na tabela 12. As estruturas químicas desses metabólitos estão reunidas na figura 45.

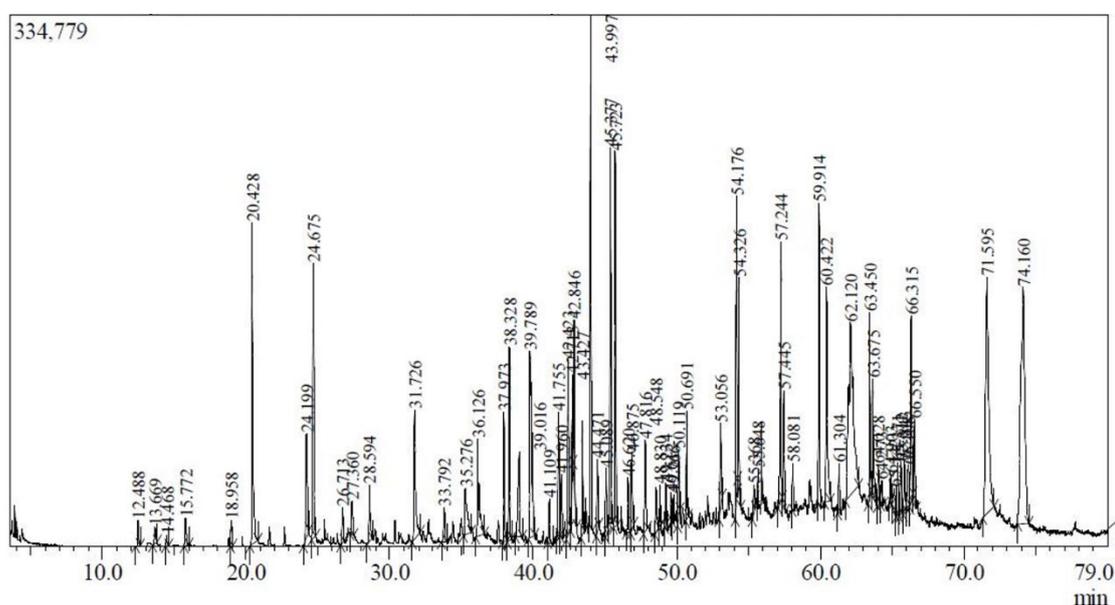


Figura 44: Cromatograma do CG-EM do óleo essencial da *Artemisia absinthium* L.. Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240°C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min. Coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme) Rtx5-MS.

Tabela 12: Composição química do óleo essencial de *Artemisia absinthium* L.

Substância	IR exp ^{a)}	IR lit ^{b)}	Conteúdo % ^{c)}	Identificação ^{d)}
Sabineno	976	969	0,27	IR, MS
β -mirceno	992	988	0,17	IR, MS
α -felandreno	1005	1002	0,13	IR, MS
Linalool	1102	1102	4,03	IR, MS
Lavandulol	1171	1172	1,27	IR, MS
4-terpineol	1179	1174	2,94	IR, MS
Trans-grandisol	1219	1213	0,78	IR, MS
Trans-cariofileno	1423	1417	1,79	IR, MS
Butirato de geranila	1467	1459	1,23	IR, MS
Isobutirato de nerila	1492	1485	1,35	IR, MS
Nerolidol	1567	1564	0,64	IR, MS
Isovalerato de nerila	1579	1582	1,77	IR, MS
Óxido de cariofileno	1590	1587	1,05	IR, MS
Monoterpenos			9,59	
Sesquiterpenos			7,83	
Total Identificado			17,42	

^{a)} IR exp: Índice de Retenção relativo a série de alcanos (C₈-C₂₀) na coluna *Rtx-5 MS*. ^{b)} IR lit: Índice de Retenção obtido do ADAMS, 2007. ^{c)} Conteúdo relativo calculado em função da área do pico e do conteúdo total da soma das áreas de todos os picos. ^{d)} Identificação da Substância: IR, comparação dos IRs com aqueles encontrados na literatura de ADAMS, 2007; MS, comparação do espectro de massas com aqueles encontrados nas bibliotecas de espectros WILEY 7, NIST e PHEROBASE.

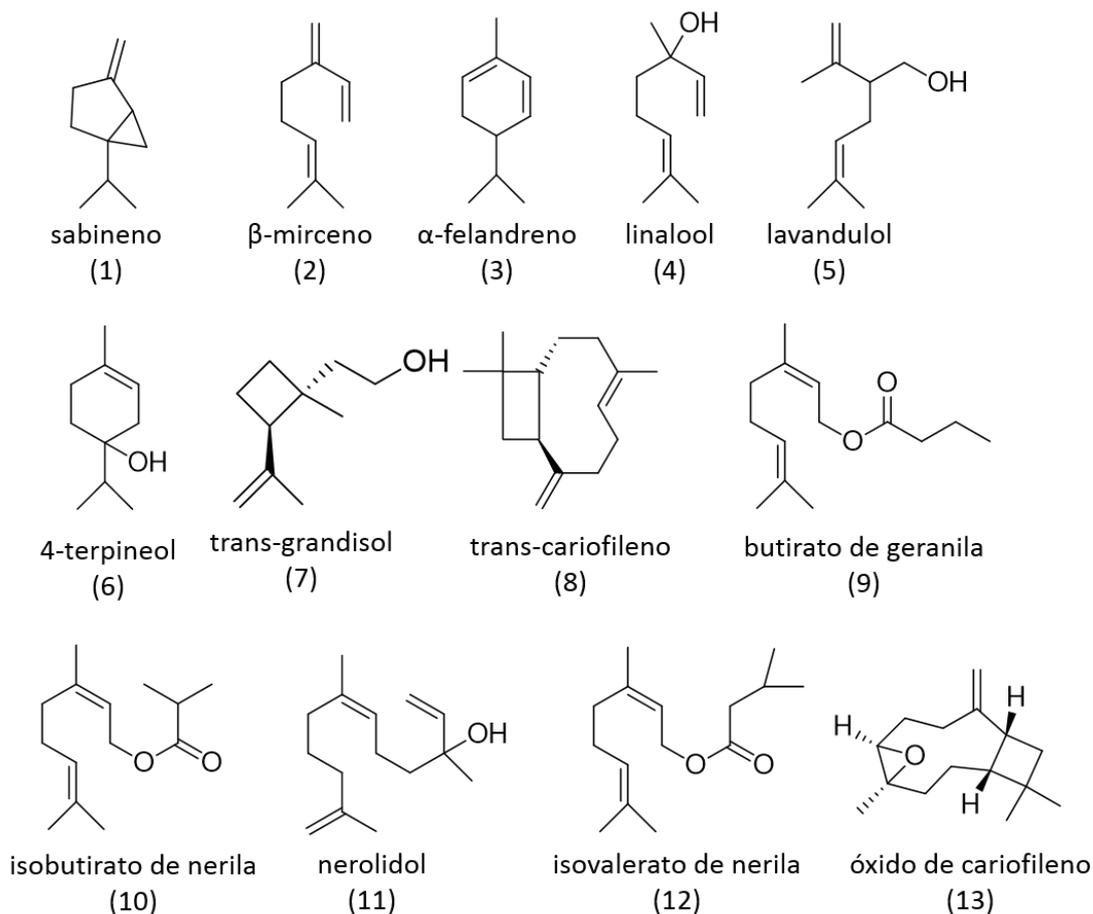


Figura 45: Estruturas químicas dos metabólitos secundários do óleo essencial da *Artemisia absinthium* L.

