

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

**POLIANA DA SILVA COSTA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE**  
**ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS E METABÓLITOS DE**  
***Solidago microglossa* MEYEN (Asteraceae) E *Aristolochia cymbifera* MART &**  
**ZUCC (Aristolochiaceae)**

**JUIZ DE FORA, MG**

**2016**

**POLIANA DA SILVA COSTA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS E METABÓLITOS DE  
*Solidago microglossa* MEYEN (Asteraceae) E *Aristolochia cymbifera* MART &  
ZUCC (Aristolochiaceae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

JUIZ DE FORA, MG

2016

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

Costa, Poliana da Silva.

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade esquistossomicida in vitro dos extratos e metabólitos de *Solidago microglossa* MEYEN (Asteraceae) e *Aristolochia cymbifera* MART & ZUCC (Aristolochiaceae) / Poliana da Silva Costa. -- 2016.

122 f. : il.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. *Solidago microglossa*. 2. *Aristolochia cymbifera*. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. terpenos. 5. lignanas. I. da Silva Filho, Ademar Alves, orient. II. Título.

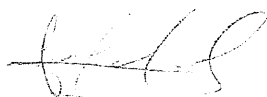
**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS E METABÓLITOS DE  
*Solidago microglossa* MEYEN (Asteraceae) E *Aristolochia cymbifera* MART &  
ZUCC (Aristolochiaceae)**

**Poliana da Silva Costa**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho**

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

Aprovada em 27/07/2016



---

Prof. Dr. Josué de Moraes



---

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Priscila de Faria Pinto



---

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

*“Aonde você quer chegar? Ir alto... sonhe alto... queira o  
melhor do melhor... queira coisas boas para a vida... pensando assim  
trazemos para nós aquilo que desejamos.  
Porque sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura.”*  
(Carlos Drummond de Andrade)

*“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que a fez tão importante.”*  
(O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry)

*Aos meus pais Nilton e Vera, a minha vó Maria e aos meus queridos  
amigos Clarissa e Paulo Henrique, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Nada disso teria sido possível se não fosse a presença constante de Deus em minha vida. Obrigada, meu Deus, por não me deixar desistir, por sempre guiar os meus passos e me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais Nilton e Vera que me ensinaram tudo o que sei por seus exemplos. Agradeço, em especial, a minha mãe que escolheu o meu nome, o nome da garotinha americana que, por muito tempo, foi o símbolo do otimismo, da bondade e da esperança. O símbolo daquela que sempre acreditou que não importava os caminhos tortuosos e difíceis, pois sempre haveria algo bom para acontecer no fim de tudo.

A minha vó Maria, a dona dos olhos verdes mais lindos que já vi, agradeço. Como te queria aqui comigo! Te amo para todo o sempre!

Agradeço imensamente ao Prof. Ademar por esses anos de ensinamentos científicos e de vida e, por inúmeras vezes, ter acreditado em mim mais do que eu mesma. Palavras são insuficientes nesse momento!

Aos meus queridos amigos Rodolfo, Felipe e Vinícius, verdadeiros presentes que a Faculdade de Farmácia me deu. Vocês sempre estiveram do meu lado me apoiando, incentivando e tornando os meus dias melhores. Amizades da vida!

À Lílian, fiel parceira no primeiro ano de iniciação, pelos momentos tão especiais que passamos juntas, pelas conversas e pelas alegrias que compartilhamos.

Aos amigos do Nippan, minha segunda família, com os quais tive momentos preciosos e que serão sempre lembrados por mim. Existe um pouco de cada um de vocês no meu trabalho e um pouco de cada um em mim. Juntos, somos um! Obrigada!

À Debora, grande amiga nessa jornada! Com certeza os nossos momentos de alegrias e risadas intermináveis me ajudaram a superar as dificuldades que surgiram ao longo do caminho. Obrigada!

Em especial, agradeço a Lorena, grande parceira e amiga neste fim de mestrado. O amor pelos gatos pode até ter nos aproximado no início, mas hoje esta amizade criou raízes profundas e tenho certeza que irá durar por muito tempo, estando perto ou longe. Obrigada por tudo, de coração!

Aos meus queridos amigos Clarissa e Paulo Henrique! Amizades que a distância não diminui e o tempo não apagará jamais. Se hoje finalizo essa etapa, foi, em grande parte, porque vocês estiveram no início. Amo vocês demais da conta!

À Carol, a nossa multifunções da CentralBio, por toda a disponibilidade, atenção, paciência e carinho que me dedicou ao longo do meu trabalho.

Ao Marcos e Sílvia, que nos receberam tão generosamente no Instituto AdolfoLutz.

Ao Prof. Josué, pelos ensaios esquistossomicidas realizados e por ter aberto as portas do seu laboratório para nós.

Ao Departamento de Química pelo uso do equipamento de RMN.

À Faculdade de Farmácia pela minha profissão, a qual tenho muito orgulho, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade dessa conquista.

À CAPES e Fapemig pelos recursos fornecidos para a execução deste trabalho.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida, muito obrigada!



## RESUMO

A esquistossomose afeta cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo e, no Brasil, estima-se que o número de pessoas infectadas está entre 4-6 milhões de pessoas sendo Minas Gerais um dos estados que tem o maior número de casos de esquistossomose. O tratamento da doença se baseia em um único fármaco: o Praziquantel (PZQ), entretanto, já há relatos de traços de resistência. Neste âmbito, extratos brutos e metabólitos secundários de plantas vêm sendo testados frente ao *Schistosoma mansoni*. Assim, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico dos extratos brutos das raízes de *Solidago microglossa* (Sm-R) e *Aristolochia cymbifera* (Ac) e de seus metabólitos isolados. A partir do fracionamento cromatográfico de Sm-R, foram isolados e identificados três metabólitos: espinasterol, bauerenol e  $\alpha$ -amirina, sendo os dois últimos relatado pela primeira vez nas raízes da espécie. O fracionamento cromatográfico de Ac resultou no isolamento e identificação do ácido populifólico e da cubebina, ambos já isolados na espécie. No estudo esquistossomicida *in vitro* foi utilizado vermes adultos de *S. mansoni* e os parâmetros avaliados foram alterações tegumentares, oviposição, motilidade e mortalidade. Previamente ao ensaio, a citotoxicidade dos extratos foi avaliada em células Vero e não houve redução na viabilidade celular. Os resultados deste estudo demonstraram que, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , Sm-R foi capaz de promover redução da atividade motora, alterações tegumentares e morte de todos os vermes adultos de *S. mansoni* após 72 h de incubação. Ainda, alterações tegumentares foram verificadas, bem como significativa redução da oviposição. Em relação ao extrato Ac, este foi capaz de causar redução da atividade motora, alterações tegumentares e morte dos vermes adultos após 24 h de incubação na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , além de promover redução da oviposição. Dentre as substâncias isoladas, a mistura de bauerenol e  $\alpha$ -amirina, espinasterol, ácido populifólico e cubebina demonstraram-se pouco ativos e apenas a subfração Sm-R IV 5 promoveu redução da atividade motora e morte dos parasitos em 100  $\mu\text{g/mL}$  após 48 h de incubação. Desta forma, a continuidade do estudo faz-se necessária a fim de se identificar as substâncias responsáveis pela atividade dos extratos Sm-R e Ac.

**Palavras chave:** *Solidago microglossa*; *Aristolochia cymbifera*; *Schistosoma mansoni*; terpenos; lignanas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis affects about 207 million people in the world and, in Brazil, it is estimated that the number of infected people is 4-6 million people with Minas Gerais being one of the states that have the highest number of cases of schistosomiasis. The treatment of the disease is based on a single drug: Praziquantel (PZQ), however, there are already reports of resistance trait. In this context, extracts and secondary plant metabolites have been tested against the *Schistosoma mansoni*. The present work describes the phytochemical study of crude extracts from the roots of *Solidago microglossa* (Sm-R) and *Aristolochia cymbifera* (Ac) and its metabolites isolated. From the chromatographic fractionation of Sm-R, were isolated and identified three metabolites: spinasterol,  $\alpha$ -amyrin and bauerenol, the latter two being reported for the first time in the roots of species. Since the chromatographic fractionation Ac culminated in the isolation and identification of populifolic acid and cubebin, both already isolated in species. In the *in vitro* schistosomicidal study, was used adult worms of *S. mansoni* and the parameters evaluated were alterations tegumental surface, oviposition, motility and mortality. Previous to the assay, cytotoxicity of the extracts was evaluated in Vero cells and there was no reduction in cell viability. The results showed that the concentration of 200 ug / ml Sm-R was able to decrease motor activity, alterations tegumental surface and death of all the adult worms of *S. mansoni* after 72 h of incubation, as well as significant reduction in oviposition. Already Ac extract, this was capable of causing reduction of motor activity, alterations tegumental surface and death of adult worms after 24 h of incubation at a concentration of 50 mg / mL, and promote reduction of oviposition. Among the isolated compounds, the mixture of bauerenol and  $\alpha$ - amyrin, spinasterol, populifolic acid and cubebin showed weak activity and only the Sm-R 5 IV promoted reduction of motor activity and death of the parasites in 100 ug / mL after 48 h of incubation. Thus, the continuity of the study is necessary in order to identify the substances responsible for the activity of the extracts Sm-R and Ac.

**Keywords:** *Solidago microglossa*; *Aristolochia cymbifera*; *Schistosoma mansoni*; terpenes; lignans

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	-Extrato bruto das raízes de <i>Aristolochia cymbifera</i>
AcOEt	-Acetato de Etila
ADP	-Adenosina difosfato
AFA	-Ácido acético glacial: formaldeído: etanol: água destilada (2: 9: 30:59)
ATP	-Adenosina trifosfato
CC	-Cromatografia em coluna clássica
CCD	-Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	-Clorofórmio deuterado
CF	-Cromatografia em coluna <i>flash</i>
CG-EM	-Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	-Cromatografia Líquida à Vácuo
CO <sub>2</sub>	-Dióxido de carbono
DAD	-Detector de Fotodiodo
DCM	-Diclorometano
DMSO	-Dimetilsulfóxido
DTN	-Doenças Tropicais Negligenciadas
Hex	-Hexano
<i>J</i>	-Constante de acoplamento
<i>m</i>	-Multiplete
<i>m/z</i>	-Relação massa/carga
MeOH	-Metanol
MHz	-Megahertz
mL/min	-Mililitro por minuto
NIST	-National Institute of Standards and Technology
nm	-Nanômetro
OMS	-Organização Mundial da Saúde
ppm	-Parte por milhão

