

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Luana Carla Saço**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA ARCTIINA,  
EXTRAÍDA DE *Arctium lappa* L.**

Juiz de Fora  
2015

**LUANA CARLA SAÇO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA ARCTIINA,  
EXTRAÍDA DE *Arctium lappa* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

**Orientadora:** Dra. Priscila de Faria Pinto

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)

Saço, Luana Carla.  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA ARCTIINA,  
EXTRAÍDA DE *Arctium lappa* L. / Luana Carla Saço. -- 2015.  
73 p. : il.

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

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Arctiina. 3. *Arctium lappa*. 4. Granuloma. I. Faria Pinto, Priscila de , orient. II. Título.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA ARCTIINA,  
EXTRAÍDA DE *Arctium lappa* L.**

**LUANA CARLA SAÇO**

**ORIENTADORA: Dra. Priscila de Faria Pinto**

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 30 / 07 / 2015



---

Dra. Flávia Fernanda Búbula Couto  
Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas Gerais



---

Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Dra. Priscila de Faria Pinto  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta dissertação a todos que  
contribuíram para a minha conquista.

Aos meus amigos, familiares,  
principalmente ao meu esposo Alexandre  
e a minha mãe Maria de Fátima.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar e guiar o meu caminho, me dando força e persistência diante das dificuldades possibilitando assim a conquista de mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais pela presença constante. Em especial a minha mãe que me auxilia e apoia em todos os momentos.

Ao meu esposo Alexandre, pelo amor, dedicação e parceria na vida. Principalmente pela paciência e constante presença. Te amo!

Aos meus irmãos Nicolas e Lívia, sobrinhos, afilhados, cunhados e Sra. Sueli pela convivência em família, pelos momentos de descontração e pela torcida.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Priscila de Faria Pinto, minha querida orientadora, por ter me aceitado como aluna de mestrado, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de sua maravilhosa equipe, pela confiança e total apoio. Agradeço principalmente pela paciência e acima de tudo pelas contribuições para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

A todos os colegas do Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas da UFJF por me receberem, me auxiliarem e compartilharem suas experiências: Michéla, Nayara, Danielle e Priscila (novas amigas), o meu muito obrigada pela paciência, disponibilidade e ajuda. Aos novos integrantes (ICs e Patrícia) o meu apoio. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eveline e sua equipe pelo apoio e ensinamentos.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ / MG, ao Prof. Dr. Ademar Alves Da Silva Filho (NIPPAN), ao Prof. Dr. Jorge Willian e a aluna Dalyara (LaFaCE) e a Prof<sup>ª</sup>. Esp<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Esteves Rabelo, pelas contribuições ao projeto, pela atenção e carinho.

Ao Laboratório de Estudo e Função de Proteínas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade e suporte oferecido para a realização deste trabalho.

As agências de fomento (Fapemig, CAPES, CNPq) pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que contribuíram para a minha trajetória acadêmica. Aos amigos e familiares que me incentivaram e compreenderam os meus momentos de ausência. Obrigada pelo carinho e orações.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso aprendemos sempre.”

*Paulo Freire*

## RESUMO

A esquistossomíase é considerada uma das doenças tropicais negligenciada mais significativa no mundo. Sendo que a presença de apenas um medicamento para o tratamento da infecção leva a busca por novos compostos esquistossomicidas, utilizando os produtos naturais como uma das principais fontes destas novas moléculas. Neste sentido, a lignana Arctiina extraída da espécie *Arctium lappa*, cujas funções anti-inflamatórias e antiproliferativas já foram descritas na literatura, se tornou alvo do nosso estudo. O nosso propósito foi pesquisar a sua ação esquistossomicida através de testes *in vitro* e em modelo murino. A substância foi utilizada nas concentrações de 30, 60, 120 e 240 µg/mL nos ensaios *in vitro*. Após o período de incubação, em nenhuma das concentrações, a molécula foi capaz de promover modificação na viabilidade do parasito em cultura quando comparado ao grupo controle. Após a administração por via intraperitoneal, para verificar a presença da substância no plasma murino, foi realizada uma análise cromatográfica. A análise da amostra de arctiina pura, diluída em metanol, e diluída em plasma murino não tratado mostrou um pico no cromatograma medido a 254 nm, com retenção de 5 minutos. A amostra de plasma animal coletada após uma hora de tratamento com arctiina, sob as mesmas condições experimentais, revelou um pico semelhante ao da amostra pura, confirmando que a arctiina está disponível no plasma após administração. Os testes *in vivo*, foram realizados em camundongos fêmeas da linhagem Swiis que receberam por via intraperitoneal duas dosagens de arctiina (50 mg/kg), sendo a primeira administrada 20 dias após a infecção e a segunda após duas semanas. Nos parâmetros analisados: peso hepático, leucometria global, redução da carga parasitária e alteração no oograma, não foi verificado nenhuma alteração significativa em relação aos parâmetros encontrados no grupo controle infectado, tratado com praziquantel (200 mg/kg) e Dimetilsulfóxido (0,5%). O resultado mais promissor foi uma redução das médias das áreas dos granulomas, a administração da arctiina provocou uma redução em torno de 20% em comparação com o controle infectado. Mais estudos devem ser realizados a fim de verificar o possível

mecanismo de atuação sobre os componentes inflamatórios presentes na formação do granuloma.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Arctiina. *Arctium lappa*. Granuloma.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the most significant neglected tropical diseases in the world. Only one drug is currently available for the treatment and control of schistosomiasis, therefore there is an urgent need for the development of new schistosomicide compounds, being natural products an important source of these molecules. Hence, in this work we studied the lignan arctiin extracted from *Arctium lappa* species, whose anti-inflammatory and antiproliferative functions have been previously described. Our aim was to investigate *in vitro* and *in vivo* its schistosomicidal activity. We tested the compound *in vitro* at the follow concentrations 30, 60, 120 and 240 ug/ml. There was no difference in all tested concentrations in the viability of the parasite in the culture after the incubation when compared to the control group. In addition we verified the plasmatic concentration of arctiin after intraperitoneal administration in mice by chromatographic analysis. The analysis of pure arctiin diluted in either methanol or mouse plasma showed a peak in the chromatogram at retention time of 5 minutes, absorbance was measured at 254 nm. Animal plasma sample collected one hour after treatment with arctiin was analyzed under same experimental conditions and revealed a similar peak, confirming the availability of arctiin in the plasma following administration. The *in vivo* tests were performed in Swiss female mice, those were intraperitoneally injected with two dosages of arctiin (50 mg/kg) - the first administered 20 days after infection and the second two weeks later. The follow parameters were analyzed: liver weight, white blood cell count, parasitic load and oogram. We did not find any significant change in those parameters comparing infected control groups treated either with praziquantel (200 mg / kg) or dimethyl sulfoxide (0.5 %) to the group treated with arctiin. The most promising result was the reduction around 20% of the average area of the granuloma in the arctiin group compared with the infected control. More studies are needed to verify possible mechanisms of action of this molecule in inflammatory components that play a role in granuloma formation.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. *Arctiin*. *Arctium lappa*. Granuloma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico do parasito <i>Schistosoma mansoni</i> .	19
Figura 2	Estrutura química do Oxamniquina.	22
Figura 3	Estrutura química do Praziquantel (PZQ).	23
Figura 4	Aspectos morfológicos das folhas e flores da <i>Arctium lappa</i> ( <i>Asteraceae</i> ).	26
Figura 5	Estrutura química da Arctiina.	27
Figura 6	Efeitos sobre os vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> mantidos em cultura.	38
Gráfico 1	Varredura espectral da solução de Arctiina em metanol na concentração de 1:10.	39
Gráfico 2	Análise cromatográfica do plasma murino e a identificação da presença de Arctiina.	41
Gráfico 3	Representação gráfica do peso hepático relativo dos animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	43
Gráfico 4	Representação gráfica da leucometria global média em amostras de sangue de animais infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	44
Gráfico 5	Representação gráfica da porcentagem de ovos maduros e imaturos analisados nos oogramas de camundongos Swiss infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	46
Figura 7	Avaliação dos ovos através do oograma, obtidos a partir de um fragmento intermediário do íleo observados, entre lâminas, em microscopia óptica convencional (10x).	47
Gráfico 6	Representação gráfica das médias das áreas dos granulomas hepáticos medidos em cortes histológicos dos grupos de animais infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	48

Figura 8	Imagens dos granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina, corados por hematoxilina-eosina.	49
Figura 9	Imagens dos arranjos de fibras colágenas de granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Disposição dos animais em grupos experimentais com os respectivos tratamentos.	34
Tabela 2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade esquistossomicida da Arctiina. Os casais (n=4) de vermes adultos foram mantidos em cultura durante 7 dias, incubados a 37°C e em atmosfera com 5% de CO <sub>2</sub> . Foram utilizadas diferentes concentrações de Arctiina e os parâmetros de viabilidade dos vermes adultos foram avaliados.	38
Tabela 3	Peso Médio dos camundongos (g). Os grupos de camundongos infectados tiveram os seus pesos assinalados antes de serem eutanasiados.	42
Tabela 4	Peso hepático relativo do órgão removido após eutanásia dos animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	42
Tabela 5	Contagem global média de leucócitos (por mm <sup>3</sup> de sangue) em amostras de sangue de animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.	43
Tabela 6	Número de vermes totais recuperados por perfusão salina após o tratamento e distribuição percentual dos vermes alojados no fígado e mesentério.	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.	<i>Arctium</i>
ANOVA	Análise de Variância
BH	Belo Horizonte
Caco- 2	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon retal
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HE	Hematoxilina – Eosina
IL	Interleucina
KK	Kato-Katz
LaFace	Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental
M	Média aritmética
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffer Saline – Tampão Fosfato-Salino
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZQ	Praziquantel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S.	<i>Schistosoma</i>
SD	Desvio Padrão
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 ESQUISTOSSOMOSE .....	17
1.1.1 Aspectos gerais .....	17
1.1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial .....	19
1.1.3 Tratamento .....	21
1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS .....	23
1.3 A ESPÉCIE <i>Arctium lappa</i> E A LIGNANA ARCTIINA .....	25
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 OBTENÇÃO DAS DROGAS ARCTIINA E PRAZICUANTEL .....	30
3.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	30
3.2.1 Aspectos Éticos .....	30
3.2.2 Infecção do animal e ciclo do parasito .....	30
3.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atuação da Arctiina sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	31
3.3 IDENTIFICAÇÃO DA ARCTIINA NO PLASMA MURINO .....	32
3.3.1 Varredura espectral .....	32
3.3.2 Condições Cromatográficas .....	32

3.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	33
<b>3.4.1 Grupo de animais</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.2 Peso hepático</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.3 Contagem da Leucometria Global</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.4 Avaliação parasitológica sobre o número de vermes recuperados</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.5 Análise qualitativa e quantitativa do oograma</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.6 Análise dos granulomas</b> .....	<b>36</b>
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROMOVIDAS PELA ARCTIINA SOBRE VERMES ADULTOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> .....	37
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ARCTIINA EM PLASMA MURINO .....	39
<b>4.2.1 Varredura espectral</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.2 Identificação da Arctiina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	<b>39</b>
4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ARCTIINA EM MODELO DE ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL .....	41
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESQUISTOSSOMOSE

### 1.1.1 Aspectos gerais

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por um platelminto do gênero *Schistosoma*, pertencente à classe *Trematoda*, sendo que as principais espécies causadoras de doenças são: *Schistosoma mansoni* (África, Saudita, e América do Sul), *Schistosoma japonicum* (China e Sudeste Asiático) e *Schistosoma haematobium* (África e da Arábia) (ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006). As espécies *Schistosoma intercalatum* (África Ocidental e Central), *Schistosoma mekongi* (Mekong Delta) e *Schistosoma malayensis* (Malásia) estão limitadas a alguns focos locais, sendo consideradas de menor importância. Em todas as espécies os vermes adultos são morfologicamente semelhantes, diferenciando-se apenas pela espécie de hospedeiro intermediário que infectam e na forma de evolução da doença no hospedeiro definitivo (GRYSEELS, 2012).

A esquistossomose encontra-se entre as Doenças Tropicais Negligenciadas, catalogadas pelo Plano Global de Combate (2008-2015), organizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo considerada a segunda doença parasitária mais socioeconomicamente devastadora. A OMS aponta para números em torno de 700 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sendo registradas anualmente mais de 200.000 mortes, sendo que a maioria dos casos envolvem crianças (ROKNI, 2012; GRAY et al., 2011).