A composição química do óleo essencial das folhas da *Artemisia absinthium* L. vem sendo investigada há décadas. Diferentes quimiotipos de óleos foram encontrados em diferentes países (JOSHI *et al.*, 2013). Dentre os constituintes majoritários, encontrados no óleo essencial da *A. absinthium* L., descritos por diversos pesquisadores se encontra a tujona (alpha e beta) (PELKONEN *et al.*, 2013; MARTÍN *et al.*, 2011). Entretanto essa substância não foi identificada no OEAA assim como também não esteve presente nos óleos essenciais da *A. absinthium* L. estudados por ASFAW & DEMISSEW, (2015) na Etiópia e por BAILEN *et al.* (2013) na Espanha.

4.5 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS BRUTOS AAF E AAR, DO OEAA E ARTEMETINA FRENTE A VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

4.5.1 Atividade Esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos AAF e AAR

Apesar de vários estudos apresentarem os potenciais efeitos de extratos e partições de preparações vegetais frente aos parasitos de *S. mansoni* (FERREIRA *et al.*, 2011; KONÉ *et al.*, 2011; YOUSIF *et al.*, 2007), até o presente momento não há relatos na literatura quanto à atividade esquistossomicida dos extratos, diclorometânico obtido por lavagem foliar, bem como etanólico da raiz de *A. absinthium* L..

Além disso, uma vez que estudos têm demonstrado potencial atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos brutos etanólicos das partes aéreas da *A. absinthium* L. bem como para outras espécies do mesmo gênero (FERREIRA *et al.*, 2011), o AAF e o AAR, foram avaliados *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

Primeiramente foi realizada uma triagem para avaliar o efeito esquistossomicida dos dois extratos (AAF e AAR). A concentração final, das duas amostras, foi de 200 µg/mL. Os resultados estão sumarizados na tabela 13.

Tabela 13: Atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos etanólico da raiz (AAR) e diclorometânico das folhas (AAF) de *A. absinthium* L., frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a		Alterações tegumentares (%) ^a	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
Controle ^b	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
Praziquantel 1 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAF 200 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAR 200 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100

^a Porcentagem em relação a 20 vermes (10 machos e 10 fêmeas).

^b Meio RPMI.

^c DMSO em meio RPMI.

Ressalta-se que em todos os ensaios, o grupo controle, meio RPMI e DMSO 0,5% não apresentaram qualquer alteração na mortalidade, atividade motora e tegumento dos vermes adultos, comprovando que o meio e o veículo não exerceram efeitos sobre os parasitos avaliados, conforme preconiza a literatura (DE MELO *et al.*, 2011).

Como mostrado na tabela 13, ocorreu efeito esquistossomicida com ambas as amostras (AAF e AAR), avaliadas na concentração de 200 µg/mL. Entretanto, o extrato AAF apresentou melhor atividade, já que nas primeiras 24h de análise foi capaz de causar morte, redução da atividade motora e alterações tegumentares em 100% dos parasitos de maneira semelhante ao observado pelo PZQ (1 µg/mL). Por outro lado, o AAR apresentou esses mesmos efeitos somente a partir de 48h. Levando-se em consideração esses aspectos, essas amostras foram avaliadas em diferentes concentrações, cujos resultados estão sumarizados nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Efeito do extrato AAF em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a		Alterações tegumentares (%) ^a	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
Controle ^b	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
Praziquantel 1 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAF 200 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAF 100 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAF 50 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAF 25 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	20	0	20	0	20
AAF 12,5 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes (10 machos e 10 fêmeas).

^b Meio RPMI.

^c DMSO em meio RPMI.

Tabela 15: Efeito do extrato AAR em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a		Alterações tegumentares (%) ^a	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
Controle ^b	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
Praziquantel 1 µg/mL	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAR 200 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
AAR 100 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	100	0
	72	100	0	100	0	100
AAR 50 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
AAR 25 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
AAR 12,5 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes (10 machos e 10 fêmeas).

^b Meio RPMI.

^c DMSO em meio RPMI.

Como é possível observar nas tabelas 13, 14 e 15, o extrato AAF demonstrou melhor atividade quando comparado ao AAR. A partir dos dados descritos na tabela 14, observa-se que o extrato AAF mesmo na concentração 4 vezes menor (50 µg/mL) que a utilizada na triagem inicial (200 µg/mL) foi capaz de causar redução da atividade motora e alterações tegumentares significativas, além de provocar a morte de 100% dos vermes adultos após 48 horas de incubação.

No entanto, esse mesmo extrato na concentração de 25 µg/mL foi capaz de provocar a morte de 20% dos parasitos somente após 72 horas de incubação. Por outro lado, na concentração de 12,5 µg/mL, esse extrato não provocou qualquer alteração nos vermes adultos.

Para o extrato AAR, na concentração de 100 µg/mL, 100% dos vermes apresentaram leves alterações tegumentares após 48 horas de incubação, sendo obtido nenhum outro efeito dentre esse mesmo período de análise. Já após 72h, foi obtido efeito esquistossomicida máximo similar ao controle.

Os extratos diclorometânico das partes aéreas de diversas espécies de *Artemisia* sp. têm sido avaliados frente a diferentes parasitos. MOJARRAB *et al.* (2014) avaliaram os extratos diclorometânicos de *Artemisia armeniaca* e *Artemisia aucheri* obtendo pronunciados efeitos antimaláricos *in vitro* para as duas espécies, sendo a primeira mais potente. Foi possível inferir a partir do solvente utilizado para se obter os extratos, que as substâncias antimaláricas mais ativas apresentavam média polaridade. Os autores relacionaram a elevada atividade do extrato diclorometânico de *Artemisia armeniaca* com a presença de terpenos, ácidos graxos, cumarinas e flavonoides metoxilados.

Também MOJARRAB *et al.* (2015) avaliaram a atividade antimalárica de 15 extratos, de diferentes polaridades, obtidos a partir de 3 espécies de *Artemisia* (*A. ciniformis*, *A. biennis* e *A. turanica*) e novamente obteve mais potente atividade com o extrato diclorometânico (espécie *A. ciniformis*). A espécie *A. ciniformis* apresenta elevado conteúdo de lactonas sesquiterpênicas quando comparado com as duas outras espécies. Logo, foi inferido que a atividade antiparasitária obtida poderia estar relacionada à presença dessas lactonas.

As LST têm sido identificadas como substâncias ativas em ensaios esquistossomicidas. A LST vernodalina (figura 46), isolada de *Vernonia amygdalina* (Asteraceae), se mostrou ativa após avaliação *in vitro* frente ao *S. japonicum* (JISAKA *et al.*, 1992). BAKER *et al.* (1972) avaliaram a habilidade de diferentes LST em inibir a penetração cercariana. Foi observado que as LST eremantina, ciclocostunolídeo e costunolídeo apresentaram atividade. Entretanto, o α -dihidrociclocostunolídeo se mostrou inativo, provavelmente pela ausência do grupo α metileno externo ao anel lactônico (figura 46). VICHNEWSKI *et al.* (1976) também demonstraram a atividade da LST goyazenolídeo (figura 46) em inibir a penetração cercariana. O goyazensolídeo e outras LST também apresentaram atividade contra moluscos adultos de *Biomphalaria* sp., os quais estão diretamente implicados na transmissão da esquistossomose (BORKOSKY *et al.*, 2009).