PZQ	-Praziquantel
RENISUS	-Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN <sup>13</sup> C	-Ressonância Magnética de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	-Ressonância Magnética de Hidrogênio
RPMI	-Roswell Memorial Park Institute
Sm-R	-Extrato bruto das raízes de <i>Solidago microglossa</i>
SUS	-Sistema Único de Saúde
TGO	-transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	-transaminase glutâmico-pirúvica
T <sub>R</sub>	-Tempo de retenção
UV	-Ultravioleta
v/v	-Volume por volume
μg/mL	-Microgramas por mililitro
μM	-Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> .....	3
Figura 2 -	Estrutura química do Praziquantel.....	4
Figura 3 -	Flavonoides com atividade esquistossomicida.....	7
Figura 4 -	Alcaloides com atividade esquistossomicida.....	8
Figura 5 -	Terpenos com atividade esquistossomicida.....	9
Figura 6 -	Lignanans com atividade esquistossomicida.....	11
Figura 7 -	Foto da espécie <i>S. microglossa</i> .....	15
Figura 8 -	Substâncias isoladas e identificadas de <i>S. microglossa</i> .....	19
Figura 9 -	Foto da espécie <i>A. cymbifera</i> .....	23
Figura 10 -	Substâncias isoladas e identificadas de <i>A. cymbifera</i> .....	25
Figura 11 -	Fluxograma simplificado do isolamento das substâncias de Sm-R.....	33
Figura 12 -	Fluxograma simplificado do isolamento das substâncias de Ac	36
Figura 13 -	Esquema simplificado do ensaio esquistossomicida <i>in vitro</i> dos extratos Sm-R e Ac.....	40
Figura 14 -	Tegumento intacto do <i>S. mansoni</i> .....	41
Figura 15 -	Análise cromatográfica e espectro de UV do extrato bruto Sm-R em CLAE-DAD.....	42
Figura 16 -	Espectros de UV dos picos majoritários do extrato bruto Sm-R em CLAE-DAD.....	43
Figura 17 -	Cromatograma da fração Sm-R III em CG-EM.....	44
Figura 18 -	Espectro de massas do pico 2 da fração Sm-R III obtido por CG-EM.....	44
Figura 19 -	Estrutura química da $\alpha$ -amirina.....	45
Figura 20 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração Sm-R III.....	47
Figura 21 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ referente aos sinais de $\alpha$ -amirina presente na fração Sm-R III (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	48
Figura 22 -	Espectro de massas do pico 6 da fração Sm-R III obtido por	50

	CG-EM.....	
Figura 23 -	Estrutura química do bauerenol.....	50
Figura 24 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C referente aos sinais do bauerenol presente na fração Sm-R III (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	52
Figura 25 -	Cromatograma da subfração Sm-R IV 6 em CG-EM.....	54
Figura 26 -	Espectro de massas da subfração Sm-R IV 6 obtido por CG-EM.....	54
Figura 27 -	Estrutura química do espinasterol.....	54
Figura 28 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do espinasterol (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )....	57
Figura 29 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do espinasterol (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )...	58
Figura 30 -	Perfil cromatográfico do extrato Ac em CLAE-DAD.....	60
Figura 31 -	Espectros de UV dos picos majoritários presentes no extrato bruto Ac em CLAE-DAD.....	60
Figura 32 -	Estrutura química do ácido populifólico.....	61
Figura 33 -	Estrutura química dos diterpenos ácido populifólico e do ácido <i>epi</i> -populifólico.....	62
Figura 34 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do ácido populifólico (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	64
Figura 35 -	Análise cromatográfica do extrato bruto Ac e subfração Ac 5-c <sub>IV</sub> em CLAE-DAD.....	66
Figura 36 -	Estrutura química da cubebina.....	67
Figura 37 -	Mistura de estereoisômeros da cubebina.....	68
Figura 38 -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da cubebina (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	70
Figura 39 -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da cubebina (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	71
Figura 40 -	Viabilidade celular do extrato Sm-R em células Vero.....	73
Figura 41 -	Viabilidade celular do extrato de Ac em células Vero.....	74
Figura 42 -	Alterações no tegumento de <i>S. mansoni</i> em presença do extrato Sm-R.....	79
Figura 43 -	Alterações no tegumento de <i>S. mansoni</i> em presença do extrato Ac.....	79

Figura 44 -	Contagem do número de tubérculos intactos no tegumento de <i>S. mansoni</i> após exposição ao extrato Sm-R.....	80
Figura 45 -	Contagem do número de tubérculos intactos no tegumento de <i>S. mansoni</i> após exposição ao extrato Ac.....	81
Figura 46 -	Efeito extrato Sm-R, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de <i>S. mansoni</i> .....	83
Figura 47 -	Efeito extrato Ac, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de <i>S. mansoni</i> .....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compostos isolados e identificados das partes aéreas de espécies de <i>Solidago</i> .....	13
Tabela 2 -	Compostos isolados e identificados de caules e raízes de <i>Solidago</i> .....	14
Tabela 3 -	Compostos isolados e identificados das partes aéreas de espécies de <i>Aristolochia</i> .....	21
Tabela 4 -	Compostos isolados e identificados dos caules e raízes de espécies de <i>Aristolochia</i> .....	22
Tabela 5 -	Frações obtidas por CLV do extrato Sm-R.....	31
Tabela 6 -	Subfrações obtidas por CC da fração Sm-R IV.....	32
Tabela 7 -	Frações obtidas por CLV do extrato Ac.....	34
Tabela 8 -	Subfrações obtidas por CLV da fração Ac 2.....	34
Tabela 9 -	Subfrações obtidas por CCF da fração Ac 5.....	35
Tabela 10 -	Subfrações obtidas por CCF da subfração Ac 5-c.....	35
Tabela 11 -	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da α-amirina.....	46
Tabela 12 -	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do bauerenol.....	51
Tabela 13 -	Dados de RMN de <sup>13</sup> C do espinasterol (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	56
Tabela 14 -	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do ácido populifólico.....	63
Tabela 15 -	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da cubebina.....	69
Tabela 16 -	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da cubebina.....	69
Tabela 17 -	Efeito do extrato Sm-R frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	75
Tabela 18 -	Efeito do extrato Ac frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	76
Tabela 19 -	Efeitos das substâncias isoladas de Sm-R frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	86
Tabela 20 -	Efeitos do ácido populifólico e cubebina frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	88



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Esquistossomose.....	1
1.2	Produtos naturais e agentes esquistossomicidas.....	4
1.2.1	Flavonoides.....	6
1.2.2	Alcaloides.....	7
1.2.3	Terpenos.....	9
1.2.4	Lignanas.....	10
1.3	Família Asteraceae, o gênero <i>Solidago</i> e a espécie <i>Solidago microglossa</i> .....	11
1.4	Família Aristolochiaceae, o gênero <i>Aristolochia</i> e a espécie <i>Aristolochia cymbifera</i> .....	20
2	OBJETIVOS.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Instrumentação e materiais cromatográficos.....	28
3.2	Coleta e identificação do material vegetal.....	29
3.3	Obtenção dos extratos brutos das raízes de <i>S. microglossa</i> e <i>A. cymbifera</i> .....	29
3.4	Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE).....	30
3.5	Análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	30
3.6	Fracionamento do extrato Sm-R .....	31
3.6.1	Fração Sm-R IV.....	32
3.7	Fracionamento do extrato Ac.....	33
3.7.1	Fração Ac 2.....	34
3.7.2	Fração Ac 5 .....	35
3.8	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade esquistossomicida.....	37

3.8.1	Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> .....	37
3.8.1.1	Linhagem do <i>S. mansoni</i> .....	37
3.8.1.2	Manutenção do ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i> .....	37
3.8.2	Preparo das amostras para o ensaio.....	38
3.8.3	Avaliação da citotoxicidade.....	38
3.8.4	Ensaio esquistossomicida <i>in vitro</i> .....	38
3.8.5	Avaliação da oviposição.....	39
3.8.5.1	Análise morfológica do tegumento dos vermes adultos utilizando microscopia confocal.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Análise em CLAE-DAD do extrato Sm-R.....	42
4.1.1	Identificação estrutural das substâncias de Sm-R.....	43
4.1.2	Fração Sm-R III.....	43
4.1.3	Subfração Sm-R IV 5.....	53
4.1.4	Subfração Sm-R IV 6.....	53
4.2	Análise em CLAE-DAD do extrato Ac.....	59
4.2.1	Identificação da Substância Ac-2d.....	61
4.2.2	Identificação da subfração Ac 5-c IV.....	65
4.3	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> dos extratos Sm-R e Ac e substâncias isoladas.....	73
5	CONCLUSÕES.....	90

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esquistossomose

A Organização Mundial de Saúde (OMS) elenca 17 doenças identificadas por seu impacto sobre a população e que se concentram nas regiões mais pobres dos países em desenvolvimento social e econômico passando a denominá-las como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). Nestes países, além da alta taxa de mortalidade, tais doenças são capazes de causar efeitos deletérios como a redução da produtividade dos adultos, impactando diretamente sobre a economia familiar, além de afetar o desenvolvimento de crianças. No entanto, não são consideradas mercado prioritário para a indústria farmacêutica, porém estima-se que 1,4 bilhões de pessoas possam ter a qualidade de vida comprometida pela exposição a essas doenças (NASCIMENTO et al., 2014; HOTEZ et al., 2016; LENK et al., 2016; HOUWELING et al., 2016).

Neste contexto, a esquistossomose mansônica, classificada como DTN, é uma parasitose causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, afeta, aproximadamente, 207 milhões de pessoas. Estima-se que 780 milhões habitam áreas endêmicas e, conseqüentemente, encontram-se sob o risco de infecção. No Brasil, o número de pessoas infectadas é de 4 a 6 milhões com alta prevalência da doença no estado de Minas Gerais, com 1293 casos confirmados em 2015 (DATASUS, 2015) (LAMBERTUCCI et al., 2013; DINIZ et al., 2014; CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2015).

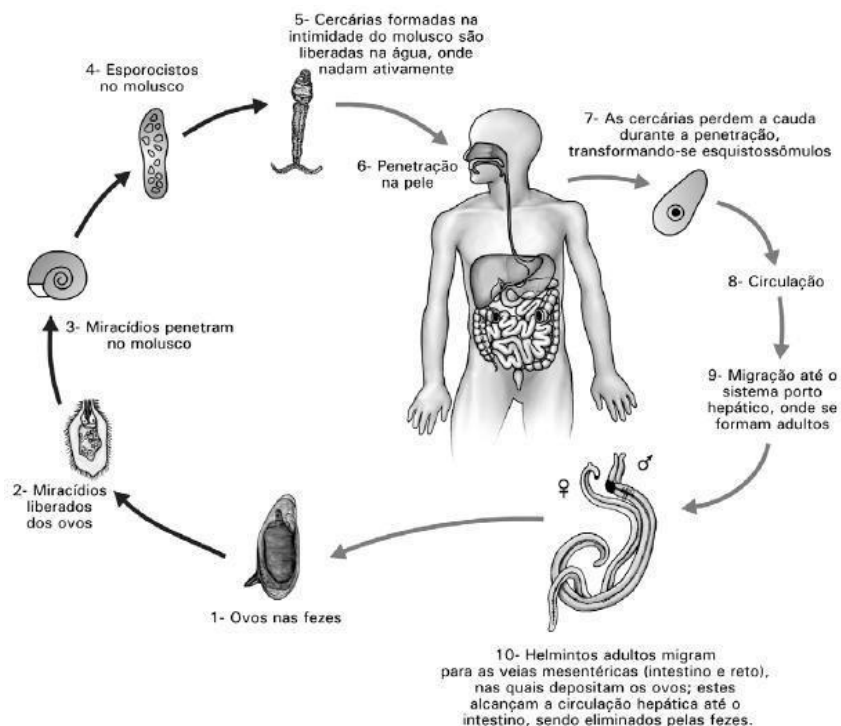
As principais espécies capazes de infectar o ser humano e causar a esquistossomose intestinal são representadas pelo *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mekongi*, enquanto a esquistossomose urogenital provém da infecção pelo *Schistosoma haematobium*. Dentre estas, a espécie responsável pela transmissão da doença no Brasil é o *S. mansoni* (RICHTER et al., 2015).