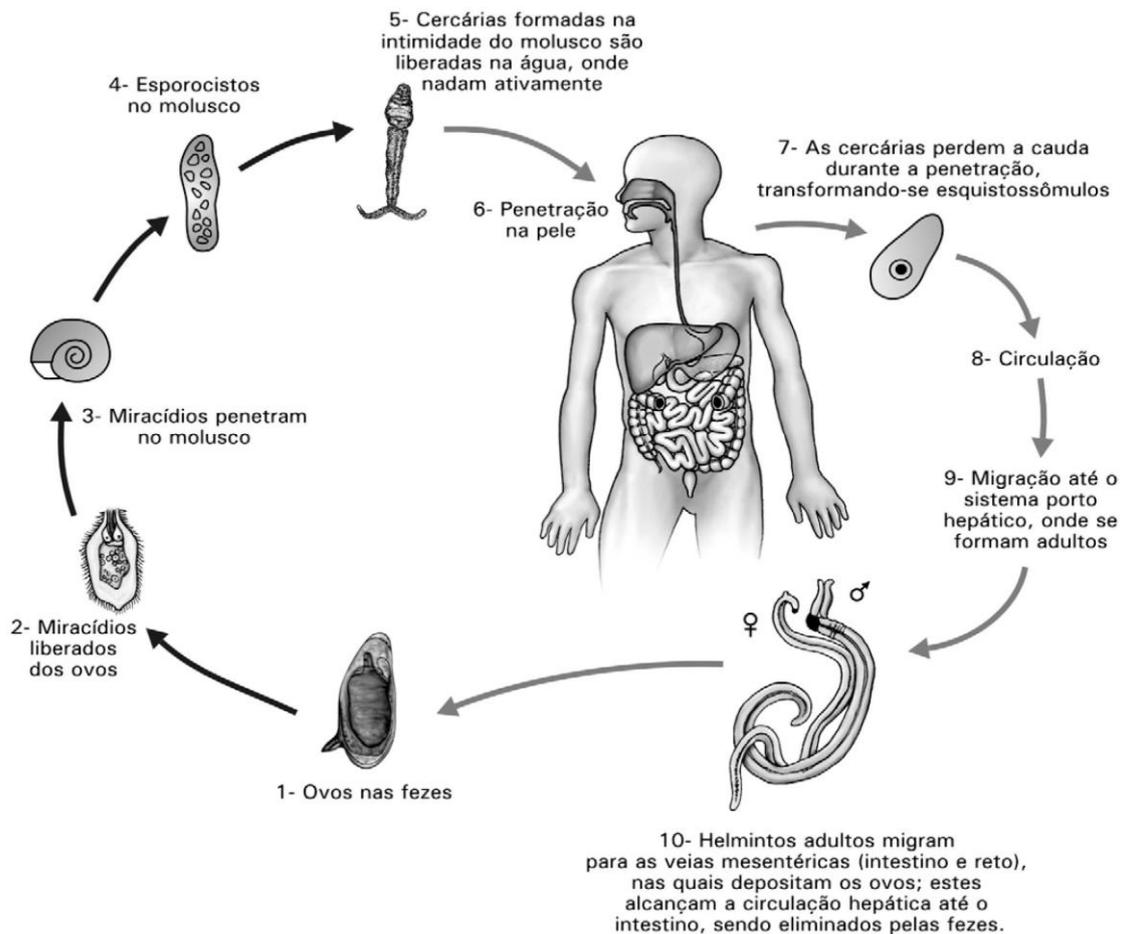
O *S. mansoni* é a única espécie que mantém a infecção no Brasil. Segundo Rokni (2012) e Gray et al. (2011) estima-se que 7,1 milhões de pessoas estão infectadas com *S. mansoni* nas Américas, dos quais 95% dos casos são brasileiros. No Brasil cerca de 99% dos casos estão localizados nas regiões Nordeste e Sudeste (BRASIL, 2014), sendo Minas Gerais o estado com

a maior área endêmica. A doença ocorre em 517 dos 853 municípios mineiros, prevalecendo os municípios das Zonas Norte, Leste e os limítrofes com o Espírito Santo (BRASIL, 2011).

A patogênese da esquistossomose irá depender da interação entre o parasito e o seu hospedeiro definitivo (SOUZA et al., 2011). Morfologicamente os vermes adultos são dióicos, medindo cerca de 1-2 cm de comprimento e 0,3-0,6 mm de largura; se alimentam de células do sangue e habitam as veias portais e mesentéricas do hospedeiro definitivo (LAMBERTUCCI, 2010; GRYSEELS, 2012). No Brasil o tratamento da doença se baseia principalmente na utilização de dois medicamentos, o Praziquantel de amplo espectro e o Oxamniquine capaz de tratar apenas a infecção pela espécie *S. mansoni* (BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013).

A transmissão da esquistossomose mansônica ocorre através do contato com a água contaminada com as formas infectantes, larvas denominadas cercárias. A contaminação hídrica ocorre através da presença de ovos que são excretados nas fezes dos hospedeiros mamíferos infectados. Em contato com água e sob condições adequadas de luz e salinidade o ovo libera o miracídio. Estes ciliados se sentem estimulados pela luz e alguns compostos químicos que favorecem o seu encontro com caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários. Depois de penetrar no caramujo, os miracídios multiplicam-se assexuadamente em esporocistos multicelulares e depois se transformam em larvas cercárias. As cercárias abandonam o hospedeiro invertebrado após 4-6 semanas da infecção. Estas formas infectantes penetram ativamente através da pele dos hospedeiros mamíferos que se encontram em contato com as coleções hídricas cotaminadas. Ao penetrar pela pele, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos, estes migram pela corrente sanguínea até no fígado, onde se transformam em vermes adultos, os quais se deslocam para o seu destino perivesicular ou mesentérico (GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, 2012; GRAY et al., 2011). Este ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* pode ser visualizado na figura 1.

Figura 1 – Ciclo biológico do parasito *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SOUZA et al., 2011.

### 1.1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial

Os sinais e sintomas (quadro clínico) da doença dependem da carga parasitária e da resposta do sistema imune do hospedeiro. Geralmente incluem uma fase inicial, caracterizada por uma dermatite na área onde as cercárias penetraram, sendo que a gravidade irá depender da quantidade de parasitos e da duração em que permanecerão na derme; uma fase aguda sistêmica, causada pela migração dos esquistossômulos no sistema circulatório, onde há o aparecimento de alguns sintomas como febre elevada, mal-estar geral, astenia, anorexia, náuseas, vômitos e o desenvolvimento de lesões inflamatórias transitórias, duram em média de quatro a oito semanas, em alguns órgãos como pulmão (arteriolite) e fígado (hepatite aguda). A fase crônica da infecção pode se apresentar de maneira polimórfica, porém, órgão

específica sendo caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de imunocomplexos e granulomas em tornos dos ovos que ficam aprisionados nos tecidos, levando ao surgimento de complicações como a fibrose hepática, a hipertensão portal e a ascite (BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013; SOUZA et al., 2011).

A patogenia da doença ocorre principalmente devido a resposta inflamatória excessiva ou desregulada contra o parasito e também contra os ovos presos nos tecidos. Inicialmente o hospedeiro desenvolve durante a fase aguda uma resposta imune Th1, dirigida ao verme adulto. A partir da oviposição e deposição destes nos tecidos a resposta imune é gradualmente deslocada para um perfil predominante de resposta Th2, humoral, que culmina com a formação dos granulomas (HAMS, AVIELLO e FALLON, 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

A avaliação laboratorial diagnóstica é realizada utilizando, principalmente, testes parasitológicos e imunológicos. O diagnóstico convencional se baseia na detecção microscópica de ovos do parasito nas fezes, sendo Kato-Katz (KK) a técnica parasitológica recomendada, uma técnica quantitativa, de baixo custo e de fácil execução. Apesar de ser o padrão ouro de diagnóstico para esquistossomose, existe a possibilidade de resultados falsos negativos quando se analisam pequenas porções de fezes e uma única lâmina por paciente (SIQUEIRA et al., 2015).

Os ensaios imunológicos são complementares ao exame parasitológico tradicional podendo destacar as reações de fixação do complemento, imunofluorescência indireta e técnicas imunoenzimáticas (*Enzyme linked immuno sorbent assay* – ELISA) (VITORINO et al., 2012).

Os métodos moleculares, como a PCR, são úteis na detecção de baixa carga parasitária além de serem altamente sensíveis, porém o custo é muito elevado, restringindo sua aplicação atual exclusivamente para pesquisa (SIQUEIRA et al., 2015). A biópsia retal e a hepática também constituem métodos auxiliares e de alta positividade, porém seu uso é restrito, sendo recomendados apenas em casos específicos, por se tratar de técnicas invasivas (VITORINO et al., 2012).

### 1.1.3 Tratamento

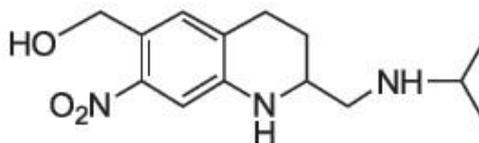
O tratamento da esquistossomose até o ano de 1970 se baseava em poucas terapias as quais apresentavam diversos efeitos tóxicos. Geralmente, eram terapias a partir de compostos antimoniais capazes de provocar diversos efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, distúrbios cardiovasculares, hepáticos e dermatológicos, podendo levar ao choque anafilático (DE MORAES, 2012). Atualmente apenas duas drogas estão disponíveis no Brasil para o tratamento da esquistossomose, o oxamniquina e o praziquantel (GRYSEELS, 2012; ESMAT e RAZIKY, 2009).

O Oxamniquina (Figura 2) é um derivado de quinolina (2-aminometil-tetra-hidro quinolina), eficaz apenas contra infecções pela espécie *S. mansoni* (BARSOU, ESMAT e EL-BAZ, 2013). O tratamento, em dose única recomendado pelo Ministério da Saúde, prevê o uso de 20 mg/kg e é encontrado nas formas farmacêuticas de cápsula de 250 mg e xarope de 250 mg em 5 mL, facilitando a posologia pediátrica. Os efeitos adversos geralmente são leves e de curta duração (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995).

O mecanismo de ação do medicamento oxamniquina se baseia no fato que por ser um substrato de enzimas sulfotransferases, são capazes de produzir um éster que reage com os ácidos nucleicos e, assim, interferem com os processos de replicação e transcrição (PICA-MATTOCCIA et al., 2006). Esta droga também provoca um aumento na motilidade e danos ao tegumento, que afetam principalmente os vermes machos de *S. mansoni*, que são mais sensíveis a esta droga do que outras espécies, sendo que alterações deletérias também podem ser observadas nas fêmeas (NDJONKA et al., 2013). No tratamento da esquistossomose experimental, foi verificado a sua eficácia de 95% no início da infecção, declinando para 51% em torno da terceira semana e aumentando novamente para 96% após a sétima semana de infecção (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995). A ausência de um alvo homólogo humano torna oxamniquina uma droga eficaz e com baixo perfil de citotoxicidade para as células humanas. No entanto, fatores como o aparecimento de linhagens resistentes, o alto custo de produção e seu uso

restrito para espécie *S. mansoni*, torna a droga inutilizável para campanhas de controle mundial da doença (NDJONKA et al., 2013).

**Figura 2 – Estrutura química do Oxamniquina.**

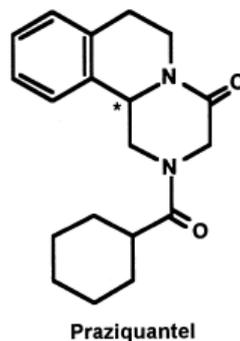


Fonte: DE ALMEIDA et al., 2008

O Praziquantel (PZQ, Figura 3) é um composto isoquinolinico utilizado para tratar a esquistossomose humana em larga escala. Este fármaco se tornou a única droga de escolha para o tratamento, devido a sua alta eficácia (contra todos os tipos de esquistossomose humana), excelente tolerabilidade, poucos efeitos colaterais (que normalmente são transitórios), administração oral (facilitando a adesão ao tratamento) e o custo acessível (CIOLI et al., 2014; WANG, WANG e LIANG, 2012). Geralmente é administrado em uma única dose sendo recomendada de 40-60 mg/kg de peso corporal e concomitante com alimentos, o que aumenta a sua biodisponibilidade, sendo que as taxas de cura são de 80-90%. (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013).

A sensibilidade do *Schistosoma* em relação ao praziquantel ocorre com algumas peculiaridades; o parasito é suscetível para os primeiros dias após a infecção (desde a fase cercariana), em seguida há uma insensibilidade progressiva para níveis muito baixos (3-4 semanas após a infecção), retomando a sua máxima ação após 6 a 7 semanas de infecção (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; CIOLI et al., 2014). Um dos prováveis mecanismos de ação é baseado na contração instantânea da musculatura do parasito, seguido de paralisia espástica do verme e vacuolização rápida do seu tegumento, concomitante com um aumento expressivo do influxo de cálcio (CHAI, 2013; GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, 2012).

Figura 3 – Estrutura química do Praziquantel (PZQ).



Fonte: CIOLI, PICA-MATTOCCIA, 2003.

O PZQ se tornou a droga de escolha para o tratamento, principalmente pelo seu amplo espectro de ação, aumento na produção industrial e, conseqüentemente, redução do custo. Com a elevada taxa de utilização, a resistência de algumas linhagens tem sido descritas na literatura. Sua ação também não abrange todas as fases do ciclo de vida do parasito, atuando principalmente sobre as formas de vermes adultos, machos e fêmeas. Assim novas pesquisas estão sendo realizadas em busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995; CIOLI et al., 2014).

## 1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS

As áreas endêmicas para doenças tropicais, causadas por protozoários e helmintos, possuem em geral, como característica, um elevado número de habitantes com baixa renda, saneamento básico inadequado e economia predominantemente rural (KING, 2010). Para essas áreas, as fontes naturais de terapia, como as plantas, representam uma forma acessível de tratamento destas doenças. Valorizando assim a busca pela descoberta de novos fármacos de origem vegetal (NDJONKA et al., 2013).

A eficácia dos compostos naturais com propriedades esquistossomicidas pode ser testada através de três estratégias: curativa, quando ocorre a redução

da carga parasitária em modelos animais ou a morte de vermes adultos em cultura; profilático, quando a substância impede a transformação dos esquistossômulos a vermes adultos; e supressora, afetando a oviposição. Assim, parâmetros, como atividade motora, alterações tegumentares, acasalamento e oviposição, muitas vezes são indicadores de atividade biológica e toxicidade das drogas sobre o helminto em estudos *in vitro* (DE MORAES, 2012).

Uma variedade de compostos que revelam atividade esquistossomicida foram identificados em ensaios *in vitro*. De Moraes, (2012) cita o óleo essencial de *Ageratum conyzoides* e o de *Baccharis dracunculifolia* como substâncias ativas sobre vermes adultos e sobre a oviposição. Mohamed, Metwally e Mahmoud, (2005) relataram que sementes de *Nigella sativa* trituradas, testadas *in vitro*, tiveram ação sobre os miracídios, cercárias e vermes adultos de *S. mansoni*, além da inibição da oviposição, indicando um forte efeito sobre várias fases do parasito.

A extrapolação dos resultados *in vitro* ao *in vivo* não é uma tarefa fácil. Um exemplo é o Vernodalin, uma lactona sesquiterpênica com uma atividade promissora *in vitro*, mas não *in vivo* (NDJONKA et al., 2013). Por outro lado, o antimalárico Artemisinina e alguns derivados vêm sendo explorados por mais de 20 anos, com resultados promissores, mas ainda não indicado para o tratamento dos doentes. Recentemente, a descoberta de atividade *in vivo* da Artemisinina como agente esquistossomicida foi estabelecido. O composto foi capaz de promover a redução da carga parasitária em camundongos experimentalmente infectados por *S. japonicum* e a suscetibilidade dos esquistossômulos. Mais tarde, estes resultados também foram confirmados para *S. mansoni* (ESMAT e RAZIKY, 2009; DOENHOFF et al., 2009; GRYSEELS, 2012). Porém a sua utilização em larga escala para o tratamento da esquistossomose gera preocupações em relação à possibilidade do surgimento de parasitos resistentes ao tratamento da Malária (ALI, 2011).