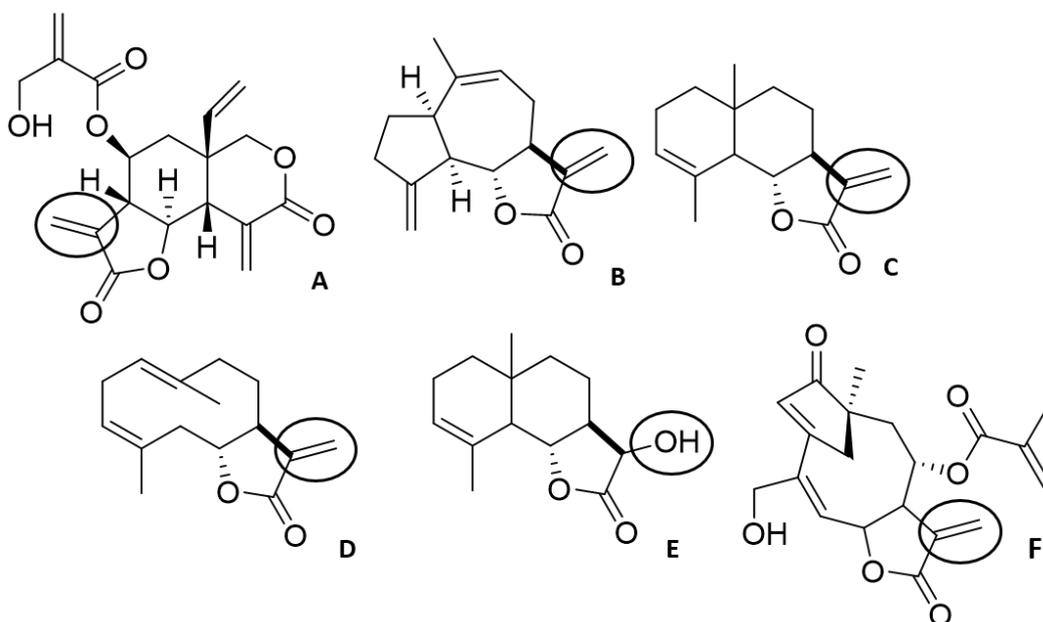


Figura 46: A. Vernodalina; B. Eremantina; C. Ciclocostunolídeo; D. Costunolídeo; E. α -dihidrociclocostunolídeo e F. goyazensolídeo. Destaque para os grupos ligados ao carbono α .

O estudo bioguiado de extratos e frações orgânicas é uma importante ferramenta, uma vez que direciona o trabalho fitoquímico para a identificação de substâncias bioativas. Neste contexto, estudos fitoquímicos bioguiados têm sido realizados no intuito de isolar substâncias com atividade esquistossomicida. Como exemplo, tem-se o trabalho realizado por RAPADO *et al.*, (2014), o qual isolou três substâncias ativas (derivado do ácido benzoico e duas chalconas) frente ao *B. glabrata* partindo de extratos de plantas *Piper* sp. com já reconhecida atividade moluscicida. Ainda, por meio de estudo bioguiado para atividade esquistossomicida, DE CASTRO *et al.* (2015) isolaram uma chalcona a partir do extrato diclorometânico das inflorescências de *Piper aduncun*. Esta chalcona, denominada de cardamonina, foi capaz de matar os vermes adultos de *S. mansoni* em baixas concentrações e de inibir a enzima difosfohidrolase deste parasito.

Além desses, YOUSIF *et al.* (2012) através de um bio-screening *in vitro* partindo da análise de 309 extratos obtidos de 278 espécies, culminou com a seleção de 18 extratos os quais apresentaram elevada atividade esquistossomicida frente ao *S. mansoni*. Logo, esses extratos foram

encaminhados para mais estudos com o objetivo de isolar e caracterizar as substâncias ativas.

Assim, considerando a importância da realização de estudos iniciais de triagem de extratos vegetais, bem como a atividade esquistossomicida demonstrada para o extrato diclorometânico das folhas de *A. absinthium* L. (AAF) e, ainda, a ausência de trabalhos que explorem o potencial esquistossomicida desse extrato, o mesmo foi submetido ao fracionamento cromatográfico, resultando no isolamento das substâncias artemetina e hidroxipelenolídeo. Desta forma, a substância majoritária foi também avaliada frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

4.5.2 Atividade Esquistossomicida *in vitro* da Artemetina

A artemetina, substância majoritária do extrato AAF, foi avaliada quanto à mortalidade e redução da atividade motora *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* na concentração de 100 µM. Os resultados são expressos a seguir, na tabela 16.

Tabela 16: Efeito da artemetina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução da Atividade Motora (%)
Controle ^b	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
Praziquantel 3 µM	24	100	100
	48	100	100
	72	100	100
Artemetina 100 µM	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes (10 machos e 10 fêmeas).

^b Meio RPMI.

^c DMSO em meio RPMI.

Como pode ser observado na tabela 16, a artemetina, na concentração de 100 µM, não foi capaz de promover qualquer tipo de alteração na mortalidade e na atividade motora dos parasitos.

Com relação a atividade antiparasitária, NWODO *et al.* (2015) avaliaram, *in vitro*, a atividade tripanocida de 7 flavonoides, dentre eles a artemetina, isolados da espécie *Vitex simplicifolia*. A artemetina foi a substância que apresentou melhor e mais seletiva atividade tripanocida. Os autores sugerem que a atividade observada está relacionada com a sua estrutura química, a qual apresenta 5 grupos metoxilas. Já que a atividade tripanocida parece aumentar com o aumento da metilação dos grupos hidroxilas. Uma explicação plausível para essa observação é o aumento correspondente na lipofilicidade, o que poderia aumentar a permeabilidade dos compostos através das estruturas de revestimento do parasita.

FERREIRA *et al.* (2010) relatam a possibilidade de sinergismo de flavonoides com fármacos antiparasitários. Por exemplo, os flavonoides casticina e artemetina não apresentam nenhuma atividade antimalárica *in vitro* quando avaliadas isoladamente, mas apresentam efeito sinérgico quando combinadas com a lactona sesquiterpênica artemisinina (ELFORD *et al.*, 1987).

Tendo em vista os resultados esquistossomicidas obtidos, esperava-se que a artemetina, por ser a substância majoritária do extrato AAF, apresentasse alguma atividade esquistossomicida frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, já que o extrato AAF foi ativo. Contudo, a artemetina foi inativa na concentração avaliada. Entretanto, considerando os aspectos envolvidos na ação de diferentes compostos presentes em extratos vegetais, uma possível ação sinérgica da artemetina com outras substâncias presentes no AAF (como as LST) não pode ser descartada. Além disso, concentrações mais elevadas de artemetina (não avaliadas neste trabalho) poderiam resultar em algum efeito sobre o parasito. Considerando os resultados obtidos até o momento, a atividade esquistossomicida observada pelo extrato AAF pode ainda estar relacionada a outros constituintes ainda não avaliados isoladamente, com destaque para as LST.

Outro fator que merece ser ressaltado é que de acordo com EL-LAKKANY & SEIF EL-DIN (2013), existem evidências *in vitro* que sugerem que vermes adultos de *Schistosoma* sp apresentam maior capacidade de

desintoxicação oxidante do que as formas jovens (esquistossômulos). Esse aspecto pode ser futuramente investigado, desafiando a artemetina frente às formas jovens do parasito, formas estas refratárias ao PQZ.

4.5.3 Atividade Esquistossomicida *in vitro* do óleo essencial OEAA

Os óleos essenciais das espécies pertencentes a família Asteraceae têm apresentado atividade esquistossomicida promissora frente a vermes de *S. mansoni* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; TONUCCI *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2011).

Assim considerando seu potencial, o óleo essencial de *Artemisia absinthium* L. (OEAA), foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, sendo os resultados apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Efeito do óleo OEAA em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Redução da Atividade Motora (%)
Controle ^b	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
Praziquantel 3 µM	24	100	100
	48	100	100
	72	100	100
OEAA 100 µg/mL	24	0	0
	48	60	60
	72	100	100
OEAA 50 µg/mL	24	0	0
	48	0	0
	72	100	100
OEAA 25 µg/mL	24	0	0
	48	0	0
	72	20	80
OEAA 12,5 µg/mL	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes (10 machos e 10 fêmeas).