O *S. mansoni* é um parasito trematódeo, dioico e que apresenta acentuado dimorfismo sexual. Os parasitos machos são menores (cerca de 1 cm), esbranquiçados e possuem o tegumento recoberto de tubérculos, além de um sulco longitudinal ou canal ginecóforo responsável por abrigar e fecundar a fêmea. As fêmeas, por sua vez, são mais delgadas, mais escuras, medem aproximadamente 1,5 cm de comprimento e a topografia de seu corpo é mais simples que a do macho e com o tegumento liso (MELO & COELHO et al., 2005).

Para seu desenvolvimento, o *S. mansoni* necessita de um hospedeiro intermediário para que possa alcançar a forma infectante do hospedeiro definitivo, o homem. Pertencente ao gênero *Biomphalaria*, três espécies de caramujo podem ser encontradas infectadas pelo *S. mansoni*, a saber: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. Porém, a espécie *B. glabrata* é a mais estudada em virtude de sua maior susceptibilidade ao parasito, assim como sua ampla distribuição geográfica em relação às demais espécies (MORGAN et al., 2001; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; ALBERTO- SILVA et al., 2015; ROCHA-FILHO et al., 2015).

Em síntese, o ciclo de vida do *S. mansoni* se realiza da seguinte maneira: o casal de parasitos, acasalados no sistema porta hepático o hospedeiro definitivo, produz os ovos e estes são liberados através das fezes da pessoa infectada. Se depositados em ambiente aquático, os ovos amadurecem e liberam os miracídeos que podem infectar os caramujos do gênero *Biomphalaria*. No interior dos caramujos, os miracídeos se reproduzem assexuadamente dando origem aos esporocistos, os quais darão origem às cercárias e estas, liberadas na água. As cercárias penetram ativamente através da pele do homem e transformam-se nas formas jovens do *S. mansoni*, os esquistossômulos, que migram para a circulação hepatoportal, onde amadurecem em vermes adultos machos e fêmeas. Após o acasalamento, os pares de vermes adultos migram para a circulação mesentérica onde produzem os ovos, responsáveis pela lesão imunopatológica (KUNZ et al., 2001; DUVAL et al., 2015) (Figura 1).

**Figura 1:** Ciclo de vida do *S. mansoni*. **Fonte:** Souza et al., 2011.



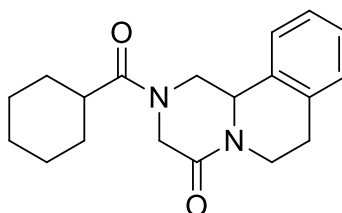
Duas principais condições clínicas caracterizam a esquistossomose mansônica: fase aguda e fase crônica. A primeira envolve o quadro febril sem o aparecimento de ovos nas fezes e, geralmente, ocorre entre 6-8 semanas após a infecção. Por sua vez, a fase crônica, manifesta-se pela inflamação granulomatosa hepática em resposta aos ovos do parasito no tecido, além de fibrose periportal, hepatoesplenomegalia e ascite (SCHRAMM et al., 2010; NDLOVU et al., 2014; NEGRÃO-CORREA et al., 2014).

O diagnóstico da enfermidade é fundamental tanto para a monitorização da doença quanto para eficácia do tratamento. Assim, o padrão ouro de diagnóstico da esquistossomose é a detecção de ovos nas fezes pelo método Kato-Katz. Todavia, limitações da técnica como, por exemplo, pequena quantidade de material fecal analisado e baixa produção de ovos em pacientes de áreas não endêmicas podem subestimar o verdadeiro número de pacientes infectados contribuindo, desta forma, com o aumento na transmissão da doença e o adiamento no tratamento (CARVALHO et al., 2014; LAMBERTON et al., 2014; SILVA-MORAES et al., 2014).

O desenvolvimento de vacina para o controle da esquistossomose tem se deparado com a complexidade dos diversos estágios de vida do parasito, bem como de sua habilidade de evasão ao sistema imunológico. Em virtude disto, a quimioterapia ainda é a única forma mais eficaz no controle da doença, associado a medidas de sanitização (FONSECA et al., 2015; GONÇALVES DE ASSIS et al., 2015).

Desenvolvido na década de 70, o Praziquantel, PZQ, (Figura 2) é, até os dias atuais, o único medicamento para o tratamento da esquistossomose. Aliado a benefícios tais como eficácia, segurança e custo, o PZQ tem-se mostrado efetivo para este propósito (DONG et al., 2010; DUAN et al., 2012; CIOLI et al., 2014). Porém, a dependência e confiança no PZQ podem colocar em risco o tratamento dos pacientes, uma vez que estudos apontam casos de baixa sensibilidade do fármaco frente aos vermes, bem como a ineficácia frente às formas jovens, os esquistossômulos (DE MORAES et al., 2012; KASINATHAN et al., 2012).

**Figura 2:** Estrutura química do Praziquantel.



Em vista da necessidade de novos fármacos com atividade esquistossomicida, a comunidade científica tem se dedicado à busca por novas moléculas estimulada pelo grande potencial oferecido pelos produtos naturais frente a diversos parasitos (DE MELO et al., 2011; NDJONKA et al., 2013; RIAD et al., 2013; FABRI et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015).

## 1.2 Produtos naturais e agentes esquistossomicidas

Doenças infecciosas causadas por diversos microrganismos e parasitos, além de outras doenças, têm afligido a humanidade desde os primórdios da civilização. Com o advento da medicina moderna, nos últimos 150 anos, o uso de fármacos tem sido

empregado com o intuito de sanar as enfermidades e melhorar a qualidade de vida. Porém, por séculos, a utilização de plantas medicinais para a cura de doenças configurou-se como o principal suporte terapêutico para o homem (NDJONKA et al., 2013; WINK, et al., 2015).

O uso popular de plantas medicinais para os cuidados primários à saúde ainda se mantém expressivo nos dias atuais com, aproximadamente, 80% da população utilizando-se deste recurso natural, de acordo com dados da OMS. Isto posto, os recursos vegetais apresentam-se como o ponto de partida para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos, algo que, há muito, vem despertado o interesse da comunidade científica quanto a elucidação e confirmação de suas propriedades terapêuticas. (BANERJEE et al., 2015; MARTINS et al., 2015; OLORUNNISOLA et al., 2015; ZIAEI et al., 2015).

Dentro desta conjuntura, os países em desenvolvimento são cenários das chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas, as quais representam-se principalmente pela tripanossomíase, leishmaniose, filariose linfática, malária e esquistossomose. Aliado a escassez de terapias medicamentosas para o tratamento destas doenças, estão os casos de resistência aos fármacos utilizados e ausência de vacinas para a prevenção e cura das mesmas. Sendo assim, postula-se o desenvolvimento de novas moléculas ativas e as fontes naturais, especialmente as plantas mediante a biossíntese dos metabólitos secundários ou metabólitos especiais, vêm fomentando as pesquisas científicas (HAREL et al., 2013; NDJONKA et al., 2013; THAO et al., 2015).

De posse de, aproximadamente, 20% da biodiversidade vegetal distribuída no mundo, o Brasil destaca-se por sua expressiva utilização de plantas medicinais. Ainda, muitas destas encontram-se inseridas no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro para o tratamento de diversas enfermidades corroborando, assim, a importância das plantas medicinais no país (RIBEIRO et al., 2014; ALERICO et al., 2015).

Em virtude da singular importância dos produtos naturais quanto à descoberta de novas substâncias com potencial antiparasitário, pesquisadores têm se empenhado no estudo de plantas medicinais na busca por extratos vegetais ou metabólitos secundários isolados promissores, os quais possam ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos como, por exemplo, os esquistossomicidas (RAMALHETE et al., 2012; NDJONKA et al., 2013; DE MORAES et al., 2015).

Diversos extratos vegetais também têm mostrado potencial atividade esquistossomicida. Por exemplo, o extrato bruto diclorometânico das folhas de

*Baccharis trimera* (Asteraceae) foi capaz de promover mortalidade *in vitro* dos vermes adultos de *S. mansoni*, bem como redução do número de vermes *in vivo* em camundongos infectados. Vale ressaltar que estudos fitoquímicos evidenciaram, além da presença de compostos fenólicos, o isolamento de diterpenos, especialmente clerodanos e labdanos das folhas desta espécie vegetal (VERDI et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

De forma semelhante, os extratos hexânico e diclorometânico da espécie *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae) foram efetivos *in vitro* em concentrações de 50 e 75 µg/mL, respectivamente, frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. Ainda, o extrato dos frutos de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae), dos quais é factível o isolamento preponderante de alcaloides, reduziu o número de ovos e formação de granuloma no fígado em camundongos parasitados pelo *S. mansoni* (ALMEIDA et al., 2012; MIRANDA et al., 2013; de OLIVEIRA et al., 2014).

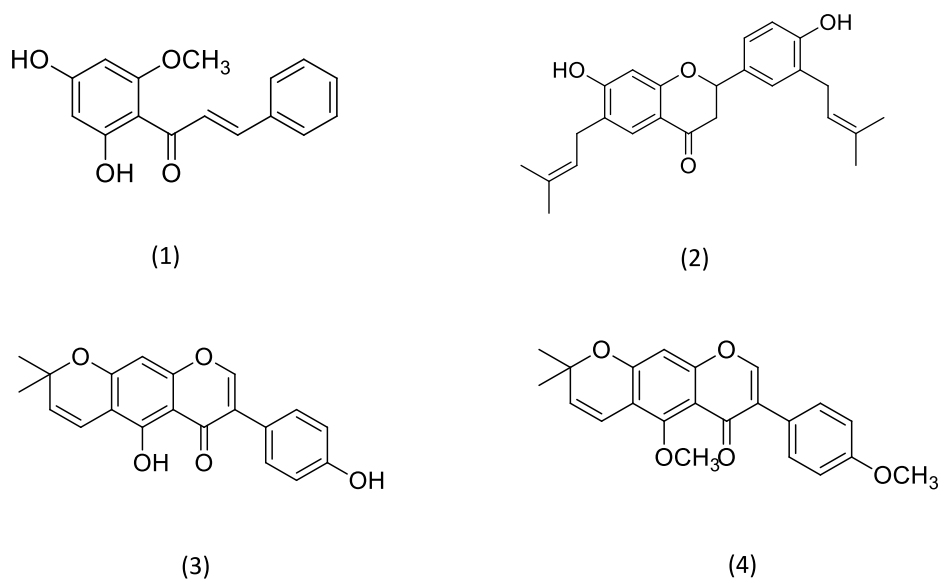
No contexto pela busca de novos fármacos esquistossomicidas, a literatura destaca trabalhos realizados com o objetivo de isolar e caracterizar compostos naturais biologicamente ativos frente ao *S. mansoni*. Estão listadas, a seguir, classes de metabólitos secundários (flavonoides, alcaloides, lignanas e terpenos) biossintetizadas pelas plantas e que apresentaram atividades esquistossomicida *in vitro* e/ou *in vivo* (DE MORAES, 2015).