Outros estudos também foram relatados por Ali, (2011): a substância Lapachol e parte de plantas como o *Rhizoma rhei* foram eficazes contra a esquistossomose e os extratos etanólicos de *Pulicária crispa* e *Citharexylum*

*quadrangulare* mostraram efeitos imunoestimulatórios antes e após a infecção por *S. mansoni*.

Espécies vegetais cujos efeitos esquistossomicidas foram bem caracterizados podem ser importantes candidatas para pesquisas adicionais, resultando em uma aplicação clínica destas (CASTRO et al., 2013).

### 1.3 A ESPÉCIE *Arctium lappa* E A LIGNANA ARCTIINA

A família *Asteraceae* é uma das maiores famílias de plantas abrangendo cerca de 1.600 gêneros e 25.000 espécies, divididas em 17 tribos e 3 subfamílias (ROQUE e BAUTISTA, 2008; HATTORI e NAKAJIMA, 2008). Apresenta uma ampla distribuição, encontrando-se disseminada em vários continentes. No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetacionais por todo o território (ROQUE e BAUTISTA, 2008).

Plantas dessa família, como *Artemisia absinthium* (Losna) (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005), *Baccharis dracunculifolia* DC (Alecrim do Campo) (PARREIRA et al., 2010), *Calendula officinalis* L (Calêndula) (CITADINI-ZANETTE, NEGRELLE e BORBA, 2012), *Matricaria recutita* L (Camomila) (WANG et al., 2005), entre outras, são amplamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica.

A espécie *Arctium lappa* Line (*Asteraceae*) é uma planta perene de utilização tradicional na medicina chinesa. Terapeuticamente ela também vem sendo utilizada principalmente em países da Europa, América do Norte e Ásia. (AHANGARPOUR et al., 2015). No Brasil, esta planta também pode ser denominada *Arctium chaorum* Klokov e *Lappa major* Gaertn, sendo indicada, de acordo com o formulário terapêutico, como antidispéptico, diurético e anti-inflamatório; realizando o preparo por decocção das raízes para o uso interno (BRASIL, 2011).

Esta espécie é conhecida popularmente como bardana, erva-dos-tinhosos, pegamassa, capricho-de-carneiro e capricho-grande. Caracteriza-se

morfologicamente (Figura 4) por apresentar folhas grandes e flores arroxeadas, podendo chegar a 2,5 metros de altura (LIMA et al., 2006).

**Figura 4 – Aspecto morfológico das folhas e flores de *Arctium lappa* (Asteraceae)**



Fonte: [http://crdp.ac-besancon.fr/flore/Asteraceae/especies/arctium\\_lappa.htm](http://crdp.ac-besancon.fr/flore/Asteraceae/especies/arctium_lappa.htm). Acesso em: 25 de abril de 2015

A Bardana se destaca pelo seu valor nutricional, possuindo em sua constituição aminoácidos essenciais (ácido aspártico e arginina), vitaminas (B1, B2, C e A) e metais (cálcio, potássio, sódio e magnésio) e pelo seu valor medicinal; sendo tradicionalmente utilizada para tratar a dor de garganta, hipertensão, gota, hepatite e outras doenças inflamatórias, como erupções cutâneas e furúnculos (CHAN et al., 2011; LEE et al., 2012). Também há a utilização das raízes para o tratamento da impotência e esterilidade e infusões das folhas como diuréticos e antipirético (LIMA et al., 2006; GRASES et al., 1994; AHANGARPOUR et al., 2015).

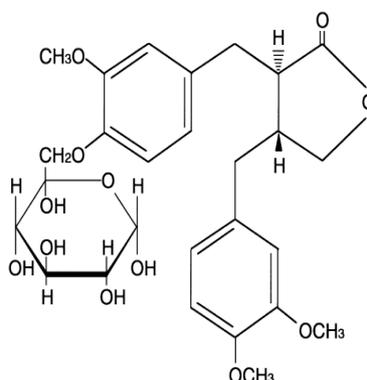
Vários estudos já foram realizados sobre as atividades biológicas da Bardana, dentre os quais podemos citar: Sohn et al., (2011) sugerem em seus resultados que o extrato butanólico de *A. lappa* inibe a expressão de IL-4 e IL-5 apoiando a hipótese dos efeitos benéficos no tratamento de doenças alérgicas, incluindo a dermatite atópica. Machado et al., (2012), verificaram a atividade antiproliferativa contra células Caco-2 (linhagem celular de adenocarcinoma de cólon retal) e Chan et al., (2011) destacam a atividade anti-inflamatória e como

seqüestrante de radicais livres. Sendo estes efeitos atribuídos a alguns compostos ativos isolados da *A. lappa*, como taninos, lignanas (arctigenina e arctiina), beta-eudesmol, ácido cafeico, o ácido clorogênico, inulina e diarctigenina (CHAN et al., 2011; KEMPER, 2010).

Dentre os compostos biologicamente ativos destacamos algumas lignanas e neolignanas que apresentam atividades antiparasitárias. As Surinamensina 1a e 1b são neolignanas que foram testadas frente à atividade leshmanicida (BARATA et al., 2000). Cabral et al. (2010), testaram o efeito tripanossomicida das neolignanas licarina A e burchelina isoladas de plantas no nordeste do Brasil e relataram que ambas as substâncias agiram como um agente terapêutico interessante, porque foram capazes de matar os parasitos sem afetar macrófagos. Pereira et al., (2011) ressaltaram também que, além da atividade tripanossomicida da Licarina A esta apresentou uma nova atividade esquistossomicida. Godinho et al., (2014) demonstrou *in vitro* o potencial de atividade esquistossomicida do óleo essencial de *Tanacetum vulgare* (TV-EO) contra vermes adultos de *S. mansoni*, reforçando o seu uso tradicional como vermífugo e anti-helmintico.

A lignana Arctiina (Figura 5 – Estrutura química), um dos princípios ativos isolados do fruto de *Arctium lappa*, tem demonstrado a capacidade de influenciar as funções biológicas e possuir propriedades farmacológicas importantes (LEE et al., 2011; MATSUZAKI et al., 2008).

**Figura 5 – Estrutura química da Arctiina**



Fonte: HIROSE et al., 2000.

Dos estudos disponíveis na literatura, que demonstram a capacidade da Arctiina em influenciar as funções biológicas e de possuir propriedades farmacológicas importantes podem ser citados: os estudos de Lee et al. (2011) que sugerem os efeitos antiinflamatórios da Arctiina sobre macrófagos através da redução de citocinas pró-inflamatórias através da inativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B); Hayashi et al. (2010) destacaram a Arctiina como sendo uma opção para o tratamento contra o vírus da Influenza A, como monoterapia (capaz de estimular um aumento da produção de anticorpos específicos contra o vírus) ou em terapia combinada com o oseltamivir (redução da carga viral). O estudo de Matsuzaki et al. (2008) verificou que esta molécula foi parcialmente capaz de induzir a inibição do crescimento celular através da infra-regulação da expressão da proteína ciclina D1, contribuindo assim para o seu efeito anti-proliferativo.

Algumas propriedades já descritas, revelam o potencial terapêutico desta molécula, sendo essencial a busca de novos alvos farmacológicos para sua utilização. Githiori, Athanasiadou e Thamsborg (2006) destacam que os ensaios *in vitro* devem ser realizados com o estudo *in vivo*, porque nem sempre as concentrações das substâncias ativas correspondem às mesmas nos dois estudos.

A Arctiina pode ser extraída de uma planta (bardana) que pertence a uma família (*Asteraceae*) conhecida por suas propriedades antihelmínticas. Desta forma, foi selecionada para este estudo com base em nossa pesquisa bibliográfica, onde não consta nenhum dado publicado sobre a atividade esquistossomicida. Assim, o presente estudo investigou o potencial esquistossomicida da arctiina *in vitro* e *in vivo*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ação da Arctiina sobre o helminto *Schistosoma mansoni*, através de análises de sua atividade *in vitro* e *in vivo*, em modelo murino.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da Arctiina, em concentrações distintas, sobre a viabilidade do parasito (morfologia, mobilidade, produção e estágios de desenvolvimento dos ovos), *in vitro*;

Realizar ensaios em CLAE a fim de identificar a presença Arctiina no plasma murino após administração intraperitoneal;

Verificar o efeito do tratamento *in vivo* sobre a redução da carga parasitária e de parâmetros relacionados à morbidade da doença como: peso hepático, leucometria global, desenvolvimento de granulomas e oograma.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 OBTENÇÃO DAS DROGAS ARCTIINA E PRAZIQUANTEL**

A Arctiina, purificada do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos da *Arctium lappa* L., foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais – NIPPAN, da Faculdade de Farmácia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pelo professor Doutor Ademar Alves Da Silva Filho. O Praziquantel (PZQ) foi adquirido através de uma doação da secretaria Municipal de Saúde na forma comprimidos na concentração de 600 mg (comprimidos produzidos por Farmanguinhos, Lote 13010097).

#### **3.2 ENSAIOS *IN VITRO***

##### **3.2.1 Aspectos Éticos**

Sob a observância dos Princípios Éticos de Experimentação Animal, a presente pesquisa foi submetida à apreciação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, aprovada com o parecer nº 025/2012.

##### **3.2.2 Infecção de Animais e Ciclo do Parasito**

Os camundongos fêmeas da linhagem Swiss, obtidos e mantidos no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou

Fiocruz/MG, foram submetidos à infecção bissexuada por cercárias de *S. mansoni*, cepa LE/BH (Belo Horizonte – MG), por via subcutânea. Cada animal recebeu um inóculo contendo cerca de 50 cercárias. As cercárias foram obtidas através da passagem seriada em moluscos *Biomphalaria glabrata*, como hospedeiro invertebrado, e em camundongos da linhagem Swiss como hospedeiro mamífero. Condições de acesso à ração e água foram mantidas. Ao final de 55 dias pós-infecção e com o peso médio em torno de 31g, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com uma mistura dos anestésicos Cloridrato de Xilasina (na dosagem de 10 mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (115 mg/Kg), e perfundidos para recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático, adaptado da técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Fígados e intestinos foram removidos e utilizados na purificação de ovos para eclosão dos miracídeos, utilizados na infecção dos hospedeiros intermediários.

### **3.2.3 Avaliação *in vitro* da atuação da Arctiina sobre os vermes adultos de *S.mansoni*.**

Os casais de vermes adultos para o ensaio *in vitro* foram recuperados de animais infectados por perfusão (MAGALHÃES et al., 2009) e foram previamente lavados em média 5 vezes com meio RPMI 1640 + antibióticos para remoção de resíduos. Posteriormente foram colocados separados e em poços de placas de petri estéreis (8,5 X 12,8 cm), contendo 2 mL de meio RPMI 1640, suplementado com penicilina cristalina G (1000 UI/mL), estreptomicina (1000 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal.

A Arctiina foi diluída nas concentrações 30, 60, 120 e 240 µg/mL, em solução 10% de DMSO (v/v) e meio RPMI 1640.

Poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 10%, também suplementados com antibióticos e soro bovino fetal, foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C e foram monitoradas após 24h de contato com a Arctiina e diariamente

por 7 dias observando os sinais de viabilidade (motilidade corporal e das ventosas, pareamento e lesões tegumentares e morte) do parasito, bem como, à produção de ovos. O monitoramento foi realizado com o auxílio de microscópio de luz invertida (LABOMED), sendo as alterações relatadas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DA ARCTIINA NO PLASMA MURINO

#### 3.3.1 Varredura espectral

Foi realizado uma varredura espectral para verificar toda a faixa de absorção para a Arctiina, com base nos comprimentos de onda já descritos na literatura (254 e 280 nm). A amostra de Arctiina foi diluída em metanol (1:10) e a análise foi realizada em um espectrofotômetro para microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device) utilizando como leitura os comprimentos de onda de 190 a 300 nm.

#### 3.3.2 Condições Cromatográficas

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE), do Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pelo professor Doutor Jorge Willian Leandro Nascimento. A técnica utilizada foi uma adaptação do método para determinação do perfil cromatográfico para identificação e doseamento da arctigenina (TEIXEIRA, 2013) utilizando técnica de CLAE em equipamento Alliance modelo 2695 (Waters, USA) com detector de ultravioleta (UV) modelo 2489 de duplo comprimento de onda, no qual foi utilizado para experimento os comprimentos

de onda de 254 e 280nm. A separação cromatográfica se deu através de coluna X-Bridge C18, 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters, USA), operando a 35°C. A fase móvel foi composta de um sistema gradiente utilizando solução de ácido fosfórico 0,1% e metanol no seguinte gradiente: 1-5 min (50:50), 5-10 min (60:40). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1,1 mL/min e o volume de injeção de 10 µl, para a amostra padrão e 20 µl para as amostras contendo soro do camundongo, coletado após uma hora do tratamento com Arctiina, conforme técnica de Liu *et al.* (2010) modificada. Foi utilizado o software Enpower 3 (Waters, USA) para processamento das amostras, integração dos picos e avaliação dos cromatogramas obtidos.

### 3.4 ENSAIOS *IN VIVO*

#### 3.4.1 Grupos de animais

Fêmeas de camundongos da linhagem Swiss, com peso de aproximadamente 20 g, foram infectadas com aproximadamente 50 cercárias/animal. Os camundongos foram divididos em 4 grupos (Tabela 1) de 12 animais para cada grupo, incluindo um grupo controle composto por animais infectados e não tratados. Um grupo controle de tratamento foi utilizado no qual os animais receberam, por via oral, uma dose única de Praziquantel na concentração de 200 mg/kg de peso, aos 20 dias após a infecção. O outro grupo controle (DMSO) foi composto por animais que receberam duas doses (inóculos) intraperitoneais na concentração de 0,5% de DMSO diluído em solução salina 0,85%. Para o tratamento com Arctiina, os animais receberam por via intraperitoneal, duas doses na concentração final de 50 mg/kg, emulsionadas em solução de DMSO a 10%, com intervalo de 2 semanas entre estas. O início das doses foi aos 20 dias após a infecção e os animais foram sacrificados após 55 dias de infecção.