^b Meio RPMI.

^c DMSO em meio RPMI.

A partir dos dados descritos na tabela 17, observa-se que OEAA na concentração de 100 µg/mL causou 60% de mortalidade e de redução da motilidade após 48 horas de incubação. Já após 72 horas de incubação, o OEAA provocou 100% de mortalidade e de redução na atividade motora.

O OEAA (50 µg/mL) foi ativo após 72 horas causando 100% de mortalidade e de redução da atividade motora nos parasitos. Por outro lado, o OEAA (25 µg/mL) foi capaz de causar 20% de mortalidade e 80% de redução na atividade motora, após 72 horas de incubação. Contudo, na concentração de 12,5 µg/mL, o OEAA não provocou qualquer alteração nos vermes adultos.

Com relação aos estudos já realizados com óleos essenciais, DE OLIVEIRA *et al.* (2012) avaliaram a atividade esquistossomicida *in vitro* do óleo essencial de *Baccharis trimera*. Esse óleo apresentou elevada atividade na concentração de 130 µg/mL. Dentre as substâncias majoritárias (14,77%) do óleo de *B. trimera* em comum com os metabólitos identificados do OEAA (1,79%) está o *trans*-cariofileno. Contudo MATOS-ROCHA *et al.* (2013) avaliaram também *in vitro* o *trans*-cariofileno, isoladamente na concentração de 7,3 µg/mL, frente a vermes adultos de *S. mansoni* não observando atividade esquistossomicida.

MAGALHÃES *et al.* (2012) avaliaram o óleo essencial de *Piper cubeba* L. frente as formas jovens (esquistossômulos) e adultas de *S. mansoni*. Esse óleo causou alteração tegumentar, convulsões, redução da atividade motora e morte de 100% dos vermes adultos na concentração de 100 µg/mL, sendo que esses mesmos efeitos foram observados frente as formas jovens na concentração de 50 µg/mL. Os constituintes majoritários do óleo de *Piper* em comum com as substâncias identificadas do OEAA foram o sabineno (19,99%) e o 4-terpineol (6,36%).

Dentre os constituintes identificados do OEAA o nerolidol, já foi avaliado *in vitro* por SILVA *et al.* (2014) frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Essa substância foi capaz de exercer atividade esquistossomicida já na concentração de 15,6 µM. O mecanismo de ação exato do nerolidol ainda não está claramente elucidado, entretanto a correlação entre dano ao tegumento e viabilidade foi observada. Esse aspecto pode ser analisado, principalmente em função da lipofilicidade do nerolidol, o qual atravessa facilmente as estruturas

de revestimento do parasito, podendo danificá-las, o que também viabiliza a interação com moléculas internas do parasito.

Um fato relevante em relação ao OEAA foi a ausência dos metabólitos α e β tujona bastante característicos da espécie *A. absinthium* L.. A respeito, GODINHO *et al.* (2014) avaliaram a atividade esquistossomicida *in vitro* do óleo essencial de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) o qual possuía 84,13% de β -tujona. Na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, ocorreu diminuição da atividade motora e 100% de mortalidade dos vermes adultos. Nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ o óleo não apresentou atividade.

Em relação a atividade esquistossomicida *in vitro* apresentada pelo OEAA, ela pode ser decorrente de uma ou mais moléculas presentes no óleo. Em acréscimo, estudos vem sugerindo que a eficácia demonstrada por alguns óleos essenciais decorre principalmente em função da rápida difusão através das membranas (em função da alta lipossolubilidade dos compostos), o que pode danificar o tegumento e outras estruturas celulares, podendo causar a lise de células (GODINHO *et al.* 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2012).

Embora ensaios *in vitro* não sejam adequados para avaliar todos os aspectos relacionados com a atividade biológica observada pelos extratos e substâncias, eles fornecem a primeira evidência dos prováveis efeitos e modos de ação, contribuindo de modo efetivo para o descobrimento de novas moléculas e abordagens terapêuticas (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

Portanto, de forma geral, estudos adicionais de avaliação da atividade esquistossomicida serão realizados com as substâncias já isoladas, assim que as mesmas forem identificadas, no intuito de se encontrar qual ou quais compostos são efetivamente ativos frente ao *S. mansoni*. Além disso, outros ensaios, como os de citotoxicidade frente a células humanas, já estão sendo realizados com as amostras ativas.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico bruto das folhas de *A. absinthium* L. (**AAF**) resultou no isolamento e na identificação da artemetina e do hidroxipelenolídeo, substâncias já isoladas da espécie, bem como no isolamento de outras 5 substâncias ainda não identificadas.

O extrato AAF apresentou significativa atividade esquistossomicida *in vitro*, corroborando com o potencial esquistossomicida de espécies do gênero *Artemisia*, além de corroborar com o uso popular das partes aéreas de *A. absinthium* L. como antihelmíntica.

Entretanto, a artemetina, substância majoritária isolada do AAF, não apresentou atividade esquistossomicida frente aos vermes adultos de *S. mansoni* na concentração avaliada. Este resultado sugere que a atividade observada pelo extrato AAF possa estar relacionada a outros constituintes ainda não avaliados isoladamente, com destaque para as lactonas sesquiterpênicas.

Por sua vez, o óleo essencial de *A. absinthium* L., (**OEAA**) apresentou moderada atividade esquistossomicida *in vitro*, causando alterações nas taxas de mortalidade e na atividade motora dos parasitos a partir da concentração de 25 µg/mL.

Estudos adicionais de avaliação esquistossomicida devem ser realizados com o extrato bruto e metabólitos de *A. absinthium* L. com o intuito de se identificar as moléculas responsáveis pela atividade esquistossomicida *in vitro* observada pelo extrato.

6 REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

ABERHAM, A.; CICEK, S. S.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H.. Analysis of Sesquiterpene Lactones, Lignans, and Flavonoids in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC-Solid Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10817-10823, 2010.

ADAMS, R. P.. **Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Illinois, Allured Publishing Corporation, 2007.

AKKARI, H.; RTIBI, K.; B'CHIR, F.; REKIK, M.; DARGHOUTH, M. A.; GHARBI, M.. *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 3, p. 249-255, 2014.

ALI, M.; ABBASI, B. H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L.. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400-406, 2013.

ALLAM, G.. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. **Immunobiology**, v. 214, n. 8, p. 712-727, 2009.

ALLEGRETTI, S. M.; DE OLIVEIRA, C. N. F.; DE OLIVEIRA, R. N.; FREZZA, T. F.; REHDER, V. L. G.. The Use of Brazilian Medicinal Plants to Combat *Schistosoma mansoni*, Schistosomiasis, Prof. Mohammad Bagher Rokni. **INTECH Open Access Publisher**, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/the-use-of-brazilian-medicinalplants-to-combat-schistosoma-mansoni>. Acesso: 18 de Setembro de 2014.

AMAT, N., UPUR, H., BLAZEKOVIĆ, B. *In vivo* hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 478-484, 2010.

ANSHUL, N.; BHAKUNI, R. S.; GAUR, R.; SINGH, D.. Isomeric Flavonoids of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) as Insect Growth Inhibitors Against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, p. 897-903, 2013.

ARAI, T.; TODA, Y.; KATO, K.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, T.; YAMADA, K.; UEDA, J.; HASEGAWA, K.; INOUE, T.; SHIGEMORI, H.. Artabolide, a novel

polar auxin transport inhibitor isolated from *Artemisia absinthium*. **Tetrahedron**, v. 69, n. 34, p. 7001-7005, 2013.