### **1.2.1 Flavonoides**

Os flavonoides pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, os quais se encontram extensivamente distribuídos no reino vegetal com cerca de 8000 flavonoides de diferentes subgrupos isolados e identificados. Devido a sua grande diversidade química, os flavonoides são propostos por exercerem suas atividades em uma grande variedade de doenças, incluindo a esquistossomose (NEVES et al., 2015; HOSSAIN et al., 2016; MATIAS et al., 2016). Na figura 3, encontram-se flavonoides que denotaram atividade esquistossomicida.



**Figura 3:** Flavonoides com atividade esquistossomicida.



A cardamonina (1), chalcona isolada das inflorescências de *Piper aduncum* (Piperaceae), apresentou-se potencialmente ativa ao inibir importantes parâmetros para atividade esquistossomicida *in vitro*. Dentre os quais, encontram-se redução da atividade motora, alterações tegumentares e redução da oviposição, além da mortalidade de todos os vermes adultos quando esta foi avaliada nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . De forma semelhante, a licoflavona B (2), isolada das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae), também se demonstrou ativa, *in vitro*, frente ao *S. mansoni*, tendo em vista os mesmos critérios de avaliação para a cardamonina (ALEIXO DE CARVALHO et al., 2015; DE CASTRO et al., 2015).

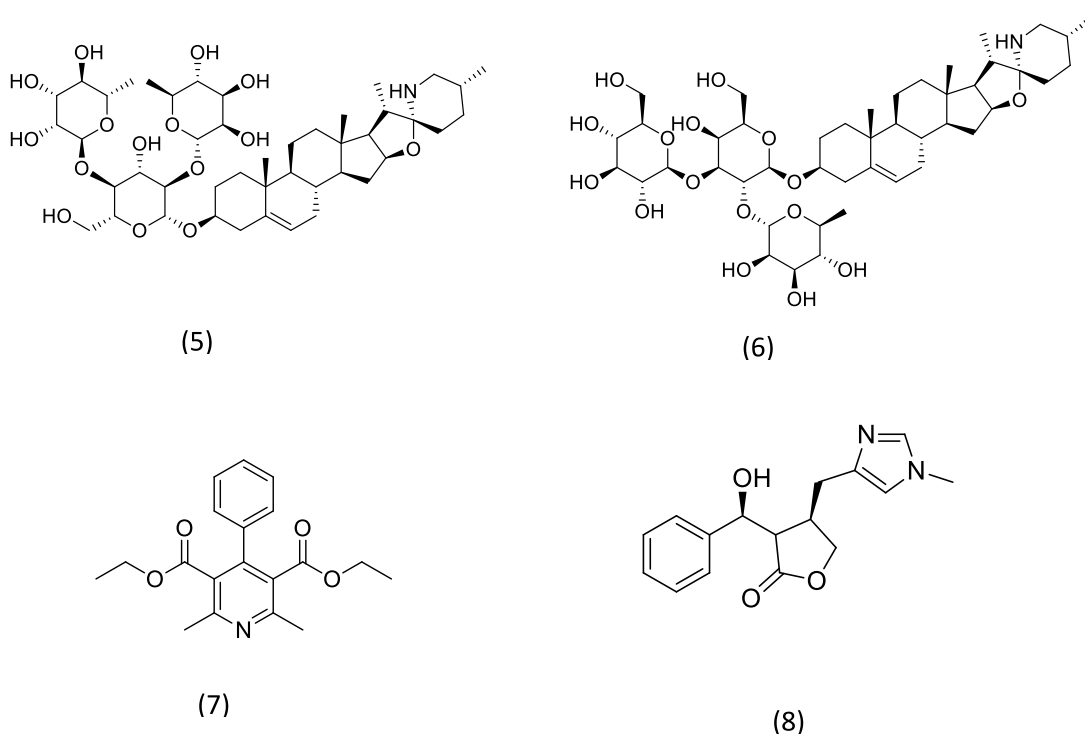
Já as isoflavonas alpinosiflavona (3) e dimetilalpinosiflavona (4), ambas isoladas das sementes de *Milletia thonningii* (Leguminosae), mostraram-se ativas nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  no estudo *in vitro* frente à miracídeos, cercárias e vermes adultos de *S. mansoni* (LYDDIARD et al., 2002).

### 1.2.2 Alcaloides

Os alcaloides são reportados na literatura como um diversificado grupo de compostos que possuem, além de um anel em sua estrutura, um átomo de nitrogênio. Com cerca de 12.000 substâncias já identificadas, diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a estes compostos como, por exemplo, atividades analgésica, antitumoral, anti-hipertensiva e antiemética (LU et al.,

2012; CUSHNIE et al., 2014; CHOWŃSKI et al., 2016). Sobre a atividade antiparasitária frente aos vermes de *S. mansoni*, a figura 4 apresenta alguns destes alcaloides.

**Figura 4:** Alcaloides com atividade esquistossomicida.



Solamargina (5) e solasodina (6), alcaloides isolados dos frutos de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae), demonstraram significativa atividade esquistossomicida frente a vermes adultos. Nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  para solasodina e 32 e 50  $\mu\text{M}$  para o alcaloide solamargina houve a separação de todos os casais, extensiva ruptura do tegumento, além de morte dos parasitos *in vitro* (MIRANDA et al., 2012).

Do mesmo modo, o alcaloide piridínico (7) isolado das raízes de *Jatropha elliptica* (Euphorbiaceae) apresentou significativa atividade *in vitro* quando avaliado frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , o alcaloide promoveu extensivos danos ao tegumento dos parasitos, além de redução da atividade motora e morte dos mesmos (DOS SANTOS et al., 2014).

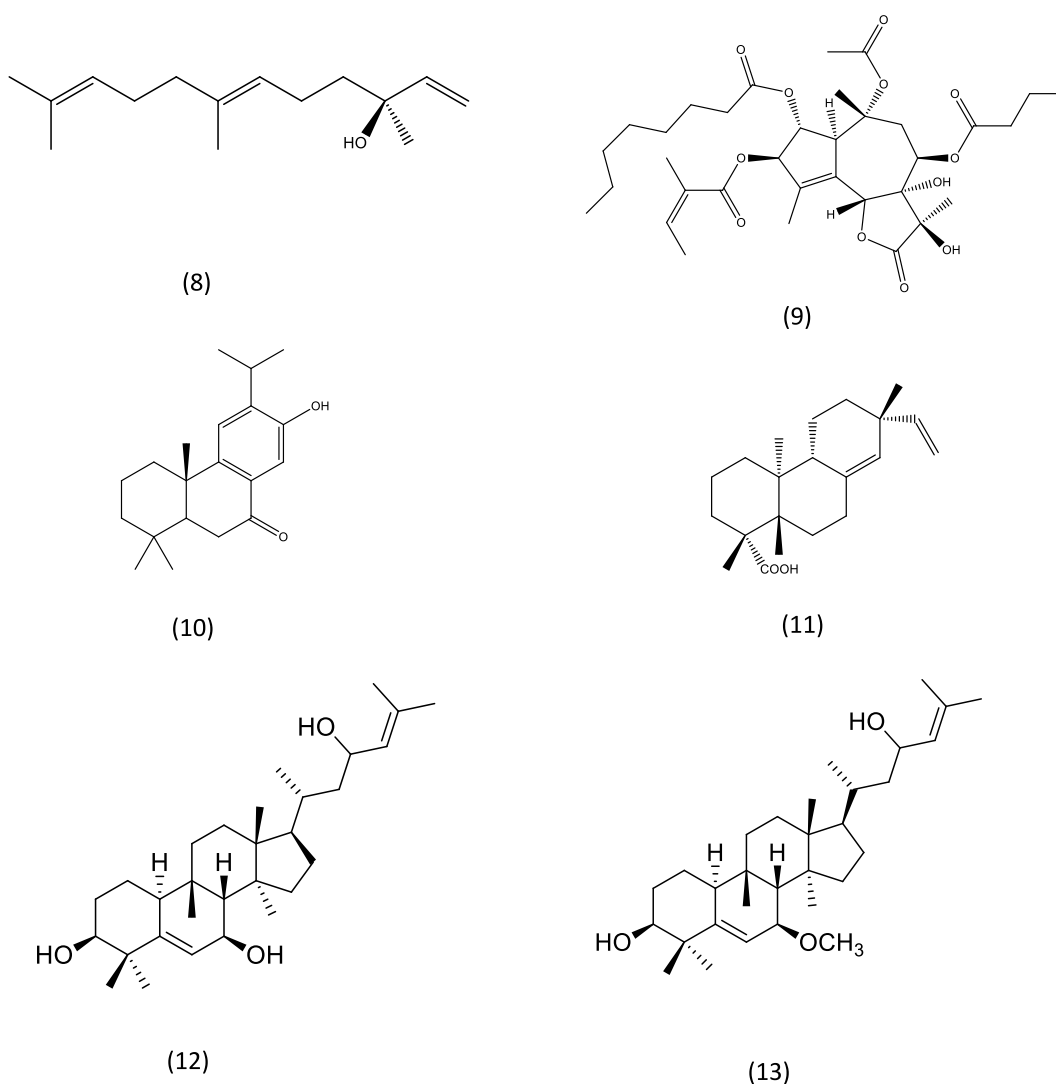
Por sua vez, o alcaloide imidazólico epiisopiloturina (8), isolado das folhas de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae), mostrou-se ativo em ensaio *in vitro* frente às formas jovens do parasito, os esquistossômulos, ao passo que o PZQ possui restrita atividade frente a este estágio de vida do *S. mansoni*. Assim como os demais alcaloides

apresentados anteriormente, epiisopiloturina também promoveu consideráveis alterações tegumentares, bem como morte dos parasitos adultos (VERAS et al., 2012).