**Tabela 1. Disposição dos animais em grupos experimentais com os respectivos tratamentos.**

Grupo	Nº de animais Infectados	Nº de animais Avaliados	Tratamento mg/kg	Nº de doses administradas	Via
Controle	15	12	Sem Tratamento	-	-
DMSO	15	12	0,5%	Duas	IP
Praziquantel	15	12	200	Uma	O
Arctiina	15	12	50	Duas	IP

Fonte: Autora; DMSO: Dimetilsulfóxido; IP: Intraperitoneal; O: Oral

### 3.4.2 Peso hepático

Após eutanásia e perfusão, o fígado de cada camundongo submetido ao regime de dose dupla de Arctiina (50 mg/Kg de peso), bem como, daqueles pertencentes aos grupos controles – PZQ, DMSO e não tratado - foram removidos e seus pesos determinados.

### 3.4.3 Contagem da Leucometria Global

Os animais de cada grupo foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado pelo plexo retro-orbital. Alíquotas contendo 20 µL de sangue foram diluídas em 400 µL de líquido diluidor de Turk. O somatório dos quatro quadrados foi multiplicado pelo fator 50 para obter a leucometria em leucócitos por mm<sup>3</sup> (µL) de sangue. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos heparinizados e contadas na Câmara de Neubauer para obtenção da leucometria global.

#### **3.4.4 Avaliação parasitológica sobre o número de vermes recuperados**

A avaliação da ação esquistossomicida da Arctiina sobre os animais infectados foi realizada após 55 dias de infecção onde, os grupos de camundongos controle, tratados com PZQ, com DMSO e com Arctiina, foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com uma mistura dos anestésicos Cloridrato de Xilasina (na dosagem de 10 mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (115 mg/Kg) e perfundidos de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956), com adaptações: após a exposição das vísceras, a veia porta foi seccionada, próximo ao fígado e a porção terminal do intestino foi amarrada. Com o auxílio de uma agulha acoplada em um pipetador automático (Brewer), foi injetada solução heparinizada de salina 0,85% na aorta torácica e no hilo hepático, permitindo assim a perfusão das veias mesentéricas e hepáticas. Os vermes recuperados foram contados com auxílio de uma lupa, separando-os em machos e fêmeas e de acordo com a localização dos mesmos (mesentério ou fígado). Os resultados foram comparados aos obtidos no grupo controle não tratado.

#### **3.4.5 Análise qualitativa e quantitativa do oograma**

A evolução da oviposição foi avaliada através da análise qualitativa e quantitativa dos oogramas que foram realizados com fragmentos do intestino (cerca de 1 cm da junção ileocecal). Os mesmos fragmentos foram colocados entre uma lâmina de vidro e uma lamínula plástica, que foram posteriormente prensados. As lâminas foram visualizadas a fresco ao microscópio (Olympus BX41) a fim de se verificar e quantificar a presença dos ovos e determinar os estágios de desenvolvimento dos mesmos, em cada grupo de camundongos. A classificação em ovos maduros e imaturos foi realizada de acordo com as classificações propostas por Jurberg e colaboradores (2009). A análise

quantitativa dos oogramas foi realizada com a análise de 50 ovos em cada animal sendo o resultado expresso em porcentagem.

#### **3.4.6 Análise dos granulomas**

Fragmentos do fígado dos animais foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada. Os cortes do tecido hepático foram corados com agentes distintos para a avaliação do diâmetro dos granulomas (PYRRHO et al., 2004) e extensão da deposição de colágeno (Tricrômica de Gomori) (FILHO, 2004), as quais foram analisadas por microscopia óptica (Olympus BX41) e digitalizadas através do software Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics). A área total de granulomas foi medida e os resultados foram expressos em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ). Foram escolhidos e avaliados 10 granulomas por lâmina (20 animais). Essas imagens foram escolhidas aleatoriamente dentre aquelas que apresentavam um único ovo de *S. mansoni* viável e em seu centro.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 3.03 (San Diego, Ca, USA). Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando: análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey, quando as comparações envolveram mais de duas variáveis, sendo consideradas significativas as diferenças com o valor de  $p < 0,05$ . Para avaliar a homogeneidade da infecção entre os grupos tratados e não tratados foram utilizadas análises de variância (ANOVA). Os resultados foram apresentados em médias /desvio padrão e porcentagem.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROMOVIDAS PELA ARCTIINA SOBRE VERMES ADULTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

O ensaio foi realizado com casais de vermes adultos recuperados de animais infectados por perfusão, sendo a avaliação realizada durante 7 dias. Utilizou-se diferentes concentrações (30, 60, 120 e 240 µg/mL) de Arctiina sendo a dissolução realizada em DMSO 10% e água e as diluições em meio RPMI 1640.

Após 24 horas de incubação, os parasitos foram observados quanto aos sinais de vitalidade e viabilidade (motilidade corporal e das ventosas, pareamento e lesões tegumentares), bem como, quanto a oviposição. As alterações observadas foram sumarizadas na tabela 2.

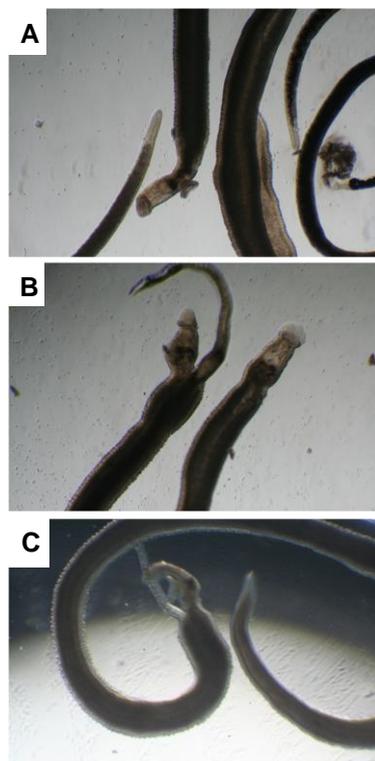
A figura 6 ilustra o que foi apresentado na tabela 2. Os vermes que foram expostos a arctiina, em diversas concentrações, não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de viabilidade analisados em relação ao grupo controle (não exposto a nenhum composto).

**Tabela 2 – Avaliação *in vitro* da atividade esquistossomicida da Arctiina.** Os casais (n=4) de vermes adultos foram mantidos em cultura durante 7 dias, incubados a 37°C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas diferentes concentrações de Arctiina e os parâmetros de viabilidade dos vermes adultos foram avaliados.

Grupo	Antes das drogas	24 após contato com as drogas	24 após retirada das drogas	7 dias após início da cultura
<b>Controle</b>	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios
<b>DMSO (10%)</b>	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios
<b>Arctiina 30, 60, 120 e 240 ug/ml</b>	Vermes normais	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de 1º e 2º estágio	Vermes com morfologia e movimento normais. Ovos de todos os estádios

Fonte: Autora. DMSO: Dimetilsulfóxido.

**Figura 6 – Efeitos da Arctiina sobre os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* mantidos em cultura.**



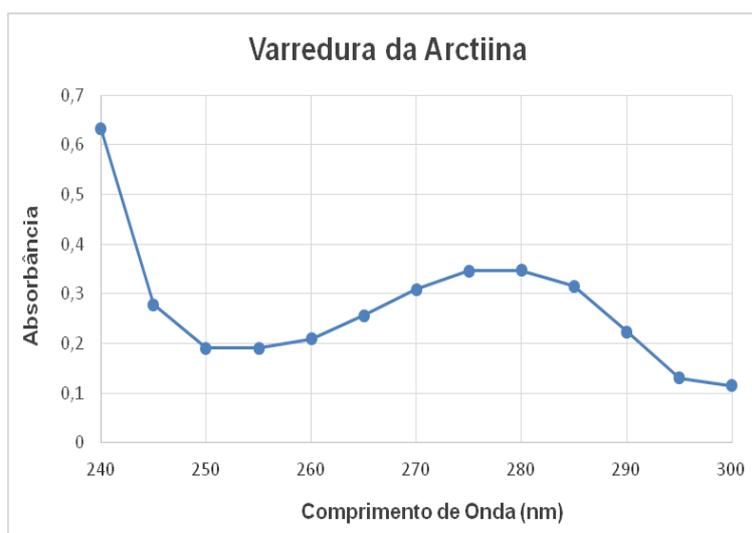
Vermes adultos de *Schistosoma mansoni* mantidos em cultura de meio RPMI 1640, suplementado com antibióticos e soro fetal bovino. Em (A), vermes mantidos em cultura sem ação da droga – Controle. A imagem (B) são os vermes tratados com DMSO 10% e (C), vermes tratados com Arctiina nas concentrações de 30, 60, 120 e 240 µg/mL. Fonte: Autora.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ARCTIINA EM PLASMA MURINO

### 4.2.1 Varredura espectral

A técnica de espectrofotometria de varredura foi utilizada para medir automaticamente a absorção de uma solução de arctiina em metanol (1:10) em diferentes comprimentos de ondas. Os resultados estão representados graficamente (gráfico 1). Foi observada uma curva, espectro de absorção, com início em torno de 250nm, o pico máximo em 275 – 280 nm e término em aproximadamente 290 nm.

Gráfico 1 – Varredura espectral da solução de Arctiina em metanol na diluição de 1:10.



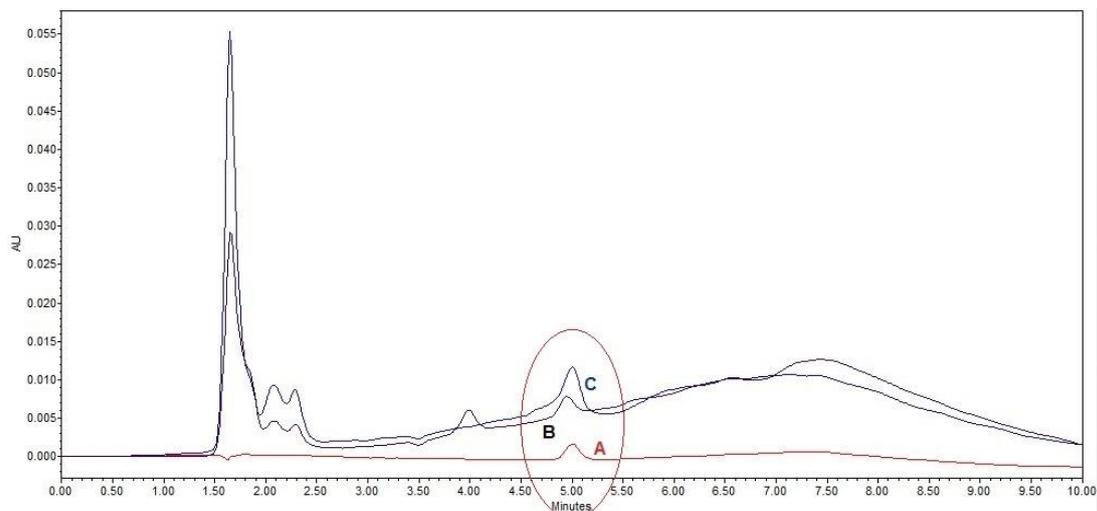
Varredura espectral da solução de Arctiina em metanol, utilizando como leitura os comprimentos de onda de 190 a 300nm. Fonte: Autora.

### 4.2.2 Identificação da Arctiina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A garantia da disponibilidade da arctiina após a administração via intraperitoneal, bem como a garantia da não conversão da mesma em

arctigenina (visto que a mesma possui tempo de corrida em aproximadamente 8 min – retenção na coluna), só poderia ser avaliada a partir das análises cromatográficas de amostras de plasma de animais tratados com a droga após 1 hora de sua administração. Para a identificação da substância Arctiina em plasma murino foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Como representado no gráfico 2, foi possível verificar a presença de três cromatogramas com picos semelhantes (com tempo de corrida em aproximadamente 5 min – retenção na coluna). A comparação foi realizada entre o pico da substância presente no plasma identificado (plasma de animal tratado com a arctiina), comparando o tempo de retenção desta substância com o da amostra padrão (arctiina pura, na concentração de 1 mg/mL, diluída em metanol), e com a amostra fortificada (arctiina pura, na concentração de 1 mg/mL, diluída em plasma de animal não tratado). O resultado obtido por esta análise revelou um pico nítido que se destaca na curva marcada (A) no cromatograma do gráfico 2, obtido a partir de amostras de arctiina (padrão), 1 mg/mL, diluída em metanol. A letra (B) do mesmo cromatograma foi destacada no mesmo tempo de retenção de (A e C) e corresponde ao pico de absorção da arctiina presente no “pool” de amostras de plasma de animais tratados com a substância e a curva (C) no mesmo cromatograma, representa a arctiina (padrão), 1 mg/mL, diluída em plasma (animal não tratado). O melhor comprimento de onda de leitura para estes espectros foi a 254 nm.

**Gráfico 2 – Análise cromatográfica do plasma murino e a identificação da presença de Arctiina.**



Cromatogramas obtidos através o software Enpower 3 (Waters, USA) no comprimento de onda de 254 nm. Em (A), pico da solução de arctiina (padrão); o pico marcado no cromatograma, denominado (B) representa a presença de arctiina contida em plasma de animais infectados e tratados, colhido após uma hora da administração da substância; em (C) pico da solução de arctiina que foi diluída em plasma de animal não tratado (controle). Fonte: Autora.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO ARCTIINA EM MODELO DE ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

Os grupos de camundongos da linhagem Swiss infectados com cercarias *S. manoni*, pesando aproximadamente 31 g (tabela 3), foram tratados com Arctiina, na concentração de 50 mg/Kg (20 dias após a infecção). A via de administração escolhida foi intraperitoneal para garantir que a substância administrada estaria biodisponível e inalterada, como mostrado pelo cromatograma (gráfico 2). O preparo das doses foi realizado através de uma emulsão contendo solução de DMSO (10%), salina (tampão salina fosfato, pH 7,4) e a substância de escolha, Arctiina. Os inóculos aplicados possuíam em torno de 50 a 100  $\mu$ L.

**Tabela 3 – Peso Médio dos camundongos (g).** Os grupos de camundongos infectados tiveram os seus pesos assinalados antes de serem eutanasiados.

Grupo (n=12)	Peso médio $\pm$ SD	Mínimo	Máximo
Controle	30,58 $\pm$ 5,42	20	37
DMSO	33 $\pm$ 5,38	28	48
Praziquantel	30,58 $\pm$ 2,23	27	34
Arctiina	30,58 $\pm$ 4,87	25	42

Fonte: Autora. DMSO: dimetilsulfóxido; SD: desvio padrão.