ARAÚJO, C. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; TIBIRIÇÁ, E.. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. **Naunyn-chmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 363, p. 267-275, 2001.

ASFAW, N.; DEMISSEW, S.. Essential oil composition of four *Artemisia* species from Ethiopia. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 29, n. 1, p. 123, 2015.

BACHROUCH, O.; FERJANI, N.; HAOUEL, S.; JEMÂA, J. M.B.. Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian *Artemisia* essential oils toward two major coleopteran pests. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 127-133, 2015.

BAILEN, M.; JULIO, L. F.; DIAZ, C. E.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; CABRERA, R.; BURILLO, J.; GONZALEZ-COLOMA, A.. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 102-107, 2013.

BAKER, P.; FORTES, C.; FORTES, E. G.; GAZZINELLI, G.; GILBERT, B.; PELLEGRINO, J.; TOMASSINI, T.; VICHNEWSKI, W.. Chemoprophylactic agentes in schistosomiasis: eremanthine, costunolide, α -cyclocostunolide and bisabolol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 11, p. 853-857, 1972.

BARBOSA DE CASTRO, C. C.; DIAS, M. M.; PESSOA DE REZENDE, T.; MAGALHÃES, L. G.; DA SILVA FILHO, A. A. Chapter 8 – Natural Products with Activity Against Schistsoma Species. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essencial Oils and their Components**. M. K. R. V. Kon. San Diego, Academic Press, p. 109-134, 2013

BARTOLI, B.; GALATI, B. G.; TORTOSA, R. D.. Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (Astereae, Asteraceae). **Flora**, v. 206, p. 1063-1068, 2011.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S.. FLAVONOIDS FROM *Artemisia arborescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, p. 1132-1133, 2014.

BERETTA, M. E.; FERNANDES, A. C.; SCHNEIDER, A. A.; RITTER, M. R.. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 189-216, 2008.

BERGQUIST, N. R.. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, p. 309-314, 2002.

BILIA, A. R.; DE MALGALHAES, P. M.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F.. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 487-493, 2006.

BLAGOJEVIC, P.; RADULOVIC, N.; PALIC, R.; STOJANOVIC, G.. Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4780-4789, 2006.

BORA, K. S.; SHARMA, A.. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 403-409, 2010.

BORKOSKY, S.; DE LEÓN, S. P.; JUÁREZ, G.; SIERRA, M. G.; BARDÓN, A.. Molluscicidal Sesquiterpene Lactones from Species of the Tribe Vernonieae (Compositae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 4, p. 513-519, 2009.

BRONNER, C.; LANDRY, Y.. Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. **Agents and Actions**, v. 16, n. 3-4, p. 147-151, 1985.

BRUM, J. W. A.; CONCEIÇÃO, A. S.; GONÇALVES, F. V. C.; MAXIMIANO, L. S. M.; DINIZ, L. B. M. P. V.; PEREIRA, M. N.; SILVA, E. S.. Parasitoses oportunistas em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana; Opportunistic parasitosis in patients with the virus of the human immunodeficiency. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 11, n. 3, p. 280-288, 2013.

CAFFREY, C. R.. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p.433–439, 2007.

CALA, A. C.; FERREIRA, J. F. S.; CHAGAS, A. C. S.; GONZALEZ, J. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; SOUSA, I. M. O.; MAGALHÃES, P. M.; JÚNIOR, W. B.. Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts in vitro and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v.113, n. 6, p. 2345-2353, 2014.

CANER, A.; DÖSKAYA, M.; DEGIRMENCI, A.; CAN, H.; BAYKAN, S.; ÜNER, A.; BASDEMİR, G.; ZEYBEK, U.; GÜRÜZ, Y.. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 173-179, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>. Acesso: 22 de Agosto de 2014.

CHATURVEDI, D.. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biology activities, In-Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. **Research Signpost**, p. 313-334, 2011.

CHEN, J-J.; CHANG, Y-L.; TENG, C-M.; CHEN, I-S.. Anti-Platelet Aggregation Alkaloids and Lignans from *Hernandia nymphaeifolia*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p.251-256, 2000.

CHI, N-J.; LIU, Y.; AISA, H. A.. Tetrahydrofuran lignans and flavonoids from *Artemisia absinthium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, p. 666-667, 2012.

CHIAN, S.; THAPA, R.; CHI, Z.; WANG, X. J.; TANG, X.. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, p. 602-608, 2014.

CHIASOON, H., BÉLANGER, A., BOSTANIAN, N., VINCENT, C., POLIQUIN, A.. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 1, p. 167-171, 2001.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A.. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.

CORRÊA-FERREIRA, M. L.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O.. *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*: A comparative study of infusion polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 0, p. 738-745, 2014.

COUTO, L. D.; TIBIRIÇA, S. H. C.; PINHEIRO, I. O.; Mitterofhe, A.; LIMA, A. C.; CASTRO, M. F.; GONÇALVES, M.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; ROSA, F. M.; COIMBRA, E. S.. Neglected tropical diseases: prevalence and risk factors for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in a region of Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 363-371, 2014.

CRACIUNESCU, O.; CONSTANTIN, D.; GASPAR, A.; TOMA, L.; UTOIU, E.; MOLDOVAN, L.. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. **Chemistry Central Journal**, 6:97, 2012.

DA SILVA, J. A. T.; YONEKURA, L.; KAGANDA, J.; MOOKDASANIT, J.; NHUT, D. T.; AFACH, G.. Important Secondary Metabolites and Essential Oils of Species Within the Anthemideae (Asteraceae). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 11, p. 1-46, 2005.

DARADKA, H. M.; ABAS, M. M.; MOHAMMAS, M. A. M.; JAFFAR, M. M.. Antidiabetic effect of *Artemisia absinthium* extracts on alloxan-induced diabetic rats. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 6, p. 1733-1742, 2014.

DE CASTRO, C. C. B.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; DE CARVALHO, P. H. D.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L. S.; COURI, M. R. C.; PINTO, P. F.; DA SILVA FILHO, A. A.. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-928, 2015.

DE LEÓN, E. J.; OLMEDO, D. A.; SOLÍS, P. N.; GUPTA, M. P.; TERCENIO, M. C.. Diayangambin Exerts Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Effects *in vitro* and *in vivo*. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1128-1131.

DE MELO, N. I.; MAGALHAES, L. G.; de CARVALHO, C. E.; WAKABAYASHI, K. A.; AGUIAR, G. P.; RAMOS, R.C.; MANTOVANI, A.L.; TURATTI, I.C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.; CROTTI, A.E. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 762-773, 2011.

DE MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; BITTENCOURT, C. R.; BEMQUERER, M. P.; LEITE, J. R.; KATO, M. J. NAKANO, E.. In vitro synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against schistosoma mansoni schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013a.

DE MORAES, J.; ALMEIDA, A. A. C.; BRITO, M. R. M.; MARQUES, T. H. C.; LIMA, T. C.; DE SOUSA, D. P.; NAKANO, E.; MENDONÇA, R. Z.; FREITAS, R. M.. Anthelmintic Activity of the Natural Compound (+)-Liminene Epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, p. 253-258, 2013b.

DE MORAES, J.. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current Topics in Tropical Medicine**. A. J. Rodriguez-Morales. Rijeka, p. 333-358, 2012a.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E.. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012b.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T.. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364.

DE OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L. G.; OLIVEIRA, A. S. S.; JÚNIOR, Í. M.; DE CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L. T. G.; GERALDO, V. L. S.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M.. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 135-143, 2012.

DE SOUZA, P.; GASPAROTTO JR, A.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M. E. A.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E.; KASSUYA, C. A. P..

Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 819-825, 2011.

DISSOUS, C.; GREVELDING, C. G.. Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 59-66, 2011.