### 1.2.3 Terpenos

Os terpenos constituem-se como uma das maiores classes de metabólitos secundários de produtos naturais com diversificadas estruturas químicas. De acordo com sua estrutura típica, podem ser classificados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. A estes compostos têm sido atribuído uma gama de propriedades biológicas tais como: antitumoral, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, dentre outros. Na figura 5, estão representados terpenos que demonstraram atividade frente ao *S. mansoni* (GUIMARÃES et al., 2014; PATTANAİK et al., 2015)

**Figura 5:** Terpenos com atividade esquistossomicida.



Nerolidol (8), um sesquiterpeno alifático presente em óleos essenciais de diversas plantas foi avaliado *in vitro* frente a vermes adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni* sendo capaz de promover a redução da atividade motora e morte de todos os casais nas concentrações 31.2 e 62.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Ainda, verificou-se a redução da atividade motora, na concentração de 250 e 125  $\mu\text{M}$ , além de ocasionar a morte dos mesmos, respectivamente, no segundo e primeiro dia de incubação. Já o sesquiterpeno tapsigargina (9), isolado de diversas espécies do gênero *Thapsia*, demonstrou-se efetivo em inibir a enzima ATP-difosfohidrolase (ATPDase) presente no tegumento do *S. mansoni*, alvo de grande importância na busca por novas moléculas com atividade esquistossomicida (DE CASTRO et al., 2013; SILVA et al, 2014).

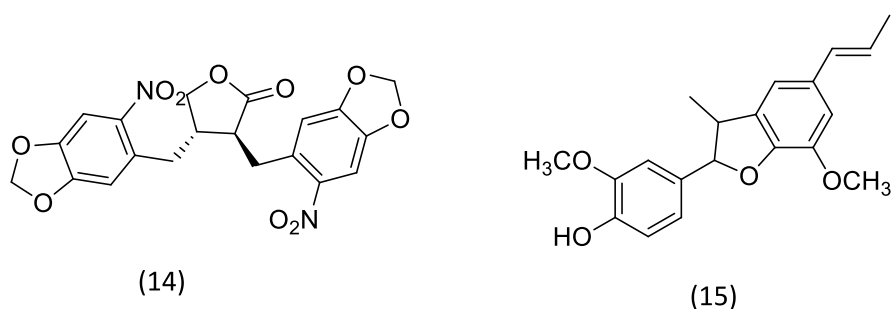
Já em relação aos diterpenos 7-ceto-sempervirol (10) e ácido pimaradienoico (11), foi evidenciada atividade frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. Em ambos os compostos, houve expressiva alteração na superfície do tegumento, bem como redução da oviposição, parâmetros de fundamental importância para a sobrevivência do parasito no seu hospedeiro definitivo (PORTO et al., 2012; EDWARDS et al., 2015).

Isolados das folhas de *Momordica balsamina* (Cucurbitaceae), os triterpenos balsaminol F (12) e karavilagenina C (13), demonstraram significativa atividade esquistossomicida. Além de promoverem a separação dos casais após 24 horas de incubação, todos os parasitos tiveram redução na atividade motora nas concentrações de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de balsaminol F e de 25 a 100  $\mu\text{M}$  de karavilagenin C. A morte dos parasitos adultos também foi verificada após 24 horas de incubação com tais substâncias (RAMALHETE et al., 2012).

#### 1.2.4 Lignanas

As lignanas são compostos que biossinteticamente derivam dos grupos fenilpropanoides. Na natureza, podem se apresentar apenas como um dos enantiômeros ou em misturas destes. Às lignanas, atividades biológicas têm sido atribuídas, a saber: antitumoral, hepatoproteção, inseticida, antifúngica e anti-hipertensiva (PEREIRA et al., 2011; MARCOTULLIO e CURINI, 2014; ZHANG et al., 2014). Na figura 6, estão representadas lignanas que demonstraram atividade esquistossomicida.

**Figura 6:** Lignanas com atividade esquistossomicida.



A lignana (-)-6,6-dinitrohiniquina (14), obtida através síntese parcial da lignana hinoquinina, mostrou-se potencialmente ativa no estudo *in vivo* frente às formas jovens do *S. mansoni*, os esquistossômulos com valores de  $57.4 \pm 2.3$ ,  $32.5 \pm 0.9$  e  $20.4 \pm 1.2$   $\mu\text{M}$  em 24, 48 e 72 h, respectivamente, além de ter reduzido a oviposição dos vermes adultos em 83%. Em adição, a neolignana licarina A (15), composta por uma mistura racêmica de enantiômeros, foi ativa frente vermes adultos de *S. mansoni*, sendo que a maior atividade foi verificada na mistura dos enantiômeros quando comparada com a atividade dos compostos isolados (PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2015).

Logo, os produtos naturais de origem vegetal por meio de extratos brutos, óleos essenciais e compostos isolados, representam uma fonte promissora para a busca de novos protótipos de fármacos para a terapia da esquistossomose. Sendo assim, espécies vegetais que possuam em sua rota biossintética a produção de metabólitos, tais como terpenos e lignanas configuram-se relevantes neste cenário, os quais se inserem as espécies *Solidago migroglossa* (Asteraceae) e *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae) (PORTO et al., 2012; EDWARDS et al., 2015).

### 1.3 Família Asteraceae, o gênero *Solidago* e a espécie *Solidago migroglossa*.

A família Asteraceae apresenta-se como uma das maiores famílias de plantas compilada em, aproximadamente, 1600 gêneros e com 23.000 espécies vegetais já descritas. Dentro da família predominam ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas também podem ser encontrados videiras, cipós e árvores. Além disso, muitas das espécies vegetais pertencentes a esta família são utilizadas com propósitos medicinais pela população (KENNY et al., 2014; BESSADA et al., 2015).

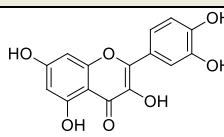
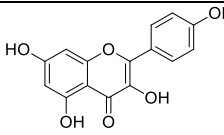
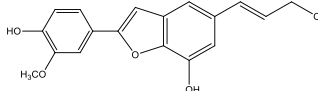
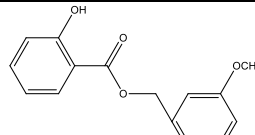
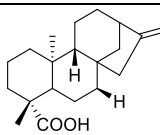
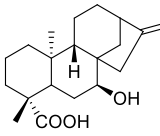
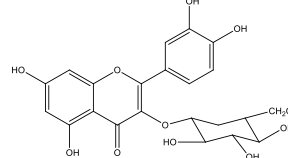
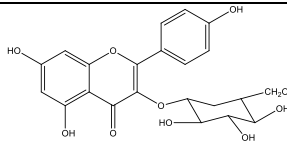
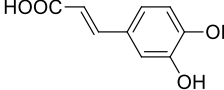
Em relação aos estudos quimiotaxonômicos, estes demonstram que a família Asteraceae tem sua rota biossintética direcionada para a produção de metabólitos secundários pertencentes às classes dos terpenos, poliacetilenos, flavonoides, cumarinas e lignanas, especialmente. (CSUPOR-LÖFFLER et al., 2009; SCOTTI et al., 2012).

Inserida na família Asteraceae, o gênero *Solidago* compreende um amplo grupo de plantas medicinais com aplicações terapêuticas reconhecidas. Entre tais aplicações, pode-se citar o uso popular para o tratamento de inflamações, além de propriedades diurética, espasmolítica, hipotensora e analgésica. (APÁTI et al., 2006; LAURENÇON et al., 2013; RADUSIENE et al., 2015).

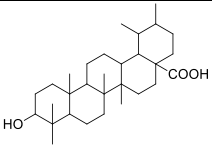
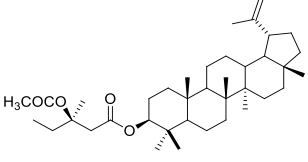
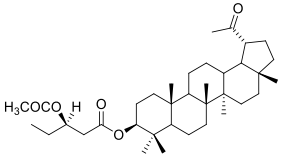
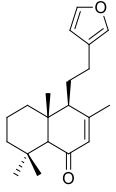
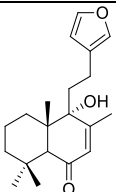
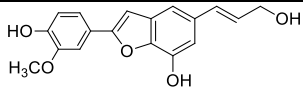
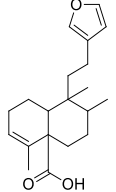
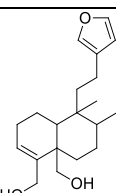
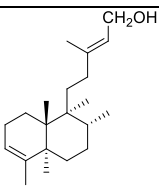
Quimicamente, determinadas classes de metabólitos secundários já foram evidenciadas para o gênero *Solidago*, tais como poliacetilenos, sesquiterpenos, diterpenos, flavonóides e saponinas triterpênicas (STARKS et al., 2010; LAURENÇON et al., 2013).

Nas tabelas que se seguem, tabelas 1 e 2, estão correlatadas os compostos isolados e identificados de diferentes espécies do gênero *Solidago* publicados a partir do ano de 1983 e que se encontram disponibilizados na plataforma de busca Scopus.

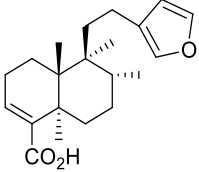
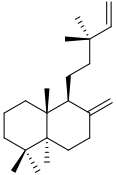
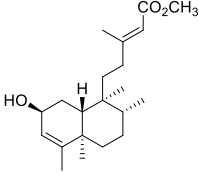
**Tabela 1:** Compostos isolados e identificados das partes aéreas de espécies de *Solidago*.

Espécie	Estrutura	Composto	Referência
<i>S. canadensis</i>		Quercetina	LEITNER et al., 2012
		Kaempferol	
<i>S. virgaurea</i>		2-metóxibenzil-2,6-dimetóxibenzoato	SUNG et al., 1999
		2-metóxibenzil-2-hidroxibenzoato	
<i>S. missouriensis</i>		Ácido caurenoico	LE QUESNE et al., 1985
		Ácido 7β-hidroxicaurenoico	
<i>S. altissima</i>		Isoquercetrina	WU et al., 2007
		Astragaline	
		Ácido cafeico	JIN et al., 2007

**Tabela 2:** Compostos isolados e identificados de caules e raízes de *Solidago*.

Espécie	Estrutura	Composto	Referência
<i>S. canadensis</i>		Ácido ursólico	CHATURVEDULA et al., 2004
		3b-(3R-Acetoxyhexadecanoiloxy)-lup-20(29)-eno	
		3b-(3-etoxyhexadecanoiloxy)-lup-20(29)-eno	
		Deoxisolidagenona	
		Solidagenona	
		Diidroximetilvisanol	
<i>S. serotina</i>		Ácido solidajoico A	LEE et al., 2015
		Kingidiol	
<i>S. rugosa</i>		Kolavenol	TIANSHENG et al., 1995



		Ácido hardwickiico	
		Manool	
<i>S. altissima</i>		metill 2-hidroxicleroda-3,13-dien-15-oato	TORI et al., 1999

Inserida no gênero *Solidago*, a espécie *Solidago microglossa* tem angariado destaque na pesquisa científica orientados pelo seu amplo uso na medicina popular brasileira.

*Solidago microglossa*, conhecida popularmente por arnica-do-campo, arnica-do-Brasil e erva-lanceta (GOULART et al., 2007; da SILVA et al., 2010), encontra-se distribuída na maior parte do território brasileiro, especialmente nas regiões Sul e Sudeste. Ainda, apresenta-se como sinonímia *Solidago chilensis* (LORENZI; MATOS, 2008).