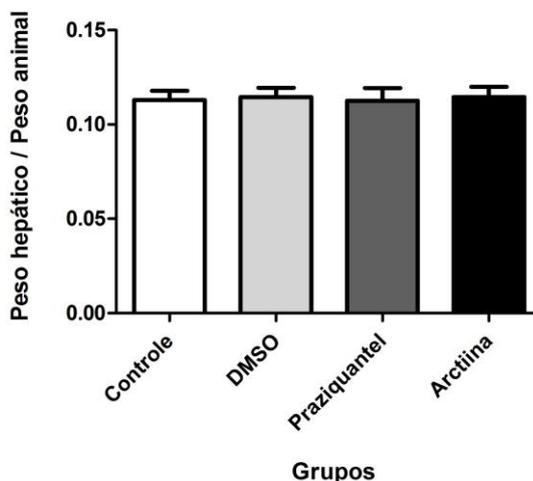
Pela análise dos dados (tabelas 3 e 4), foi possível verificar que não houve uma diferença estatisticamente significativa dos pesos médios dos animais dos grupos experimentais. Da mesma forma, nenhuma diferença no peso relativo dos fígados destes animais pode ser verificada. Assim, a análise dos dados demonstra que o tratamento não apresentou atividade capaz de interromper a infecção e eliminar as formas (vermes adultos e ovos) do parasito. O aumento de massa do fígado, característico da esquistossomose em função da deposição dos ovos do parasito, não sofreu variação com o tipo de tratamento adotado, como descrito na tabela 4 e representado no gráfico 3.

**Tabela 4 – Peso hepático relativo do órgão removido após eutanásia dos animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.**

Grupo (n=12)	Média $\pm$ SD	Mínimo	Máximo
Controle	0,113 $\pm$ 0,017	0,080	0,143
DMSO	0,114 $\pm$ 0,017	0,085	0,143
Praziquantel	0,113 $\pm$ 0,023	0,064	0,143
Arctiina	0,115 $\pm$ 0,018	0,081	0,139

Fonte: Autora. DMSO: dimetilsulfóxido; SD: desvio padrão.

**Gráfico 3 – Representação gráfica do peso hepático relativo dos animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.**



Fonte: Autora. Relação entre o peso hepático do animal infectado por *Schistosoma mansoni* e o peso corporal.

A administração de compostos capazes de afetar os vermes adultos de *S. mansoni* pode promover oscilações no recrutamento e proliferação das células polimorfonucleares de sangue periférico no hospedeiro mamífero. Os efeitos observados com o uso do praziquantel foram relativamente maiores ao obtido para o tratamento com duas doses de Arctiina na concentração de 50 mg/Kg (tabela 5 e gráfico 4).

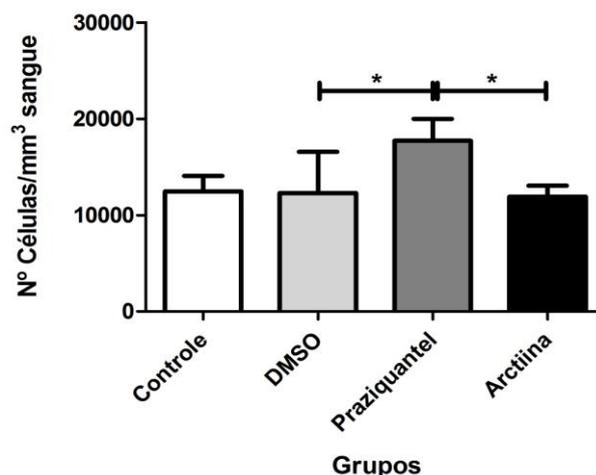
**Tabela 5 – Contagem global média de leucócitos (por mm<sup>3</sup> de sangue) em amostras de sangue de animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.**

Grupo (n=12)	Média ± SD	Mínimo	Máximo
Controle	12.454 ± 5.536	4.000	22.100
DMSO	12.292 ± 4.260	7.500	21.900
Praziquantel*	17.717 ± 7.884	9.500	34.500
Arctiina	11.904 ± 4.011	5.650	19.400

Fonte: Autora. DMSO: dimetilsulfóxido. SD: desvio padrão.

\* P<0,05

Gráfico 4 – Representação gráfica da leucometria global média em amostras de sangue de animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina



Fonte: Autora.

A avaliação do efeito benéfico do tratamento da esquistossomose mansoni pode ser diretamente relacionada ao número de vermes adultos recuperados por perfusão do sistema porta-hepático após o tratamento. Na tabela 6, estão descritos os números de vermes adultos recuperados nos camundongos infectados *S. mansoni* e submetidos a diferentes tratamentos. A dose e o esquema terapêutico adotado para a Arctiina como agente esquistossomicida não foi capaz de promover uma redução da carga parasitária quando comparada com a droga de escolha para o tratamento, o Praziquantel.

De acordo com a literatura, a maior parte dos vermes se encontra na forma de esquistossômulos/vermes jovens em torno de 20 dias após a infecção. O tratamento adotado teve início nesta fase e desta forma, nenhuma das duas substâncias, praziquantel e arctiina, foram capazes de promover uma redução da carga parasitária em níveis significativos, mantendo-se valores semelhantes na quantidade de vermes adultos recuperados em todos os grupos experimentais (tabela 6). Neste ensaio não foi possível obter a cura parasitológica dos animais infectados e tratados.

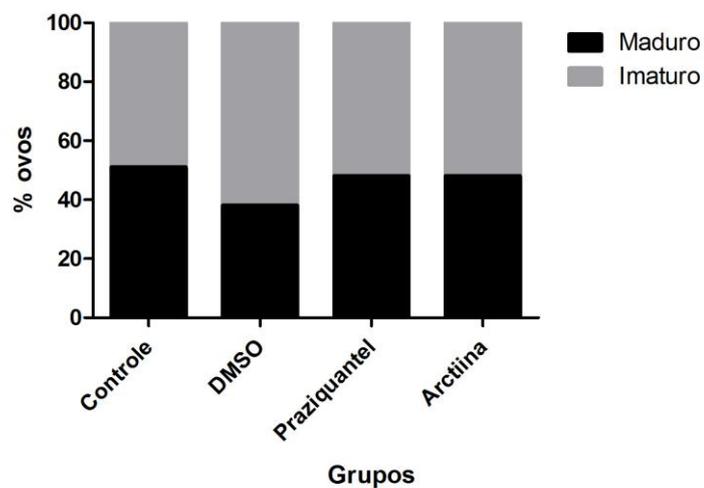
**Tabela 6 – Número de vermes totais recuperados por perfusão salina após o tratamento e distribuição percentual dos vermes alojados no fígado e mesentério**

Grupo (n=12)	Total M ± SD	Fígado %	Mesentério %
Controle	22,67 ± 9,46	6,62	93,38
DMSO	23,08 ± 7,77	1,08	95,67
Praziquantel	20,75 ± 7,37	11,65	88,35
Arctiina	19,83 ± 8,66	9,24	90,76

Fonte: Autora. DMSO: dimetilsulfóxido. M: média aritmética. SD: desvio padrão.

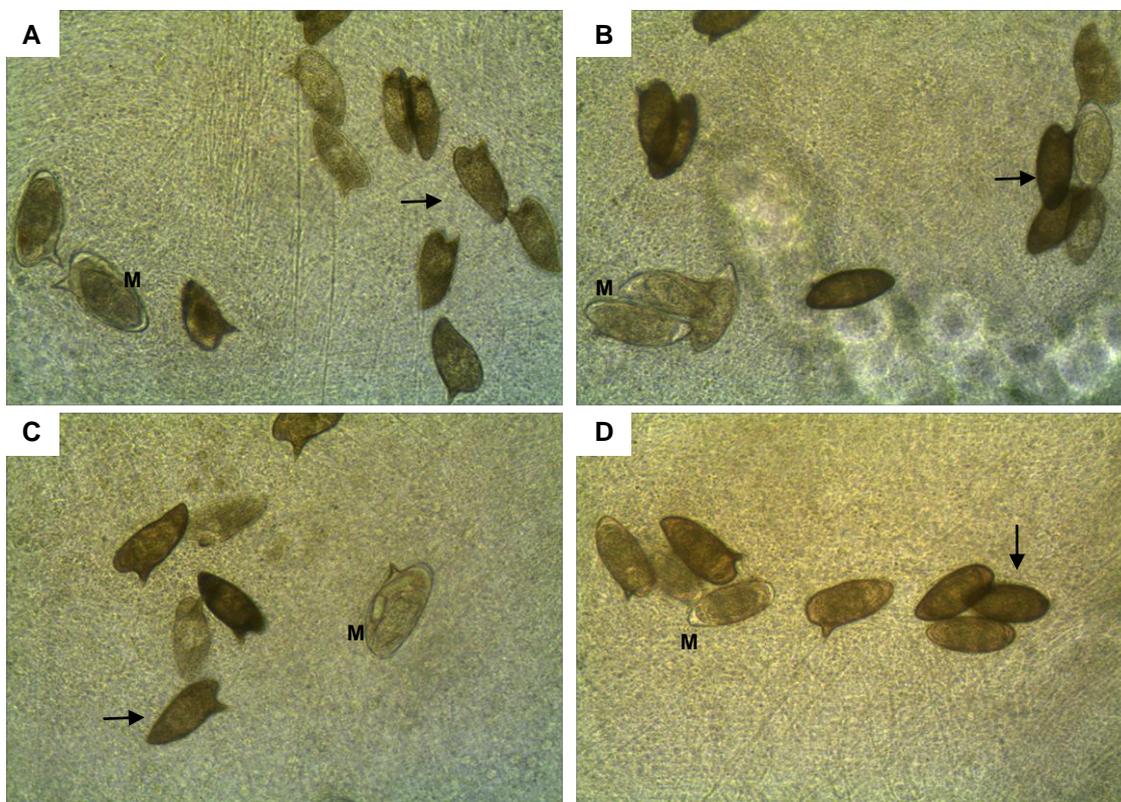
Para visualização e avaliação dos efeitos da ação de drogas administradas *in vivo* sobre a quantidade e estágios de desenvolvimento dos ovos foram realizadas análises dos oogramas dos animais sacrificados, utilizando um fragmento da porção intermediária do íleo. Os ovos foram observados e classificados em seus estágios de maturação, de acordo com a literatura. A visualização qualitativa destes mostrou a presença de ovos em todos os estágios de desenvolvimento (figura 9; gráfico 6). Para facilitar a demonstração, foi realizada uma análise semi-quantitativa através do somatório dos ovos imaturos e maduros, padronizando a contagem em 50 ovos/lâmina/animal, nesta contagem a média encontrada entre os grupo foi de 23,08 para ovos maduros e 26,92 ovos imaturos, sendo o desvio padrão de 7,64. A avaliação deste percentual (gráfico 6; figura 9) mostrou que não houve diferenças significativas quanto a prevalência de ovos imaturos ou maduros nos diferentes grupos experimentais. Foi possível afirmar que o praziquantel e a arctiina não exerceram efeitos sobre a maturação dos ovos.

**Gráfico 5 – Representação gráfica da porcentagem de ovos maduros e imaturos analisados nos oogramas de camundongos Swiss infectados por *S. mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.**



Relação percentual entre o número de ovos (50 ovos) de *S. mansoni* presentes em um fragmento de 1 cm<sup>2</sup> da porção intermediária do íleo de animais infectados não tratados, tratados com DMSO 0,5%, Praziquantel 200 mg/kg e com duas doses de 50 mg/kg de Arctiina. Fonte: Autora.

Figura 7 – Avaliação dos ovos através do oograma, obtidos a partir de um fragmento intermediário do íleo observados, entre lâminas, em microscopia óptica convencional (10x).

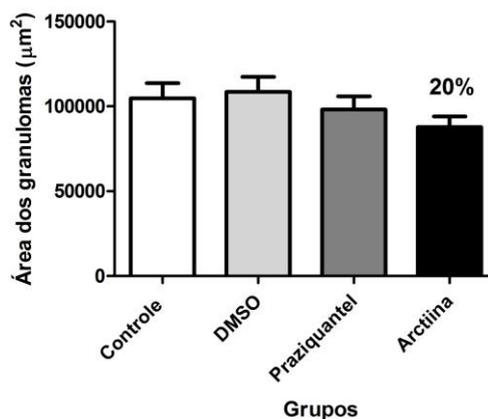


Efeitos sobre o oograma do tratamento com duas doses de Arctiina em camundongos da linhagem Swiss infectados com *Schistosoma mansoni* (análise em objetiva de 10x). Em (A), fragmento de intestino do grupo controle infectado; em (B) animal tratado com DMSO; (C) animal tratado com praziquantel; (D) tratamento com 2 doses de 50 mg/Kg de Arctiina, mostrando que o tratamento não atua sobre os ovos. Em nenhuma das amostras foi observada diferença nos estágios de maturação dos ovos observados nos fragmentos de intestino dos animais tratados apresentando ovos maduros (M) com miracídios bem desenvolvidos e ovos imaturos (→). Fonte: Autora.

Para avaliação dos efeitos antiinflamatórios da arctiina sobre a reação granulomatosa ao redor dos ovos de *S. mansoni* que se encontram aprisionados no tecido hepático, amostras deste tecido foram submetidas a análises histopatológicas. Cortes de tecido hepático foram submetidos a coloração por HE e Tricrômica de Gomori e analisadas por microscopia óptica. Neste ensaio, as áreas dos granulomas foram medidas e foi possível observar que a média das áreas de infiltrado inflamatório ao redor dos granulomas dos animais tratados com arctiina sofreu uma redução de aproximadamente 20% (controle M: 104785  $\mu\text{m}^2$  – SD: 54523; arctiina M: 87752  $\mu\text{m}^2$  – SD: 40035) dos valores em comparação ao grupo controle (gráfico 5). Podendo ser essa

redução ocasionada pelos potenciais efeitos anti-inflamatórios da arctiina já descritos na literatura.