DOENHOFF, M. J.. Is Schistosomicidal Chemotherapy Sub-curative? Implications for Drug Resistance. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 434-435, 1998.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D.. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

DOS SANTOS, A. F.; FONSECA, S. A.; CÉSAR, F. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.. SANTANA, J. V.; SANTANA, A. E. G.. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 3, p. 1077-1084, 2014.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Local Transmission of *Schistosoma haematobium* in Corsica, France – Stockholm, 2014.

EL-LAKKANY. N. M.; SEIF EL-DIN, S. H.. Haemin enhances the *in vivo* efficacy of artemether against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2005-2015, 2013.

EL-SAYED, 2014. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com/>. Acesso em: 11 de Junho de 2015.

ELFORD, B. C.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; WILSON, R. J. M.. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 434-436, 1987.

ENE, A. C.; ATAWODI, S. E.; AMEH, D. A.; NNAMANI, C. N.; APEH, Y. E. O.. Antitrypanosomal effects of petroleum ether, chloroform and methanol extracts of *Artemisia maciverae* Linn.. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 12, p. 981-986, 2009.

ERKO, B.; DEGAREGE, A.; TADESSE, K.; MATHIWOS, A.; LEGESSE, M.. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosomiasis mansoni* in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary School, Wondo Genet, Southern Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 235-239, 2012.

ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. Estudo comparativo da acurácia de diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose, 2013. Tese (Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – USP.

ESPIRITO-SANTO, M. C. C.; SANCHEZ, M. C. A.; SANCHEZ, A. R.; ALVARADO-MORA, M. V.; CASTILHO, V. L.P.; GONÇALVES, E. M. N.; LUNA, E. J. A.; GRYSCHKEK, R. C. B.. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v, 33, n. 12, p. 2275-2284, 2014.

FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D. L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A.. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. **Molecules**, v.15, n. 5, p. 3135, 2010.

FERREIRA, J. F. S.; PEADEN, P.; KEISER, J.. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: Trematocidal plant alcoholic extracts. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1585-1592, 2011.

FERREIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, R. N.; DE OLIVEIRA, D. N.; ESTEVES, C. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; CATHARINO, R. R.. Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: An expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 385-391, 2015.

FISCHER, N.; CANTRELL, C.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; QUIJANO, L.; FRANZBLAU, S.. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 559-564, 1998.

FONSECA, C. S. M.; FILHO, A. A. P.; SANTOS, B. S.; SILVA, C. A.; DOMINGUES, A. L. C.; OWEN, J. S.; LIMA, V. L. M. Human Plasma Lipid Modulation in Schistosomiasis *Mansoni* Depends on Apolipoprotein E Polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p.e101964, 2014.

GARBA, A.; LAMINE, M. S.; BARKIRÉ, N.; DJIBO, A.; SOFO, B.; GOUVRAS, A. N.; LABBO, R.; SEBANGOU, H.; WEBSTER, J. P.; FENWICK, A.; UTZINGER, J.. Efficacy and safety of two closely spaced doses of praziquantel against *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* and re-infection patterns in school-aged children in Niger. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 334-344, 2013.

GBIF. The Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy, 2013. Disponível em: <http://www.gbif.org/species/3121319>. Acesso: 10 de Setembro de 2014.

GESZPRYCH, A.; PRZYBYŁ, J. L.; KUCZERENKO, A.; WĘGLARZ, Z.. Diversity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) growing wild in Poland in respect of the content and composition of essential oil and phenolic compounds. **Acta Horticulturae**, v. 925, p. 123-130, 2011.

GHAFOORI, H.; SARIRI, R.; NAGHAVI, M. R.. Study of effect of extraction conditions on the biochemical composition and antioxidant activity of *Artemisia absinthium* by HPLC and TLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 11, p. 1558-1567, 2013.

GHANTOUS, A.; GALI-MUHTASIB, H.; VUORELA, H.; SALIBA, N. A.; DARWICHE, N.. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15, p. 668-678, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.

GODINHO, L. S.; CARVALHO, L. S. A.; BARBOSA DE CASTRO, C.C.; DIAS, M. M.; PINTO, P. F.; CROTTI, A. E. M.; PINTO, P. L. S.; MORAES, J. DA SILVA FILHO, A.A. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Shistosoma mansoni*. **The Scientific World Journal**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/460342>. Acesso: 18 de Setembro de 2014.

GONZALEZ-COLOMA, A.; BAILEN, M.; DIAZ, C. E.; FRAGA, B. M.; MARTINEZ-DÍAZ, R.; ZUNIGA, G. E.; CONTRERAS, R. A.; CABRERA, R.; BURILLO, J.. Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 401-407, 2012.

GRYSEELS, B.. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.

GUGLIELMO, S.; CORTESE, D.; VOTTERO, F.; ROLANDO, B.; KOMMER, V. P.; WILLIAMS, D. L.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.. New praziquantel derivatives containing NO-donor furoxans and related furazans as active agents against *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 135-145, 2014.

GUIMARÃES, R. J. P. S.; FREITAS, C. C.; DUTRA, L. V.; OLIVEIRA, G.; CARVALHO, O. S.. Multiple Regression for the Schistosomiasis Positivity Index Estimates in the Minas Gerais State - Brazil at Small Communities and Cities Levels, Parasitic Diseases - Schistosomiasis, Prof. Rashika El Ridi (Ed.), 2014. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/parasitic-diseases-schistosomiasis/multiple-regression-for-the-schistosomiasis-positivity-index-estimates-in-the-minas-gerais-state-bra>. Acesso: 10 de Março de 2015.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M.. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2ª edição, ELSEVIER, 2012.

HEUER, C.; HUGO, P.; MANN, G.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.. Scale-up in preparative chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 752, n. 19, 1996.

HUANG, M-Y.; ZHONG, L-J.; XIE, J-M.; WANG, F.; ZHANG, Y-H.. A New Taraxastane-Type Triterpene from *Vitex trifolia* var. *simplicifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, n. 11, p. 2040-2045, 2013.

HUYSE, T.; VAN DEN BROECK, F.; JOMBART, T.; WEBSTER, B. L.; DIAW, O.; VOLCKAERT, F. A. M.; BALLOUX, F.; ROLLINSON, D.; POLMAN, K.. Regular treatments of praziquantel do not impact on the genetic make-up of *Schistosoma mansoni* in Northern Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 100-105, 2013.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; ASHRAF, M.; JABBAR, A.. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 265-268, 2004.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L-F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L.. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JENKINS-HOLICK, D. S.; KAUL, T. L.. Schistosomiasis.(Report). **Urologic Nursing**, v. 33, n. 4, p. 163, 2013.

JISAKA, M.; KAWANAKA, M.; SUGIYAMA, H.; TAKEGAWA, K.; HUFFMAN, M. A.; OHIGASHI H.; KOSHIMIZU, K.. Antischistosomal Activities of Sesquiterpene Lactones and Steroid Glucosides from *Vernonia amygdalina*, Possibly Used by Wild Chimpanzees against Parasite-related Diseases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 845-846, 1992.

JOSHI, R. R.. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 7, p. 888-892, 2013.

KASAMOV, S.; ABDULLAEV, M.; YUSUNOV, M.; SIDYAKIN, G.; YAGUDAEV, M.. New guaianolides from *Artemisia absinthium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 20, n. 6, p. 754-755, 1984.

KÄSTNER, N.; RICHTER, S. H.; LESCH, K.-P.; SCHREIBER, R. S.; KAISER, S.; SACHSER, N.. Benefits of a "vulnerability gene"? A study in serotonin transporter knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 283, p. 116-120, 2015.

KASYMOV, S.; ABDULLAEV, N.; ZAKIROV, S.; SIDYAKIN, G.; YAGUDAEV, M.. Artemolin — A new guaianolide from *Artemisia absinthium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 15, n. 5, p. 577-579, 1979.