**Figura 7:** Foto da espécie *S. microglossa*. **Fonte:** Autora.



A espécie *S. microglossa* (Figura 7) possui até 1,2 m de altura, é perene e pode

reproduzir-se por sementes e, principalmente, pelos rizomas. Suas folhas apresentam-se sob a forma de lança e as flores são amarelas. Esta espécie apresenta crescimento vigoroso e persistente, ocorrendo espontaneamente em diversos locais como terrenos, beira de estrada e pastagens sendo, por este motivo, considerada como planta daninha (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Cabe destacar o uso antigo de *S. microglossa* como planta medicinal. Descrita na primeira Farmacopeia Brasileira, 1ª edição de 1929, encontra-se, hoje, inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, RENISUS de 2008. Nesta relação, está elencado espécies vegetais previamente selecionadas pelo seu uso popular tradicional e que possuem potencial para o prosseguimento de pesquisas científicas.

Sobre o uso popular da arnica-do-campo, este se estende às propriedades anti-inflamatórias sendo utilizada, também, para o tratamento de pneumonia, hipertensão, como relaxante muscular e diurética (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005; BIESKI et al., 2012).

Com o intuito de investigar as propriedades anti-inflamatórias atribuídas à espécie pelo uso popular, TAMURA e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato hidroalcolico das partes aéreas de *S. chilensis* foi capaz de diminuir o processo inflamatório em modelo de edema de orelha em ratos Wistar.

Em continuidade, LIZ e colaboradores (2008) verificaram que o extrato aquoso e frações provenientes das raízes da espécie inibiram mediadores pró-inflamatórios, bem como infiltração de leucócitos para o sítio da inflamação. Além disso, frações butanólicas e aquosas das raízes da arnica foram efetivas na inibição dos parâmetros inflamatórios no modelo de pleurisia induzida (GOULART et al., 2007).

Além disso, a propriedade de analgesia das folhas da espécie foi avaliada em tendinite de pulso e mão, bem como tratamento de lombalgia. Nestes estudos, os pesquisadores verificaram que o extrato fluido glicólico foi efetivo tanto no tratamento da tendinite quanto na lombalgia quando comparados ao grupo placebo em que o extrato glicólico das folhas de *S. chilensis* foi substituído por propilenoglicol (da SILVA et al., 2010; da SILVA et al., 2015).

Substâncias fenólicas, tais como flavonóides, têm sido amplamente estudadas pela comunidade científica e tais estudos são norteados, principalmente, pela grande capacidade antioxidante que estes compostos apresentam (ALMEIDA et al., 2016;

PANAT et al., 2016). Mediante o exposto, SABIR e colaboradores (2012) avaliaram o potencial antioxidante das folhas de *S. microglossa*, assim como a atividade hepatoprotetora pela indução da lesão por paracetamol. Neste estudo, verificou-se que o extrato etanólico das folhas, das quais foram isoladas rutina, quercetina e ácido gálico, possui alta capacidade de reduzir a peroxidação lipídica, além de reduzir os níveis de TGO e TGP após administração do extrato em animais pré-tratados com paracetamol.

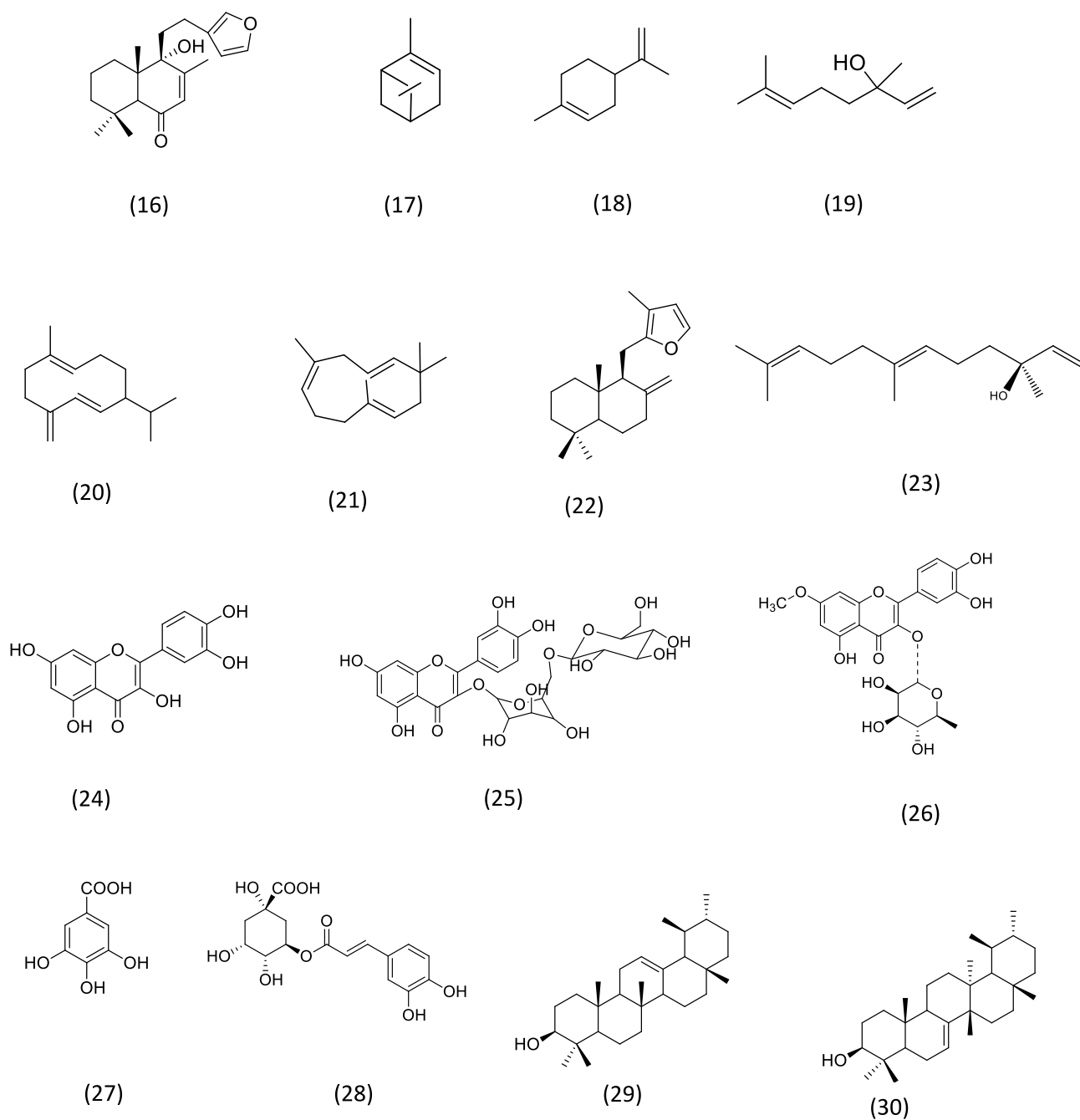
O efeito hipolipidêmico das partes aéreas de *S. chilensis* e do flavonóide isolado, quercetina, foi demonstrado experimentalmente por ROMAN e colaboradores (2015). Tanto extrato hidroalcoólico quanto a quercetina reduziram os valores dos triglicérides nos ratos de forma semelhante ao controle positivo, sinvastatina, apontando para a possibilidade de prevenção de hipercolesterolemia e proteção contra aterosclerose. Além disso, MELO e colaboradores (2011) observaram que extrato hidroalcoólico das folhas de *S. chilensis* possui efeitos sobre a homeostase da glicose em camundongos obesos contribuindo para a prevenção da resistência à insulina associada à obesidade.

Orientados pelo uso popular de *S. chilensis* para tratamento de desordens gástricas, BUCCIARELI e colaboradores (2010) utilizaram o modelo de lesão gástrica em camundongos, induzida por etanol, para constatar que as inflorescências foram efetivas em reduzir as lesões nos animais. De forma semelhante, as folhas também são detentoras das propriedades gastroprotetoras como verificado no estudo realizado por DE BARROS e colaboradores (2016). Ainda, neste último estudo, demonstraram que dois flavonoides isolados, quercetrina e afzelina, possuem a mesma atividade evidenciada pelo extrato das folhas.

Em continuidade à atividade gastroprotetora, a solidagenona, diterpeno labdano isolado das raízes de *S. chilensis*, tem sido amplamente avaliada. Os resultados apresentados na literatura apontam a proteção da mucosa gástrica após indução de lesões por diversos agentes, tais como etanol, Aspirina<sup>®</sup>. Ainda, derivados semi-sintéticos da solidagenona também apresentaram a mesma atividade, sendo esta atribuída à presença do anel furano no esqueleto da molécula, uma vez que os derivados que não possuíam este anel não apresentaram atividade (RODRIGUEZ et al., 2002; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005b).

São poucos os estudos que descrevem a composição química desta espécie. Em relação aos constituintes presentes nas raízes de *S. microglossa*, a literatura descreve a presença de diterpeno solidagenona (16), porém são poucos os estudos fitoquímicos relacionados a esta parte da planta. Das folhas, além do estudo da composição do óleo essencial com o isolamento de monoterpenos como o  $\alpha$ - pineno (17), limoneno (18) e linalol (19); sesquiterpenos como o germacreno D (20) e  $\alpha$ -humuleno (21) e diterpenos como pumiloxido (22) e fitol (23). Das partes aéreas, flavonoides e outros compostos fenólicos já foram isolados e identificados, a saber: quercetina (24), rutina (25) e quercetrina (26) (Figura 8). Ainda, os ácidos gálico (27) e clorogênico (28) também foram metabólitos isolados das partes aéreas do vegetal. Em seu trabalho, GASTALDO (2013) isolou e identificou a mistura de  $\alpha$ -amirina (29) e bauerenol (30) nas folhas da espécie. (GOULART et al., 2007; LIZ et al., 2008; SABIR et al., 2012; GASTALDO, 2013; CATARINO et al., 2015).

**Figura 8:** Substâncias isoladas e identificadas de *S. microglossa*.



Não há estudos a respeito da atividade esquistossomicida tanto do extrato bruto quanto dos constituintes das raízes de *S. microglossa* confirmando, assim, o caráter inédito deste estudo.

Outra espécie vegetal, descrita na Farmacopeia 1ª edição (1929) e também empregada na medicina popular brasileira para o tratamento de várias enfermidades é a espécie *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae). Por meio da produção de seus metabólitos secundários, especialmente terpenos e lignanas, torna-se promissora no estudo da atividade esquistossomicida.

#### **1.4 Família Aristolochiaceae, o gênero *Aristolochia* e a espécie *Aristolochia cymbifera***

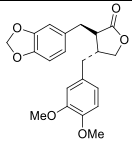
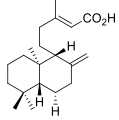
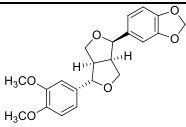
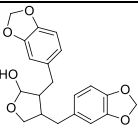
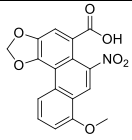
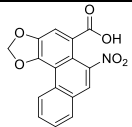
A família Aristolochiaceae constitui-se como uma grande família de espécies vegetais, compreendendo cerca de 450 a 600 espécies dentre as quais, o gênero *Aristolochia* é a maior detentora de espécies (PACHECO et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2010; HOLZBACH et al., 2010).