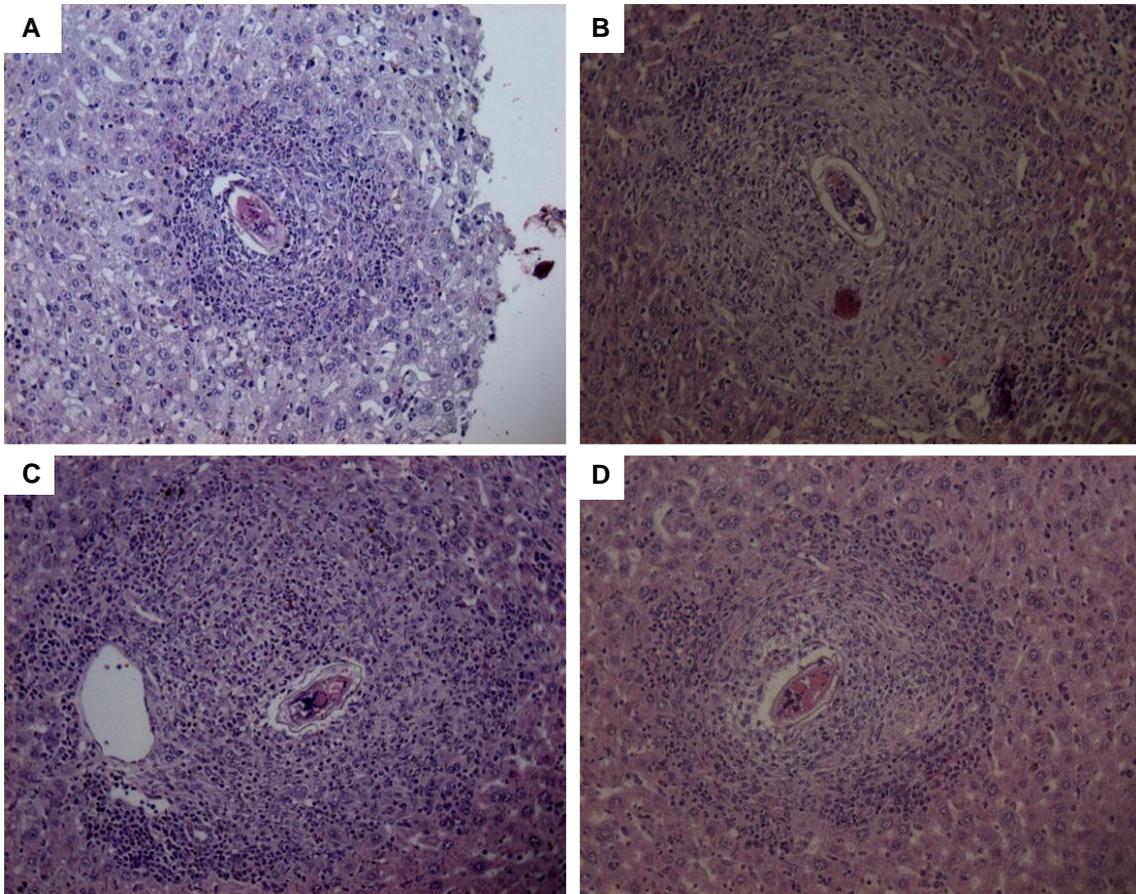
**Gráfico 6 – Representação gráfica das médias das áreas dos granulomas hepáticos medidos em cortes histológicos dos grupos de animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.**



Fonte: Autora.

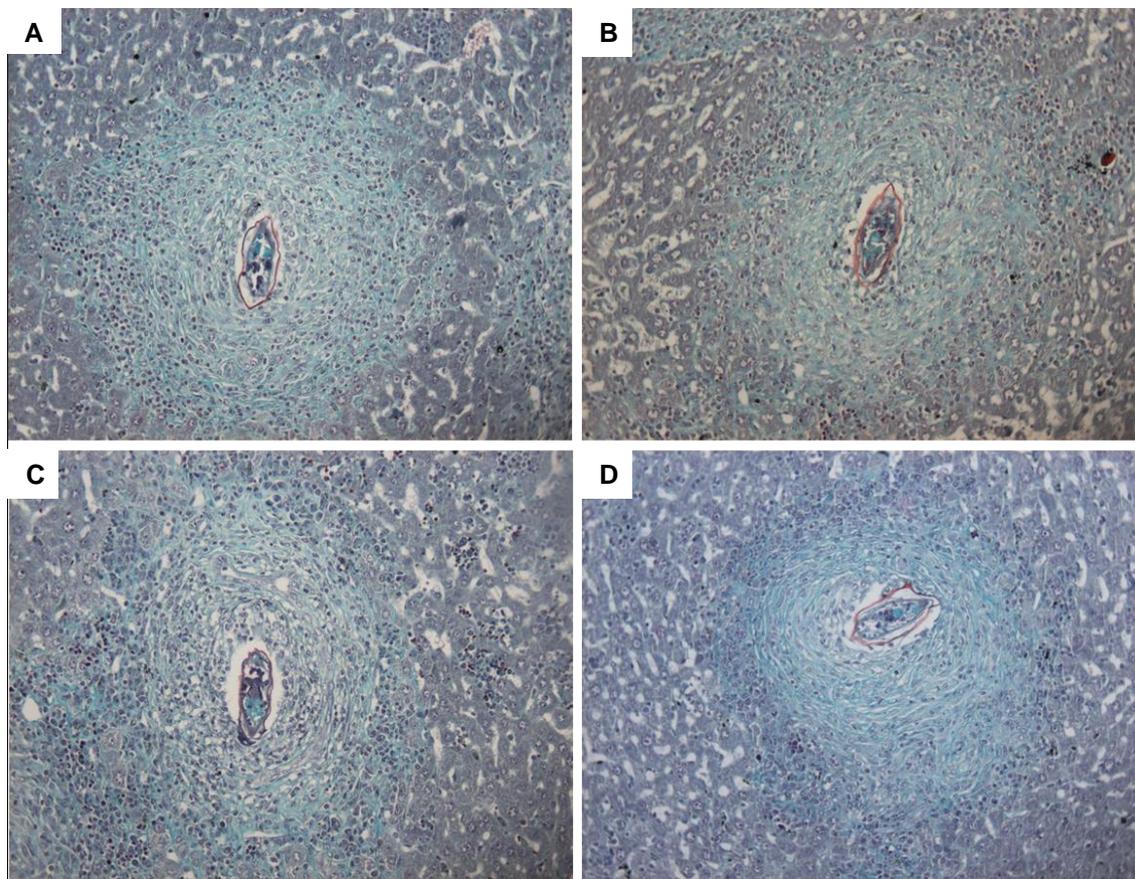
A análise qualitativa das imagens dos granulomas (figura 7) dos cortes histológicos das amostras de fígado dos camundongos tratados com arctiina não revelou diferenças no aspecto do infiltrado inflamatório presente, mas uma maior organização das fibras colágenas na maior parte dos granulomas avaliados, o que pode ser responsável pela redução da área de infiltrado neste grupo. A marcação das fibras colágenas, destacadas pela coloração (figura 8) dos cortes histológicos com Tricrômica de Gomori, revelou uma dispersão das fibras colágenas, desorganização das mesmas, característica da fase aguda da esquistossomose. Da mesma forma, nenhuma alteração na quantidade de deposição foi observada durante a análise.

**Figura 8 –** Imagens dos granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por *S. mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina, corados por hematoxilina- eosina.



Representação comparativa de granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por *S. mansoni* corados por hematoxilina-eosina e analisado por microscopia óptica em objetiva de 20x. Em (A), grupo controle, (B) animais tratados com DMSO 0,5%, (C) animais tratados com Praziquantel (200 mg/kg) e (D), animais tratados com Arctiina na concentração de 50 mg/kg. Fonte: Autora.

Figura 9 – Imagens dos arranjos de fibras colágenas de granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por *S. mansoni* e tratados com DMSO, Praziquantel e Arctiina.



Representação comparativa de granulomas em cortes histológicos de fígado de camundongos Swiss infectados por *S. mansoni* corados por Tricrômica de Gomori e analisado por microscopia óptica em objetiva de 20x. Em (A), grupo controle, (B) animais tratados com DMSO 0,5%, (C) animais tratados com Praziquantel (200 mg/kg) e (D), animais tratados com Arctiina na concentração de 50 mg/kg. Fonte: Autora.

## 5 DISCUSSÃO

A esquistossomíase é considerada uma das doenças tropicais negligenciadas mais significativa no mundo, sendo que ocorre com maior prevalência em áreas rurais subdesenvolvidas. Nestas regiões, a transmissão da doença está ligada principalmente a falta de saneamento básico adequado. Muitas vezes, o alto custo associado com a implantação das condições básicas de saneamento e educação sanitária leva estas regiões ao tratamento em massa de sua população. Este tipo de tratamento pode ser eficaz na redução da morbidade, mas não evita reinfecções e os parasitos podem desenvolver resistência ao medicamento quando submetidos a esta pressão seletiva (ALLEGRETTI et al., 2012; KING, DICKMAN e TISCH, 2005; KING, 2010; MAGALHÃES et al., 2010).

A partir da expansão das áreas endêmicas e do aumento do número de pessoas infectadas, verificou-se a necessidade de desenvolvimento de novas drogas e modificações nas já disponíveis comercialmente. No entanto o custo do desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes é elevado (ALLEGRETTI et al., 2012) sendo a pesquisa com plantas medicinais uma alternativa (MAGALHÃES et al., 2010; ALLEGRETTI et al., 2012; ALI, EL-REGAL e SAEED, 2015; KAYSER, KIDERLEN e CROFT, 2003; MISHRA e TIWARI, 2011).

Várias plantas e extratos possuem potencial etnofarmacológico para o tratamento de diversas doenças. Entretanto, são sempre exigidos estudos que promovam o isolamento, a identificação e eventualmente a validação das moléculas ativas encontradas nos produtos de origem vegetal (NDJONKA et al., 2013). O princípio ativo, arctiina, isolado a partir da planta *Arctium lappa* L., possui diversas atividades biológicas, sendo que suas atividades anti-inflamatória (LEE et al., 2011) e anti-proliferativa (MATSUZAKI et al., 2008) já foram bem descritas. A busca por novas aplicações terapêuticas e antiparasitárias nos levaram a verificar uma possível ação esquistossomicida da arctiina.

Neste trabalho foi estudada a ação anti-helmíntica da arctiina sobre a esquistossomose mansônica, atuando na fase aguda da doença em modelo murino. Deste modo, para se iniciar a avaliação da ação esquistossomicida, dessa substância, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*.

O praziquantel é caracterizado por sua ação esquistossomicida, sua ação interfere na homeostasia do íon cálcio, provocando contrações musculares contínuas e lesões no tegumento dos vermes adultos que o levam a morte (ALMEIDA et al., 2011; GODINHO et al., 2014). Durante a avaliação dos ensaios *in vitro*, a morte dos vermes em meio de cultura está diretamente relacionada com a sua perda de motilidade corporal e de suas ventosas. A oviposição durante o cultivo indica a efetividade na viabilidade dos vermes no meio, uma vez que os vermes após o processo de perfusão dos camundongos e a transferência para o meio de cultura conseguiram se acasalar, possibilitando assim a visualização dos ovos, os quais podem se desenvolver, mudando de estágios, caracterizando um perfeito desenvolvimento do miracídio na ausência de substâncias ativas (ALMEIDA et al., 2011; GODINHO et al., 2014).

Nos ensaios *in vitro*, os parâmetros analisados procuraram verificar a viabilidade do parasito através da redução da motilidade, incapacidade de fixação das ventosas, alterações no tegumento e na oviposição, bem como no desenvolvimento dos ovos em cultura (DE MORAES, 2012; NDJONKA et al., 2013). A arctiina foi utilizada nos ensaios nas concentrações de 30, 60, 120 e 240 µg/ml, os quais foram acompanhados durante 7 dias em cultura. A análise diária dos vermes adultos revelou que a arctiina não foi capaz de causar nenhum dano nas condições vitais do parasito nas concentrações testadas. Não houve lesões tegumentares e perda de atividade motora ao longo da exposição, bem como nenhum efeito sobre a oviposição e desenvolvimento dos ovos. Outras substâncias descritas na literatura também não foram capazes de exercer ação esquistossomicida em ensaios *in vitro*. Derivados de floroglucinol como desaspidinol e ácido filicinico (MAGALHÃES et al, 2010) e o óleo essencial de *Piper cubeba* nas concentrações de 12,5 e 25 mg/mL não foram considerados como promissores para o desenvolvimento de formulações

esquistossomicidas por não serem capazes de alterar as funções vitais de vermes adultos em cultura (MAGALHÃES et al., 2012).

Porém, outras substâncias já foram descritas como esquistossomicidas em ensaios *in vitro*. O acetato de carvacrol na concentração de 6,25 µg / mL foi capaz de provocar alterações na motilidade, no tegumento do parasito e na oviposição (DE MORAES, 2013). Resultados similares também foram encontrados com a utilização de derivados do floroglucinol (aspidina, ácido flavaspidico, metileno-bis-aspidinol e desaspidina) (MAGALHÃES et al, 2010), com o peptídeo antimicrobiano dermaseptina (DE MORAES et al., 2011), com os óleos essenciais de *Piper cubeba* e de *Tagetes erecta* (MAGALHÃES et al., 2012; TONUCCI et al., 2012), com o composto (+) - Epóxi-Limoneno (MORAES et al., 2013) e com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (FABRI et al., 2014).

O trabalho realizado por Dias (2013), analisou a atividade esquistossomicida do extrato de *Arctium lappa* e da arctiina isolada em testes *in vitro*, sendo verificadas alterações como a mortalidade em torno de 50% dos vermes e a redução da atividade motora em cerca de 60% após 48 horas de exposição a droga, utilizando-se uma concentração de 100 µM da substância isolada, dose esta que correspondendo a aproximadamente 50 mg/mL. Repetimos este ensaio em concentrações inferiores e superiores as testadas e não obtivemos sucesso na atividade esquistossomicida. Esta diferença de resultados deve estar associada a variações metodológicas (protocolo). Os ensaios realizados pelo nosso grupo ocorreram em três rodadas experimentais, com ensaios em triplicata em cada experimento, e não foi possível observar efeitos de dano significativos que pudessem levar a perda das funções vitais dos vermes adultos em cultura após exposição a arctiina em todas as concentrações testadas.

A atividade esquistossomicida *in vitro* pode não refletir as transformações e forma de atuação dos compostos *in vivo*, sendo uma tarefa difícil tentar inferir uma dose a partir dos ensaios em cultura (FABRI et al., 2014). A fim de verificar se a arctiina poderia exercer atividade anti-helmintica *in vivo*, concentrações de 50 mg/kg, deste composto foram administrado a animais experimentalmente infectados por *S. mansoni*.