KELSEY, R. G.; SHAFIZADEH, F.. Glandular Trichomes and Sesquiterpene Lactones of *Arternisia nova* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 8, n. 4, p. 371-377, 1980.

KENNY, O.; SMYTH, T. J.; WALSH, D.; KELLEHER, C. T.; HEWAGE, C. M.; BRUNTON, N. P.. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, v. 161, p. 79-86, 2014.

KOIRALA, N.; PANDEY, R. P.; PARAJULI, P.; JUNG, H. J.; SOHNG, J. K.. Methylation and subsequent glycosylation of 7,8-dihydroxyflavone. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 128-137, 2014.

KONÉ, W. M.; VARGAS, M.; KEISER, J.. Anthelmintic activity of medicinal plants used in Côte d'Ivoire for treating parasitic diseases. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2351-2362, 2012.

LAHLOU, M.. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LAMBERTUCCI, J. R.. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, 2010.

LAMBERTUCCI, J. R.; DRUMMOND, S. C.; VOIETA, I.; CHAVES, B. A.; PRATA, P. H.; DE QUEIRÓZ, L. C.; PEREIRA, P. P. N.; BOTELHO, P. P.; OTONI, A.; VILELA, J. F.; ANTUNES, C. M.. An outbreak of acute schistosoma mansoni schistosomiasis in a nonendemic area of Brazil: A report on 50 cases, including 5 with severe clinical manifestations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 1, p. e1, 2013.

LIU, E.; KUANG, Y.; HE, W.; XING, X.; GU, J.. Casticin Induces Human Glioma Cell Death through Apoptosis and Mitotic Arrest. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 805-814, 2013.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, P. P.. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL Nativas e Exóticas, 2ª Ed., 2008.

MA, C.-M.; NAKAMURA, N.; MIN, B. S.; HATTORI, M.. Triterpenes and Lignans from *Artemisia caruifolia* and Their Cytotoxic Effects on Meth-A and LLC Tumor Cell Lines. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 2, p. 183-187, 2001.

MAGALHÃES, L.; MACHADO, C.; MORAIS, E.; MOREIRA, E.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S.; DA SILVA, A. A.; RODRIGUES, V.. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009.

MAGALHÃES, L.; SOUZA, J.; WAKABAYASHI, K.; LAURENTIZ, R.; VINHÓLIS, A.; REZENDE, K.; SIMARO, G.; BASTOS, J.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V.; FERREIRA, D.; CROTTI, A.; CUNHA, W.; SILVA, M.. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012.

MARTÍN, L.; JULIO, L. F.; BURILLO, J.; SANZ, J.; MAINAR, A. M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.. Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1615-1621, 2011.

MARTINS, A.; MIGNON, R.; BASTOS, M.; BATISTA, D.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; VIZETTO-DUARTE, C.; CUSTÓDIO, L.; VARELA, J.; RAUTER, A. P.. *In vitro* Antitumoral Activity of Compounds Isolated from *Artemisia gorgonum* Webb. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 9, p. 1329-1334, 2014.

MATOS-ROCHA, T. J.; DOS SANTOS CAVALCANTI, M. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; VERAS, D. L.; FEITOSA, A. P. S.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; DE ALMEIDA, R. N.; MARQUES, M. O. M.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A.. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Planta medica**, v. 79, n. 14, p. 1307, 2013.

MELMAN, S. D.; STEINAUER, M. L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L. S.; MWANGI, I. N.; WYNN, N. B.; MUTUKU, M. W.; KARANJA, D. M. S.; COLLEY, D. G.; BLACK, C. L.; SECOR, W. E.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S.. Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e504, 2009.

MHN. Museu da História Natural. *Schistosoma mansoni* (trematode flatworm), 2013. Disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/schistosoma-mansoni/>. Acesso: 22 de Julho de 2014.

MIDZI, N.; MDULUZA, T.; CHIMBARI, M. J.; TSHUMA, C.; CHARIMARI, L.; MHLANGA, G.; MANANGARIZA, P.; MUNYATI, S. M.; PHIRI, I.; MUTAMBU, S. L.; MIDZI, S. S.; NCUBE, A.; MURANZI, L. P.; RUSAKANIKO, S.; MUTAPI, F.. Distribution of Schistosomiasis and Soil Transmitted Helminthiasis in Zimbabwe: Towards a National Plan of Action for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p: e3014, 2014.

MILLER, L. H.; SU, X.. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 855-858, 2011.

MOJARRAB, M.; NADERI, R.; AFSHAR, F. H.. Screening of different extracts from *Artemisia* species for their potential antimalarial activity. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 2, p. 603-608, 2015.

MOJARRAB, M.; SHIRAVAND, A.; DELAZAR, A.; AFSHAR, F. H.. Evaluation of *In Vitro* Antimalarial Activity of Different Extracts of *Artemisia aucheri* Boiss. and *A. armeniaca* Lam. and Fractions of the Most Potent Extracts. **The Scientific World Journal**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/825370>. Acesso: 18 de Setembro de 2014.

MONE, H.; MINGUEZ, S.; IBIKOUNLE, M.; ALLIENNE, J.; MASSOUGBODJI, A.; MOUAHID, G.. Natural Interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. **The Scientific World Journal**, 2012. . Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/793420>. Acesso: 18 de Setembro de 2014.

MS. Ministério da Saúde - PORTAL DA SAÚDE, 2010. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/component/search/?searchword=plantas%20medicinais&ordering=newest&searchphrase=all>. Acesso: 14 de Setembro de 2014.

MS. Ministério da Saúde - Situação Epidemiológica – Dados, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso: 10 de Dezembro de 2014.

MS. Ministério da Saúde - VIGILÂNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI Diretrizes Técnicas. Brasília, 2014a.

NALBANTSOY, A.; EREL, S. B.; KÖKSAL, C.; GÖÇMEN, B.; YILDIZ, M. Z.; YAVASOGLU, N. Ü, K.. Viper venom induced inflammation with *Montivipera xanthina* (Gray, 1849) and the anti-snake venom activities of *Artemisia absinthium* L. in rat. **Toxicon**, v. 65, p. 34-40, 2013.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F.. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

NDJONKA, D.; RAPADO, L. N.; SILBER, A. M.; LIEBAU, E.; WRENGER, C.. Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395-3439, 2013.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; FITTIPALDI, J. F.; LAMBERTUCCI, J. R.; TEIXEIRA, M. M.; ANTUNES, C. M. D. F.; CARNEIRO, M.. Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88042, 2014.

NETO, R. L. M.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; FILHO, J. M. B.; OLIVEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.. Morphological and physiological changes in *Leishmania promastigotes* induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215-221, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p. 311-335, 2012.

NIST. Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director, "Retention Indices" in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899. Disponível em <http://webbook.nist.gov>. Acesso: 11 de Junho de 2015.

NORMAN, F. F.; AYALA, A. P.; PÉREZ-MOLINA, J. A.; MONGE-MAILLO, B.; ZAMARRÓN, P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.. Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e762, 2010.

NWODO, N.; OKOYE, F.; LAI, D.; DEBBAB, A.; KAISER, M.; BRUN, R.; PROKSCH, P.. Evaluation of the *in vitro* trypanocidal activity of methylated flavonoid constituents of *Vitex simplicifolia* leaves. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 82, 2015.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, 2010a. Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/. Acesso: 25 de Agosto de 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Guidelines for the treatment of malaria, 2010b. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf?ua=1. Acesso: 25 de Agosto de 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Map production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), 2013. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Schistosomiasis_2012.png. Acesso: 25 de Agosto de 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Schistosomiasis, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/topics/schistosomiasis/en/>. Acesso: 20 de Março de 2015.