Neste gênero, compreendido por cerca de 500 espécies vegetais distribuídas em diversas regiões do planeta, verifica-se a presença característica de plantas herbáceas, arbustos e subarbustos. Cultivadas como espécies ornamentais, tais plantas têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional contra distúrbios estomacais, abortifacientes, expectorantes, sedativa, tratamento de feridas e doenças de pele, além para o tratamento de vermes intestinais (MESSIANO et al., 2008; PACHECO et al., 2009; DHOUIOUI et al., 2016).

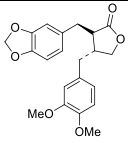
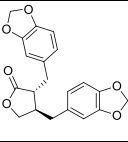
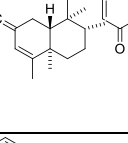
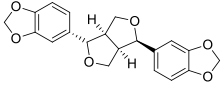
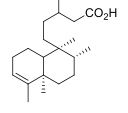
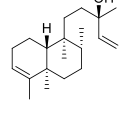
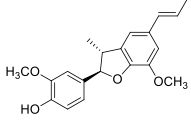
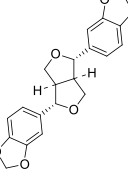
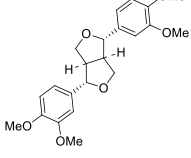
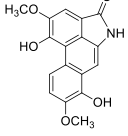
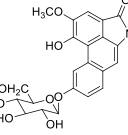
Estudos fitoquímicos de plantas pertencentes à família Aristolochiaceae denotam que a rota biossintética de metabólitos secundários esteja direcionada para a biossíntese de lignanas e terpenos, em particular, porém outras classes também podem ser encontradas, tais como alcaloides, flavonoides e cumarinas (LOPES et al., 1987; SHI et al., 2004; PACHECO et al., 2009).

Nas tabelas 3 e 4, encontram-se alguns destes metabólitos secundários isolados e identificados de espécies do gênero *Aristolochia* das partes aéreas e caules, respectivamente, publicados na literatura científica no período de 1988 a 2016 disponibilizados na plataforma de busca Scopus.

**Tabela 3:** Compostos isolados e identificados das partes aéreas de espécies de *Aristolochia*.

Espécie	Estrutura	Composto	Referência
<i>Aristolochia malmeana</i>		Kusonokinina	MESSIANO et al., 2008
		Ácido copálico	
		Fargesina	
		Cubebina	
<i>A. indica</i>		Ácido aristolóquico I	DESAI et al., 2014
		Ácido aristolóquico II	

**Tabela 4:** Compostos isolados e identificados dos caules e raízes de espécies de *Aristolochia*.

Espécie	Estrutura	Composto	Referência
<i>Aristolochia malmearia</i>		Kusonokinina	MESSIANO et al., 2008
		Hinoquinina	
		Ácido kolavênico	
<i>Aristolochia galeata</i>		Asarinina	LOPES e BOLZANI, 1988
		Ácido populifólico	
		Kolavenol	
<i>Aristolochia pubescens</i>		Licarina A	NASCIMENTO e LOPES, 1999
		Sesamina	
		Eudesmina	
<i>A. elegans</i>		Aristolactama E	SHI et al., 2004
		Aristolactama F	



Das espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia*, a espécie *Aristolochia cymbifera* (Figura 9) conhecida na medicina popular brasileira como cipó-mil-homens e jarrinha, e uma planta trepadeira de uso popular entre a população. Ainda, encontra-se listada na Farmacopeia Brasileira 1ª edição de 1929 (BRANDÃO et al., 2008; SARTORELLI et al., 2010).

**Figura 9:** Foto da espécie *A. cymbifera*. **Fonte:** Autora



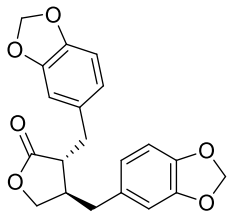
Tanto os potenciais fitoquímico quanto biológico dessa espécie vegetal ainda são pouco explorados cientificamente com escassos trabalhos científicos apresentados na literatura. No trabalho realizado por ALVIANO e colaboradores (2008), demonstrou-se que o extrato hidroalcoólico das raízes de *A. cymbifera* possui atividade antimicrobiana frente a bactérias bucais *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*.

A fim de avaliar a atividade tripanocida dos metabólitos de *A. cymbifera*, SARTORELLI e colaboradores (2010) realizaram o fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas culminando, assim, no isolamento das lignanas epieudesmina, kusunokinina, sesamina, hinoquinina, fargesina, além do diterpeno ácido copálico. Quanto ao ensaio antiparasitário, verificou-se que o ácido copálico e a kusunokinina possuem expressiva atividade frente às formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* com  $IC_{50}$  de 39,57  $\mu$ M e 51,51  $\mu$ M, respectivamente.

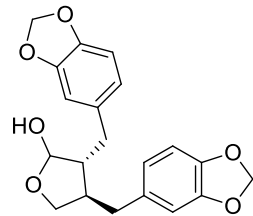
Em relação aos metabólitos secundários isolados desta espécie vegetal, evidencia-se a rota biossintética para a produção de lignanas e terpenos, em especial, como demonstra a literatura através das publicações científicas. Neste contexto, as lignanas já

isoladas e identificadas da espécie são: cubebina (31), hinoquinina (32), fargesina (33), epieudesmina (34), sesamina (35), kusunokinina (36); diterpenos: ácido populifólico (37), ácido *epi*-populifólico (38), ácido *oxo*-populifólico (39), ácido copálico (40) e kolavenol (41) e compostos nitrogenados: alantoína (42), magnoflorina (43) e ácido aristolóquico (44) (Figura 10) (LOPES & BOLZANI, 1988; WU et al., 2005 SARTORELLI et al., 2010).

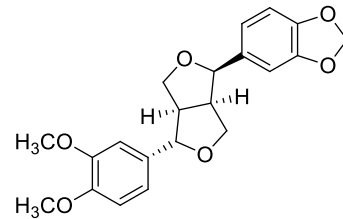
**Figura 10:** Substâncias isoladas e identificadas de *A. cymbifera*.



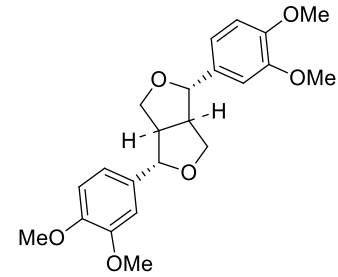
(31)



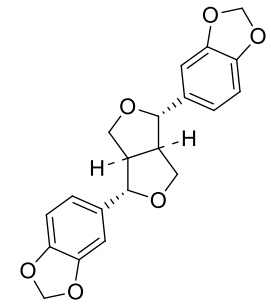
(32)



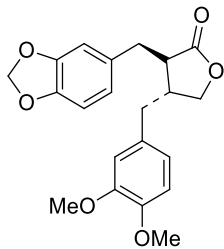
(33)



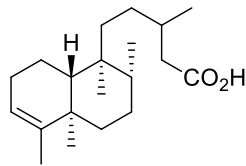
(34)



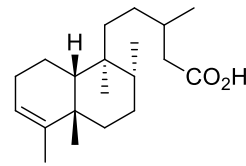
(35)



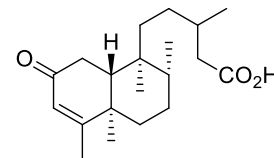
(36)



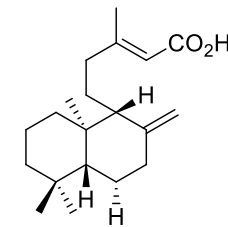
(37)



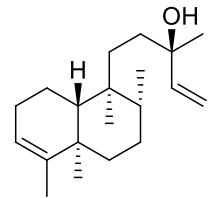
(38)



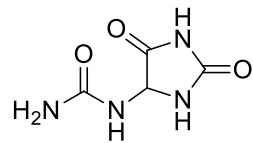
(39)



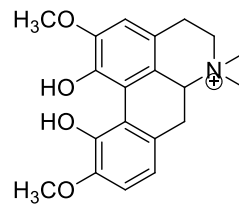
(40)



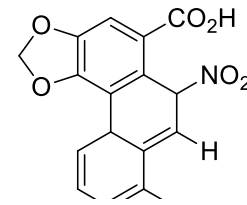
(41)



(42)



(43)



(44)

Diante do exposto, pode-se afirmar que as plantas representam uma promissora fonte para a descoberta de protótipos de fármacos para o tratamento de diversas doenças. Desse modo, as espécies vegetais *S. microglossa* e *A. cymbifera* conhecidas pelo uso popular na medicina popular brasileira, em especial como anti-helmíntica, através da produção de terpenos e lignanas tornam-se grandes potenciais para o estudo da atividade esquistossomicida. Vale destacar que não há estudos relacionando a atividade frente a vermes adultos de *S. mansoni*, confirmando o caráter inédito deste trabalho.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e compostos isolados das raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera*.

Para estes propósitos, os objetivos específicos do trabalho são:

- Produzir o extrato bruto das raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera*;
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos
- Isolar, purificar e identificar compostos presentes nos extratos brutos produzidos;
- Avaliar a atividade esquistossomicida dos compostos isolados das raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Instrumentação e materiais cromatográficos.

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos no Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) e CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF):

- Rotaevaporador RII *Buchi*;
- Bomba V-700 *Buchi*;
- Câmara U.V. SL-204 ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm);
- Estufa com circulação de ar (Solab SL 102);
- Balança AY220 Marte;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Waters®
- Cromatógrafo Gasoso Acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM) Shimadzu®

Para a realização dos processos cromatográficos, solventes com diferentes graus de pureza foram utilizados:

- Para a extração do material vegetal e demais sistemas cromatográficos utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec.
- Para a realização do processo em CLAE e CG-EM utilizaram-se solventes ultrafiltrados, grau HPLC, das marcas Alphatec e JTBaker.
- Para a obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias isoladas utilizou-se clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories).

Em relação aos tipos de fases estacionárias empregadas durante os processos cromatográficos, estas foram selecionadas de acordo com a separação pretendida:

- Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 GF254 (*Merck*). A revelação das mesmas foi obtida através de irradiação no UV (254 e 366 nm), bem como de reveladores químicos, solução de anisaldeído sulfúrico ou vanilina sulfúrica.
- Para a realização de cromatografia líquida à vácuo (CLV) utilizaram-se como

adsorventes sílica gel 60H (*Merck*) e sílica gel 60 (*Merck*), na proporção de 1:1 (m/m), utilizando-se coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, possuindo placa sinterizada.