A via de administração escolhida para o ensaio foi intraperitoneal, com o intuito de garantir a maior concentração possível de arctiina disponível no sangue dos animais tratados. A principal preocupação após a administração da arctiina foi verificar a biodisponibilidade desta na corrente sanguínea dos camundongos, uma vez que a literatura relata que essa substância é transformada em um metabólito ativo, a arctigenina, por ação de microorganismos presentes no intestino (HIROSE et al., 2000). Para esta tarefa, foram realizados testes de varredura do espectro de absorção de luz de padrões contendo arctiina diluída em metanol, na faixa de 190 a 300 nm. O trabalho de Qin et al. (2014), verificou que a concentração de arctiina em ervas cruas e processadas poderia ser analisado no comprimento de onda de 254 nm, no entanto, trabalhos de outros grupos, Ferracane et al. (2010) e He et al. (2012), mostraram a identificação da arctiina através do comprimento de onda de 280 nm. Ao verificar a curva de máxima absorção (250 – 290 nm) da arctiina em nossos ensaios de varredura, observamos que os dois comprimentos de onda previstos pela literatura poderiam ser aplicados na identificação por cromatografia (HPLC).

Para esta identificação, a amostra utilizada foi um pool de plasma murino, colhido dos animais tratados com arctiina após uma hora da administração. Foi constatado a presença da arctiina no plasma no comprimento de onda de 254 nm, provavelmente por ser neste comprimento que a substância sofre menos interferência dos constituintes plasmáticos, principalmente aminoácidos aromáticos e proteínas, que apresentam picos de absorção em 280 nm (ZAIA, ZAIA e LICHTIG, 1998). A varredura do plasma dos animais tratados mostrou diversos picos com tempos de retenção distintos, no entanto, um pico nítido no tempo de retenção 5 minutos, para o comprimento de onda de 254 nm, revelou a presença da arctiina nas amostras analisadas.

Nos ensaios *in vivo*, camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram divididos em quatro grupos contendo 15 animais em cada grupo, sendo analisados 12 animais em cada; grupo controle (infectado e não tratado), grupo tratado com praziquantel na dosagem de 200 mg/kg, grupo tratado com duas doses de DMSO na concentração de 0,5% e um grupo tratado com duas doses

de Arctiina na concentração de 50 mg/kg, sendo estes dois últimos tratados por via intraperitoneal. As análises consistiram em verificar a redução da carga parasitária e alterações de parâmetros relacionados à morbidade da doença como: o peso hepático, leucometria global, desenvolvimento de granulomas e o oograma.

As características clínicas da esquistossomose se baseiam em febre, dor de cabeça, letargia, inflamações e cicatrizes (deposição de colágeno e fibrose) no fígado e conseqüentemente a falência deste órgão, sendo a reação granulomatosa uma resposta inflamatória e imunológica induzida pela presença dos ovos do parasito no interior do tecido, que são a principal causa de hepatomegalia (GOBERT et al., 2015; ALI, EL-REGAL e SAEED, 2015, GRYSEELS et al., 2006). A redução do número de vermes e da oviposição podem estar diretamente relacionadas com uma diminuição da reação granulomatosa e conseqüentemente redução do peso hepático (ALLAM, EWEAS e ABUELSAAD, 2013). Fabri e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* foi capaz de reduzir o aumento de peso de órgãos como o fígado e o baço durante a esquistossomose mansoni. Sendo que resultados similares foram alcançados por Guimarães et al. (2015) em seus estudos com o alcalóide epiisopiloturina na dosagem de 40 mg/kg, dosagens superiores a estas não obtiveram efeitos satisfatórios.

Nossos ensaios mostraram que o tratamento com arctiina na concentração de 50 mg/Kg não apresentaram nenhuma alteração significativa em relação a variação do peso hepático dos animais tratados em relação aos animais do grupo controle não tratado. O composto 8-hidroxiquinolina, que teve sua atividade esquistossomicida descrita por Allam, Eweas e Abuelsaad (2013), também não foi capaz de mostrar capacidade de impedir o aumento da massa do tecido hepático nos animais infectados.

Quando a infecção é causada por helmintos e acomete principalmente as mucosas, um aumento significativo da concentração de eosinófilos acontece no hospedeiro (DE LA RUE, 2001). Assim, quanto maior a exposição do parasito ao sistema imune, maior é o recrutamento de células de defesa naquele local. Em nossos estudos, com a análise realizada 25 dias após o

tratamento foram demonstrados um aumento significativo na leucometria em animais tratados com praziquantel (200 mg/kg) em comparação com os outros grupos, confirmando assim a sua potencial atividade esquistossomicida. O tratamento com arctiina e o grupo controle apresentaram contagem global de leucócitos em valores similares. O trabalho de Fabri et al. (2014) verificou uma redução da leucometria global para os grupos em tratamento, tanto para os que receberam com praziquantel (200 mg/kg) quanto para o grupo que receberam os extratos de *Mitracarpus frigidus* em diversas concentrações, sendo a análise realizada 40 dias após a infecção.

O tratamento da esquistossomose ainda se encontra bastante limitado. Uma vez que não existe uma vacina disponível, políticas de saneamento básico adequadas e o controle do hospedeiro intermediário (moluscos), sem afetar o ecossistema como um todo (COURA e CONCEIÇÃO, 2010). A quimioterapia continua sendo a principal abordagem para o controle da esquistossomose. O praziquantel é a única droga disponível utilizada para todos os tipos de esquistossomose e para o tratamento em massa, sendo que a grande falha na quimioterapia ocorre na falta de eficácia contra a fase imatura do parasito (CIOLI et al., 2014). A sensibilidade do parasito ao praziquantel ocorre de maneira bifásica, sendo sensível a droga nos primeiros dias após a infecção, ocorrendo uma insensibilidade progressiva em torno de 2-4 semanas após a infecção e após este período retoma gradativamente a sensibilidade (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; CIOLI et al., 2014; YEPES et al., 2014). Os nossos estudos confirmaram essa afirmação, uma vez que não houve redução significativa do número de vermes recuperados após o tratamento com DMSO 0,5%, Praziquantel 200 mg/kg e Arctiina 50 mg/kg, 20 dias após a infecção, sendo repetida a dose de DMSO e Arctiina após duas semanas. Uma informação relevante foi o pequeno aumento do deslocamento dos helmintos para o sistema hepático em animais tratados com praziquantel em comparação com os outros grupos, corroborando o efeito esquistossomicida do praziquantel. No entanto, mesmo com o deslocamento dos vermes promovido pelo praziquantel, nenhum dos tratamentos adotados por nós foi capaz de promover a cura parasitológica dos animais infectados.

Os estudos realizados por De Oliveira et al. (2014) demonstraram atuação da fração aquosa do extrato bruto de *Baccharis trimera* sobre os vermes imaturos, na concentração de 200 mg/kg, sendo o tratamento realizado após 30 dias de infecção. Resultados semelhantes foram alcançados por Fabri et al. (2014) para o tratamento de animais infectados com *Mitracarpus frigidus* após 20 dias de infecção. No trabalho de Guimarães e colaboradores (2015), utilizando concentração de 40 mg/kg do alcalóide epiisopiloturina conseguiram observar uma redução do número de vermes tanto imaturos quanto maduros.

A metodologia do oograma permite uma avaliação direta da fecundidade do *S. mansoni* bem como a verificação do desenvolvimento dos ovos (MATI e MELO, 2013). Na avaliação qualitativa e quantitativa do oograma após a administração da arctiina a animais infectados parece não promover alterações na cinética de oviposição dos parasitos, bem como não afetar o desenvolvimento dos estágios dos ovos. Em nossos ensaios foram possíveis de serem visualizados, no oograma, ovos em todos os estágios, e a proporção de ovos imaturos encontrados foi levemente maior do que de ovos maduros, estando estes dados de acordo com o tempo de infecção analisado. Resultados semelhantes sobre a análise do oograma foram encontrados por Hermeto et al. (1994) a partir do tratamento de animais infectados com dexametasona na concentração de 50mg/kg. De Lima Aires et al, (2014) observaram ovos em todas as fases de desenvolvimento com a administração de  $\beta$  – lapachona no entanto houve uma redução significativa na porcentagem de ovos imaturos, indicando uma alteração na cinética de desenvolvimento dos ovos.

Já está bem estabelecido que a patogenia durante a esquistossomose ocorre principalmente devido a uma resposta inflamatória granulomatosa excessiva em torno principalmente dos ovos que ficam presos nos tecidos, principalmente o fígado e o intestino (HAMS, AVIELLO e FALLON, 2013). Em 1998, Lenzi et al., sugeriu classificação das fases evolutivas dos granulomas hepáticos dividindo-os em um estágio pré-granulomatoso: subdividido em fracamente / inicialmente reativo e exsudativo; e em estágio granulomatoso: subdividido em: exsudativo-produtivo, produtivo (com fases de início e de avançado desenvolvimento fibrótico) e involutivo. E em 1999, Lenzi et al.,

sugeriu a caracterização dos estágios dos granulomas de acordo com a disposição das fibras de colágeno. Sendo que durante a fase exsudativa produtiva, as fibras se encontram desorganizadas e com a estrutura solta e instável que se transforma em uma estrutura estável e de compactação progressiva, com a evolução do granuloma.

Em nossos estudos os granulomas se encontravam principalmente no estágio exsudativo-produtivo, com a prevalência de infiltrados inflamatórios e com as fibras de colágenos em formação, soltas e desorganizadas, característicos granulomas de fase aguda. Não foram observadas alterações qualitativas dos infiltrados granulomatosos em nenhum grupo experimental, sendo todos caracterizados por uma presença significativa de eosinófilos e com presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos em menor quantidade.

Os granulomas de *S. mansoni* possuem um papel essencial na proteção do hospedeiro e têm sido alvo de vários trabalhos. O principal papel da reação granulomatosa na esquistossomose é proteger os tecidos do hospedeiro dos antígenos potencialmente tóxicos liberados pelos ovos aprisionados nos tecidos (LINS et al., 2008). A hipertensão portal e a fibrose caracterizam alguns dos danos causados por estes, sendo que estratégias capazes de reduzir a quantidade ou a dimensão destas reações são de grande auxílio para a redução da morbidade pela doença (PYRRHO et al., 2004).

Para um bom prognóstico da doença é importante que ocorra o desenvolvimento de poucos granulomas e quando presentes que estejam bem resolvidos. Em nossos experimentos, as áreas calculadas dos granulomas não apresentaram variações entre os grupos controle (não tratado e DMSO) e o grupo tratado com o praziquantel. O grupo tratado com arctiina apresentou uma redução de aproximadamente 20% na área média dos granulomas em comparação com o grupo não tratado. Esta diminuição das áreas dos granulomas promovida pela arctiina pode ser relacionada ao potencial anti-inflamatório desta substância já descrito por outros autores na literatura (LEE et al., 2011; LEE et al., 2010; WU et al., 2009). Este efeito é muito interessante, pois podemos propor que a arctiina seja associada ao praziquantel, que não afeta os ovos do parasito e o desenvolvimento dos granulomas, no tratamento da esquistossomose.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a Arctiina apesar de não exibir atividade esquistossomicida nos modelos experimentais testados, apresenta um potencial anti-inflamatório importante, capaz de promover uma redução da reação inflamatória granulomatosa hepática, reduzindo a morbidade da infecção.

## 6 CONCLUSÃO

Diante da constante busca de novos medicamentos esquistossomicidas, em vista de existência de apenas uma única droga de amplo espectro para o tratamento da doença, vários estudos tem sido descritos na literatura a partir da utilização de substâncias de fontes naturais.

A Arctiina, uma substância isolada da *Arctium lappa* L. e pertencente à classe das lignanas, foi o alvo da nossa pesquisa. Por meio deste estudo verificamos, através dos parâmetros analisados (*in vitro* e *in vivo*), que a substância não atua como droga esquistossomicida, porém nos remete à sua função anti-inflamatória quando demonstrou efeito sobre a redução da área do granuloma, principal causa da morbidade relacionada ao parasito *Schistosoma mansoni*.

Neste contexto, novos estudos devem ser realizados afins da comprovação deste efeito bem como o mecanismo de atuação sobre os componentes inflamatórios presentes no granuloma e a sua utilização concomitante com o Praziquantel.

## REFERENCIAS

AHANGARPOUR, Akram. et al. Effects of Hydro-alcoholic Extract from *Arctium lappa* L. (Burdock) Root on Gonadotropins, Testosterone, and Sperm Count and Viability in Male Mice with Nicotinamide/ Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v. 22, n. 2, p. 25-32, Mar-Apr 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4438089/>>. Acesso em: 28 mai. 2015.

ALLAM, Gamal; EWEAS, Ahmad F.; ABUELSAAD, Abdelaziz SA. *In vivo* schistosomicidal activity of three novel 8-hydroxyquinoline derivatives against adult and immature worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 112, n. 9, p. 3137-3149, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3490-4>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

ALI, Sanaa A.; EL-REGAL, Nagy S.; SAEED, Samar M. Antischistosomal Activity of Two Active Constituents Isolated from the Leaves of Egyptian Medicinal Plants. **Infectious diseases**, v. 8, p. 5, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4479413/>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

ALLEGRETTI, Silmara Marques et al. **The use of Brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni***. INTECH Open Access Publisher, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/download/pdf/25967>>. Acesso em: 02 ago. 2014.

ALI, Sanaa A. Natural Products as Therapeutic Agents for Schistosomiasis. **Research Journal of Medicinal Plant**. v. 5, n. 1, p. 1-20, 2011. Disponível em: <<http://scialert.net/fulltext/?doi=rjmp.2011.1.20&org=10>>. Acesso em: 8 mar. 2015.

ALMEIDA, L. M. S. et al. In vitro evaluation of the schistosomicidal potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) extracts. **Natural product research**, v. 26, n. 22, p. 2137-2143, 2011. Disponível em: <[http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2011.631135#.VaD4h\\_7bKP8](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2011.631135#.VaD4h_7bKP8)>. Acesso em: 15 ago. 2014.