PATOCKA, N.; SHARMA, N.; RASHID, M.; RIBEIRO, P.. Serotonin Signaling in *Schistosoma mansoni*: A Serotonin-Activated G Protein-Coupled Receptor Controls Parasite Movement. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003878, 2014.

PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; LAMPMAN, G.M. Introdução À Espectroscopia - Tradução da 4ª Edição Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PELKONEN, O.; ABASS, K.; WIESNER, J.. Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 100-107, 2013.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N.. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Advances in Parasitology*. London, Academic Press, v.6, p. 233-290, 1968

PICMAN, A. K.. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

RAMAZANI, A.; SARDARI, S.; ZAKERI, S.; VAZIRI, B.. *In vitro* antiplasmodial and phytochemical study of five *Artemisia* species from Iran and *in vivo* activity of two species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 593-599, 2010.

RAPADO, L.; FREITAS, G.; POLPO, A.; ROJAS-CARDOZO, M.; RINCÓN, J.; SCOTTI, M.; KATO, M.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.. A Benzoic Acid Derivative and Flavokawains from Piper species as Schistosomiasis Vector Controls. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5205, 2014.

RETA, B.; ERKO, B.. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment for *Schistosoma mansoni* infection in school children in Senbete Town, northeastern Ethiopia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 11, p. 1338-1343, 2013.

RIBANI, M. Obtenção e aplicação de padrões de isoflavonas de soja, 2008. Tese - UNICAMP.

SAFAROVA, A.; SERKEROV, S.. Sesquiterpene lactones of *Artemisia absinthium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 33, n. 6, 653-654, 1997.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.. Natural Products Isolation. London, Springer New York Dordrecht Heidelberg, 2012.

SATO, Y.; SUZAKI, S.; NISHIKAWA, T.; KIHARA, M.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 483-488, 2000.

SCHORR, K.; DA COSTA, F.. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 3, p. 161-165, 2005.

SCOTTI, M. T.; EMERENCIANO, V.; FERREIRA, M. J. P.; SCOTTI, L.; STEFANI, R.; SILVA, M. S.; JUNIOR, F. J. B. M.. Self-Organizing Maps of Molecular Descriptors for Sesquiterpene Lactones and Their Application to the Chemotaxonomy of the Asteraceae Family. **Molecules**, v.17, n. 4, p. 4684-4702, 2012.

SHAFI, G.; HASAN, T.N.; SYED, N.A.; AL-HAZZANI, A.A.; ALSHATWI, A.A.; JYOTHI, A.; MUNSHI, A.. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p. 7373-7379, 2012.

SILVA, A. A.; ANDRADE, L. D. H. C.. Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do Nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 93-104, 2013.

Silva, M.; Oliveira, G.; de Carvalho, R.; de Sousa, D.; Freitas, R.; Pinto, P.; Moraes, J.. Antischistosomal Activity of the Terpene Nerolidol. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793, 2014.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J.. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

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

SQUIRES, J. M.; FERREIRA, J. F. S.; LINDSAY, D. S.; ZAJAC, A. M.. Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

TARIKU, Y., HYMETE, A., HAILU, A., ROHLOFF, J.. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 614-623, 2011.

TARIQ, K. A.; CHISHTI, M. Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A. S.. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1, p. 83-88, 2009.

TONUCI, L. R. S.; MELO, N. I. D.; DIAS, H. J.; WAKABAYASHI, K. A. L.; AGUIAR, G. P.; AGUIAR, D. P.; MANTOVANI, A. L. L.; RAMOS, R. C.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; CUNHA, W. R.; SILVA FILHO, A. A. D.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M.. *In vitro* schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 88-93, 2012.

TULAKE, A.; JIANG, Y.; TU, P-F.. Nine lignans from *Artemisia absinthium* L. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 360-364, 2012.

TURAK, A.; SHI, S-P.; JIANG, Y.; TU, P-F.. Dimeric guaianolides from *Artemisia absinthium*. **Phytochemistry**, v. 105, p. 109-114, 2014.

UMPIÉRREZ, M. L.; LAGRECA, M. E.; CABRERA, R.; GRILLE, G.; ROSSINE, C.. Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 339-350, 2012.

URBAN, J.; KOKOSKA, L.; LANGROVA, I.; MATEJKOVA, J.. *In Vitro* Anthelmintic Effects of Medicinal Plants Used in Czech Republic. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 808-813, 2008.

USEH, M. F.. Schistosomiasis, 2013. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.5772/53553>. Acesso: 20 de Março de 2015.

UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TU, Z.; XIAO, S.; TANNER, M.. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 318-323, 2002.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; N'GORAN, E. K.; CAFFREY, C. R.. From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, n. 1, p. S121-S137, 2011.

VALDERRÁBANO, CALVETE, C.; URIARTE, J.. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 89-94, 2010.

VALIAKOS, E.; MARSELOS, M.; SAKELLARIDIS, N.; CONSTANTINIDIS, T.; SKALTSA, H.. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Antidotes” in Nikolaos Myrepsos’ Dynameron. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 68-82, 2015.

VERMA, A. K.; PRATAP, R.. Chemistry of biologically important flavones. **Tetrahedron**, v. 68, n. 41, p. 8523-8538, 2012.

VICHNEWSKI, W.; SARTI, S. J.; GILBERT, B.; HERZ, W.. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 191-193, 1976.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J-P.; WENNERBERG, T.; VUORELA, H.. Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p.1375-1389, 2004.

WANG, H.; FANG, Z-Z.; ZHENG, Y.; ZHOU, K.; HU, C.; KRAUSZ, K. W.; SUN, D.; IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J.. Metabolic profiling of praziquantel enantiomers. **Biochemical Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 166–178, 2014.

WEATHERS, P. J.; TOWLER, M. J.. The Flavonoids Casticin and Artemetin Are Poorly Extracted and Are Unstable in an *Artemisia annua* Tea Infusion. **Planta Medica**, v. 78, n. 10, p. 1024-1026, 2012.

XU, J-F.; LV, S.; WANG, Q-Y.; QIAN, M-B.; LIU, Q.; BERGQUIST, R.; ZHOU, X-N.. Schistosomiasis japonica: Modelling as a tool to explore transmission patterns. **Acta Tropica**, v. 141, p. 213-222, 2015.

YOSHIOKA, T.; INOKUCHI, T.; FUJIOKA, S.; KIMURA, Y.. Phenolic Compounds and Flavonoids as Plant Growth Regulators from Fruit and Leaf of

Vitex rotundifolia. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 59c, p. 509-514, 2004.

YOUSIF, F.; HIFNAWY, M. S.; SOLIMAN, G.; BOULOS, L.; LABIB, T.; MAHMOUD, S.; RAMZY, F.; YOUSIF, M.; HASSAN, I.; MAHMOUD, K.; EL-HALLOUTY, S. M.; EL-GENDY, M.; GOHAR, L.; EL-MANAWATY, M.; FAYYAD, W.; EL-MENSHAWI, B.S. Large-scale *in vitro* screening of Egyptian native and cultivated plants for schistosomicidal activity. **Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)**, v. 45, p. 501-510, 2007.

YOUSIF, F.; WASSEL, G.; BOULOS, L.; LABIB, T.; MAHMOUD, K.; EL-HALLOUTY, S.; EL BARDICY, S.; MAHMOUD, S.; RAMZY, F.; GOHAR, L.; EL-MANAWATY, M.; EL GENDY, M.; FAYAD, W.; EL-MENSHAWI, B.. Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 732-739, 2012.

ZAFAR, M. M.; HAMDARD, M. E.; HAMEED, A.. Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects of *Plasmodium berghei* in mice: A preliminary report. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 223-226, 1990.

ZHU, L.; DAI, J. L.; YANG, L.; QIU, J.. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 112-117, 2013.