BARATA, Lauro ES et al. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 589-595, 2000. Disponível em:<  
[http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/11130669/Anti\\_leishmanial\\_activity\\_of\\_neolignans\\_from\\_Virola\\_species\\_and\\_synthetic\\_analogues\\_](http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/11130669/Anti_leishmanial_activity_of_neolignans_from_Virola_species_and_synthetic_analogues_)>.  
Acesso em: 8 mar. 2015.

BARSOUM, Rashad S.; ESMAT, Gamal; EL-BAZ, Tamer. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **Journal of advanced research**, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013. Disponível em:<  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000064>>. Acesso em: 15 set. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011.126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação: Minas Gerais**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 34 p. Disponível em:< [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema\\_nacional\\_vigilancia\\_saude\\_mg\\_5ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_mg_5ed.pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 812 p. Disponível em:<  
[http://www.hc.ufpr.br/arquivos/guia\\_vigilancia\\_saude\\_completo.pdf](http://www.hc.ufpr.br/arquivos/guia_vigilancia_saude_completo.pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2015.

CABRAL, M. M. O. et al. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 3, p. 319-324, 2010. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944690>>. Acesso em: 03 mar. 2015.

CASTRO, Aline Pereira et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: A review of bioactivity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 21, p. 1515-1522, 2013. Disponível em:<  
[http://www.academicjournals.org/article/article1380791221\\_Castro%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380791221_Castro%20et%20al.pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2014.

CHAI, Jong-Yil. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. **Infection & chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 32-43, 2013. Disponível em:<  
<http://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.3947/ic.2013.45.1.32&code=00861C&vmode=FULL>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

CHAN, Yuk-Shing et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 245-254, 2011. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981575](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981575)>. Acesso em: 25 ago.2014.

CIOLI, Donato; PICA-MATTOCCIA, Livia. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. S3-S9, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-002-0751-z>>. Acesso em: 13 ago.2014

CIOLI, Donato; PICA-MATTOCCIA, Livia; ARCHER, Sydney. Antischistosomal drugs: past, present... and future?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 35-85, 1995. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604437](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604437)>. Acesso em: 20 ago.2014.

CIOLI, Donato et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever?. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955523](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955523)>. Acesso em: 10 mar.2015.

CITADINI-ZANETTE, Vanilde; NEGRELLE, Raquel RB; BORBA, Elder Tschoseck. *Calendula officinalis* L.(ASTERACEAE): ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS E USOS. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 1, p. 6-23, 2012. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/academica/article/viewFile/30013/19400>>. Acesso em: 15 set. 2014

COURA, José Rodrigues; CONCEIÇÃO, Maria José. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 598-603, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000400040&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000400040&script=sci_arttext)>. Acesso em: 15 mar. 2015.

DE ALMEIDA, Adélia Emília et al. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n4/v44n4a22.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014

DE LA RUE, Mário Luiz. Eosinofilia devida a parasitos. **RBAC**, v. 33, n. 4, p. 221-223, 2001. Disponível em: <[sbac.org.br/rbac/045/639.pdf](http://sbac.org.br/rbac/045/639.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2014.

DE LIMA AIRES, André et al.  $\beta$ -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261-267, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24090700>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

DE MORAES, Josué. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current Topics in Tropical Medicine**, 2012.

Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/antischistosomal-natural-compounds-present-challenges-for-new-drug-screens>>. Acesso em: 16 ago. 2014.

DE MORAES, Josué et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3172-7#page-1>>. Acesso em: 12 ago. 2014

DE MORAES, Josue et al. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 548-558, 2011. Disponível em: <

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201000163/abstract>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

DE OLIVEIRA, Rosimeire Nunes et al. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Experimental parasitology**, v. 139, p. 63-72, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489414000277>>. Acesso em: 10 mar. 2015

DIAS, Mirna Meana. **Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto e metabólitos secundários dos frutos da *Arctium lappa* L. (Asteraceae)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

DOENHOFF, M. J. et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1825-1835, 2009. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281637)>. Acesso em: 20 ago.2014

ESMAT, Gamal; EL RAZIKY, Maissa. Antischistosomal therapy: Current status and recent developments. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687197909000082>>. Acesso em: 20 ago.2014

FABRI, Rodrigo Luiz et al. Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. Disponível em:

<<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/941318/abs/>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

FERRACANE, Rosalia et al. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 399-404, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708509001642>>. Acesso em: 25 ago.2014.

FILHO, G. B. **Bogliolo patologia geral**. 3<sup>o</sup> edição. Editora Guanabara: Rio de Janeiro, 2004.

GITHIORI, John B.; ATHANASIADOU, Spiridoula; THAMSBORG, Stig M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706002548>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

GOBERT, Geoffrey N. et al. An Ex Vivo Model for Studying Hepatic Schistosomiasis and the Effect of Released Protein from Dying Eggs. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003760>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

GODINHO, Loyana Silva et al. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/460342/>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

GRASES, F. et al. Urolithiasis and phytotherapy. **International Urology and Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 507-511, 1994. Disponível em: <<http://ibdigital.uib.es/greenstone/collect/laboratoriLitiasiRenal/archives/D073.dir/073.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014

GRAY, Darren J. et al. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, v. 342, 2011. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586478](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586478)>. Acesso em: 2 ago. 2014.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v.26, p.383–397, 2012. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632645)>. Acesso em: 2 ago. 2014.

GRYSEELS, Bruno et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997665>>. Acesso em: 2 ago. 2014.

GUIMARÃES, Maria A. et al. Anthelmintic Activity *In Vivo* of *Epiisopiloturine* against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003656-e0003656, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003656>>. Acesso em: 20 jun. 2015

HAMS, Emily; AVIELLO, Gabriella; FALLON, Padraic G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe?. **Frontiers in immunology**, v. 4, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596444>>. Acesso em: 25 out. 2014.

HATTORI, Eric Koiti Okiyama; NAKAJIMA, Jimi Naoki. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n.4, p. 687-749, 2008. Disponível em: <[http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59\\_4/005\(014-08\).pdf](http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_4/005(014-08).pdf)>. Acesso em: 25 ago.2014.

HAYASHI, Kyoko et al. Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza A virus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 7, p. 1199-1205, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606313>>. Acesso em: 27 ago.2014

HE, Fan et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of arctiin and its main metabolite in rats by HPLC-UV and LC-MS. **Planta medica**, v. 78, n. 8, p. 800-806, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499560>>. Acesso em: 10 set. 2014.

HERMETO, Marco Victor et al. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 2, p. 99-103, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7997798>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

HIROSE, Masao et al. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague–Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Cancer letters**, v. 155, n. 1, p. 79-88, 2000. . Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383500004110>>. Acesso em: 3 set. 2014.

JURBERG, Arnon D. et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Development genes and evolution**, v. 219, n. 5, p. 219-234, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415326>>. Acesso em: 15 junh. 2015

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology research**, v. 90, n. 2, p. S55-S62, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-002-0768-3>>. Acesso em: 3 set. 2014.

KEMPER, Kathi J. Burdock (*Arctium lappa*). **The Longwood Herbal Task Force**, p. 214-225, 2010. Disponível em: <<http://www.longwoodherbal.org/burdock/burdock.PDF>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

KING, Charles H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta tropica**, v. 113, n. 2, p. 95-104, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962954>>. Acesso em: 27 ago. 2014

KING, Charles H.; DICKMAN, Katherine; TISCH, Daniel J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **The Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-1569, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866310>>. Acesso em: 2 ago. 2014.

LAMBERTUCCI, José Roberto. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010. Disponível em: <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/component/k2/item/271-acute-schistosomiasis-mansoni-revisited-and-reconsidered>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

LEE, Sungwon et al. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-kB pathways. **Journal of Inflammation**, v. 8, p. 16, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146809/>>. Acesso em: 02 set. 2014.

LEE, Yun J. et al. *Arctium lappa* ameliorates endothelial dysfunction in rats fed with high fat/cholesterol diets. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 12, n.116, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22866890>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

LEE, Ji Yun et al. Dibenzylbutyrolactone Lignans from Forsythia koreana Fruits Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Inducible Nitric Oxide Synthetase and Cyclooxygenase-2 Expressions through Activation of Nuclear Factor-. KAPPA. B and Mitogen-Activated Protein Kinase in RAW264. 7 Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 1847-1853, 2010. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/11/33\\_11\\_1847/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/11/33_11_1847/_article)>. Acesso em: 25 ago. 2014.

LENZI, Henrique Leonel et al. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 5, p. 639-643, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412576>>. Acesso em: 25 out. 2014.

LENZI, Henrique L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 141-151, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921336>>. Acesso em: 25 out. 2014.

LIMA, Adriene R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 531-536, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2006000400016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2006000400016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 02 ago. 2014.

LINS, Romero Antunes Barreto et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, p. 173-178, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n2/a08v41n2.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

LIU, He et al. Determination of the major constituents in fruit of *Arctium lappa* L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 28, p. 2707-2711, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810325>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

MACHADO, Fabio Bahls et al. Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1852-1859, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/2/1852>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

MAGALHÃES, Lizandra G. et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096877>>. Acesso em: 13 maio 2015.

MAGALHÃES, Lizandra G. et al. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology research**, v. 106, n. 2, p. 395-401, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-009-1674-8>>. Acesso em: 13 maio 2015.

MAGALHÃES, Lizandra G. et al. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L.(Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-011-2695-7>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

MATI, V. L. T.; MELO, A. L. Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female *Schistosoma mansoni* and egg release in the intestine of AKR/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline. **Journal of helminthology**, v. 87, n. 01, p. 115-124, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390937>>. Acesso: 13 maio 2015.

MATSUZAKI, Youichirou et al. Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. **Oncology reports**, v. 19, n. 3, p. 721-727, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288407>>. Acesso em: 23 ago. 2014.

MISHRA, Bhuwan B.; TIWARI, Vinod K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523411005708>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

MORAES, Jd et al. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Med**, v. 79, n. 3-4, p. 253-258, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23408270>>. Acesso em: 13 maio 2015.

MOHAMED, Azza M.; METWALLY, Nadia M.; MAHMOUD, Sohair S. *Sativa seeds* against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 205-211, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000200016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000200016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 15 ago. 2014.

NDJONKA, Dieudonné et al. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395-3439, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3588050/>>. Acesso em: 05 ago.2014.

OLIVEIRA, Sara Menezes de et al. Association between allergic responses and *Schistosoma mansoni* infection in residents in a low-endemic setting in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 770-774, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822014000600770&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822014000600770&script=sci_arttext)>. Acesso em: 13 maio 2015.

PARREIRA, Natallia A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397234>>. Acesso em: 13 maio 2015.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. v.8, p. 589-597, 1956.

PEREIRA, A. C. et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (–)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v. 72, n. 11, p. 1424-1430, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570099>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

PICA-MATTOCCIA, Livia et al. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 307-312, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762006000900048&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762006000900048&script=sci_arttext)>. Acesso em: 07 mar. 2015.

PYRRHO, Alexandre S. et al. Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. **Parasitology research**, v. 92, n. 6, p. 478-483, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-004-1078-8#page-1>>. Acesso em: 25 out. 2014.

QIN, Kunming et al. Chemical analysis of raw and processed Fructus arctii by high-performance liquid chromatography/diode array detection-electrospray ionization-mass spectrometry. **Pharmacognosy magazine**, v. 10, n. 40, p. 541, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422559>>. Acesso em: 13 maio 2015.

ROKNI, M. B. **Schistosomiasis**. Editor, Teodora Smiljanic. 322p. 2012.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. **Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador**. 69p, 2008. Disponível em: <[http://www.alcb.ibio.ufba.br/pdf/nadia/Roque%20&%20Bautista\\_2008\\_Caracteriza%C3%A7%C3%A3o\\_e\\_morfologia\\_floral\\_.pdf](http://www.alcb.ibio.ufba.br/pdf/nadia/Roque%20&%20Bautista_2008_Caracteriza%C3%A7%C3%A3o_e_morfologia_floral_.pdf)>. Acesso em: 5 ago. 2014.

ROSS, A. G .P.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; McMANUS, D. P. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**. v.346, n.16, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11961151>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

SIQUEIRA, Liliane Maria Vidal et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 110, n. 2, p. 209-214, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946244>>. Acesso em: 25 mai.2015.

SOHN, Eun-Hwa et al. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. **Clinical and Molecular Allergy**. v. 9, n.4, 2011. Disponível em: <<http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/9/1/4>> Acesso em: 25 jul. 2014.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2011/v9n4/a2190>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

TEIXEIRA, Renan Salgado. **Isolamento e identificação da Arctigenina a partir dos frutos da *Arctium lappa* L. e a avaliação de atividade citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em ratos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013

TONUCI, Ligia RS et al. *In vitro* schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2011005000202&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2011005000202&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acesso em: 10 mar. 2015.

VERDI, Luiz Gonzaga; BRIGHENTE, Inês Maria Costa; PIZZOLATTI, Moacir Geraldo. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000100017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100017)>. Acesso em: 13 maio 2015.

VITORINO, Rodrigo Roger et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle\*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 10, n. 1, p. 39-45, jan-fev. 2012. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2012/v10n1/a2676> Acesso em: 20/08/2014

WANG, Wei; WANG, Li; LIANG, You-Sheng. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology research**, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052781>> Acesso em: 12 ago. 2014.

WANG, Yulan et al. A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 2, p. 191-196, 2005. Disponível em: <<http://www.wipm.cas.cn/jgsz/yjdw/cigongzhenyingyong/shengwuyixue/yanjiuchengguo/201204/W020120525419285123515.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

WU, Jian-Guo et al. Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1033-1041, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309001202>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

YEPES, Edward et al. *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine. **Journal.Pone**, v. 9, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109431>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n6/2914.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

**ANEXO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 025/2012 – CEEA sobre “ESTUDO DO POTENCIAL IMUNOMODULATOR DA BATATA PURIFICADA E SEUS PEPTÍDEOS SOBRE AS RESPOSTAS HUMORAL, DE CITOCINAS E INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 200 animais, conforme solicitado.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 025/2012- CEEA about “STUDY OF THE POTENCIAL IMUNOMODULATORY OF PURIFIED POTATO APYROSE AND ITS PEPTIDES ABOUT THE HUMORAL GRANULOMATUS INFLAMATORY AND CYTOKINSES RESPONSES IN EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASSES” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 200 animals were released, as requested

**Juiz de Fora, 20 de março de 2012.**

\_\_\_\_\_  
**Presidente/CEEA**

\_\_\_\_\_  
**Secretário/CEEA**