-Para cromatografia em coluna clássica (CC) utilizou-se como adsorvente sílica gel (partículas de 40-63 µm, Aldrich) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

- Para cromatografia em coluna *flash* (CF) utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 (partículas de 15-40 µm, Merck) empregando-se coluna de vidro com 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura.

- Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou-se coluna analítica de fase reversa (Sun FireTM C<sub>18</sub>; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de coluna guarda (Sun FireTM C<sub>18</sub>; 4,6 x 20 mm; 5 µm).

Para a realização do ensaio esquistossomicida, utilizaram-se os seguintes equipamentos e reagentes:

- Cabine de segurança biológica;
- Estufa incubadora com CO<sub>2</sub> Thermo Scientific;
- Vortex QL-901;
- Soro fetal bovino Vitrocell;
- Penicilina/Estreptomicina Vitrocell;
- Meio RPMI 1640 Vitrocell;

### **3.2 Coleta e identificação do material vegetal**

As raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As exsiccatas das espécies vegetais encontram-se depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF, sob o número de tombo 64488 e 50054, respectivamente.

### **3.3 Obtenção dos extratos brutos das raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera***

Após a coleta, as raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera* foram secas e estabilizadas em estufa de ar quente e circulante a 40°C e, posteriormente, submetidas à moagem em moinho de facas para pulverização das mesmas. Adiante, os pós obtidos

foram submetidos à extração por maceração utilizando etanol:água (8:2 v/v) como solvente extrator.

As soluções hidroalcoólicas, filtradas, foram concentradas com auxílio de rotaevaporador e os extratos concentrados foram transferidos para frascos, previamente pesados, para a completa evaporação do solvente orgânico. Após tais procedimentos, foram obtidos 15 g do extrato hidroalcoólico das raízes de *S. microglossa* (Sm-R) e 40 g do extrato hidroalcoólico das raízes de *A. cymbifera* (Ac).

### **3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)**

As análises dos perfis cromatográficos dos extratos brutos e substâncias isoladas de Sm-R e Ac foram realizadas em cromatógrafo analítico da Waters®. As análises foram realizadas usando coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5µm). Como eluentes da fase móvel utilizou-se uma fase binária composta de A: água e 0,1% de ácido fosfórico e B: metanol com gradiente de polaridade da fase móvel de 40-100% de B em 40 minutos. Os extratos, assim como as substâncias, foram solubilizados em metanol na concentração de 2mg/mL, filtrados em filtro de membrana de celulose de 0,45 µm e uma alíquota de 30 µL foi injetada no cromatógrafo com vazão de 1 mL/min. A detecção do DAD realizada em varredura de 190 a 400 nm.

### **3.5 Análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.**

Com o intuito de avaliar o perfil cromatográfico de algumas das frações provenientes do fracionamento das raízes de Sm-R, empregou-se a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para tal finalidade. Para isto, foi utilizado o aparelho Shimadzu CG-MS QP2010 com autoinjeter AOC-20i acoplado a espectrômetro de massas CG-MS QP2010 Plus. Foi utilizada a coluna capilar Rtx®-5MS (5% fenil, 95% metilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25µm), empregando-se hélio como gás de arraste em fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 150°C obedecendo-se a seguinte programação de temperatura: 150°C por 2 minutos; rampa de aquecimento de 12,5°C/min até 200°C com patamar mantido



por 2 minutos; rampa de 20°C/min até 280°C com patamar mantido até completados 30 minutos de corrida. A razão de *split* foi de 1: 20 e o volume injetado na coluna capilar foi de 1 µL. Já a temperatura da fonte de ionização por impacto eletrônico (70eV) foi de 280°C.

### 3.6 Fracionamento do extrato Sm-R

Com o intuito de realizar a separação inicial dos constituintes químicos presentes no extrato bruto, 15 g do extrato Sm-R foram submetidos a CLV. Para isso, foi realizada uma pastilha com o extrato e o mesmo foi aplicado em uma coluna de vidro de 10 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura, empacotada com 300 g de sílica gel, correspondendo a 10 cm de altura de fase estacionária. A fase móvel utilizada nesse procedimento iniciou-se com hexano (Hex) seguido pela mistura binária de hexano:acetato de etila (Hex:AcOEt) em gradiente de polaridade crescente e finalizada com metanol (MeOH) como apresentado na tabela 7. Durante a realização deste método cromatográfico, 9 frações com volume de 2000 mL foram coletadas e numeradas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Frações obtidas por CLV do extrato Sm-R.

Fase Móvel (proporções v/v)	Frações	Massas (g)
Hex:AcOEt (99:1)	Sm-R I	0,217
Hex:AcOEt (95:5)	Sm-R II	1,670
Hex:AcOEt (90:10)	Sm-R III	1,045
Hex:AcOEt (85:15)	Sm-R IV	1,217
Hex:AcOEt (75:25)	Sm-R V	1,250
Hex:AcOEt (50:50)	Sm-R VI	2,167
Hex:AcOEt (25:75)	Sm-R VII	0,750
AcOEt (100)	Sm-R VIII	1,510
MeOH (100)	Sm-R IX	3,998

Para a continuidade dos processos cromatográficos, a fração selecionada foi a Sm-R IV que, de acordo com as análises em CCD, apresentava pouca complexidade quanto aos constituintes, além de uma mancha majoritária de fácil separação. Ainda, verificou-se a presença de uma mancha majoritária na fração Sm-R III e por isso foi submetida à CG-EM e de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

### 3.6.1 Fração Sm-R IV

A fração Sm-R IV (1.2 g) foi submetida a uma coluna clássica (CC) empacotada com sílica gel resultando em uma altura de empacotamento de aproximadamente 18 cm. A fase móvel utilizada foi Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade. Ao final, foram recolhidas 10 subfrações que, após análise em CCD, foram reagrupadas em 6 frações (Tabela 6).

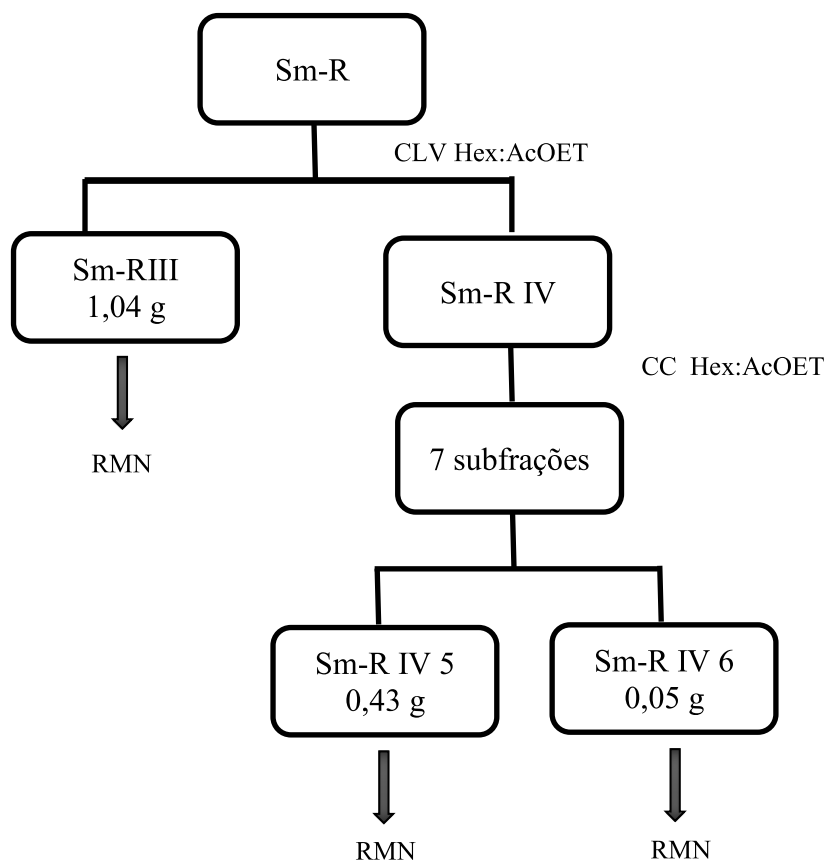
**Tabela 6:** Subfrações obtidas por CC da fração Sm-R IV.

<b>Fase Móvel (proporções v/v)</b>	<b>Frações</b>	<b>Massas (g)</b>
Hex:AcOEt (95:5)	Sm-R IV 1	0.11
Hex:AcOEt (93:7)	Sm-R IV 2	0.02
Hex:AcOEt (85:15)	Sm-R IV 3	0.01
Hex:AcOEt (70:30)	Sm-R IV 4	0.20
Hex:AcOEt (50:50)	Sm-R IV 5	0.43
Hex:AcOEt (30:70)	Sm-R IV 6	0.05

Em seguida, as frações foram analisadas em CCD e verificou-se na subfração Sm-R IV 6, dentro das condições de análises empregadas, a presença de uma única mancha. Logo, esta substância foi submetida à CG-EM e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

O esquema simplificado dos processos cromatográficos pode ser visualizado na figura 11.

**Figura 11:** Fluxograma simplificado do isolamento das substâncias de Sm-R.



### 3.7 Fracionamento do extrato Ac

Objetivando-se o fracionamento inicial das substâncias presentes no extrato bruto, 40 g de Ac foram submetidos a CLV. Para isto, a coluna foi empacotada com sílica gel com altura final de empacotamento de aproximadamente 10 cm. Para a eluição, inicialmente foi utilizado Hex seguido pela mistura Hex:AcOEt e, por fim, AcOEt:MeOH, em grau de polaridade crescente. Ao final deste processo, 13 frações de 1000 mL foram coletadas e, posteriormente, reunidas em 8 frações (Tabela 7) de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico visualizada em CCD.

**Tabela 7:** Frações obtidas por CLV do extrato Ac.

Fase Móvel (proporções v/v)	Frações	Massas (g)
Hex	Ac 1	2,55
Hex:AcOEt (90:10)	Ac 2	10,86
Hex:AcOEt (80:20)	Ac 3	4,67
Hex:AcOEt (70:30)	Ac 4	0,85
Hex:AcOEt (70:30)	Ac 5	3,46
Hex:AcOEt (50:50)	Ac 6	1,38
Hex:AcOEt (30:70)	Ac 7	1,64
AcOEt (100)	Ac 8	2,71
AcOEt:MeOH (50:50)		

Para prosseguimento dos processos cromatográficos, as frações foram escolhidas mediante análise em CCD, bem como quantidade obtida e complexidade da amostra quanto aos constituintes químicos.

### 3.7.1 Fração Ac 2

A fração Ac 2 (10 g) foi submetida à CLV empacotada com sílica gel resultando em uma altura de sílica de aproximadamente 6 cm. Como fase móvel foi utilizada Hex e Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade. Ao final, 9 subfrações de 1000 mL foram recolhidas e, após análise em CCD, reunidas em 6 subfrações (Tabela 8).

**Tabela 8:** Subfrações obtidas por CLV da fração Ac 2.

Fase Móvel (proporções v/v)	Subfrações	Massas (g)
Hex (100)	Ac 2-a	0,031
Hex:AcOEt (98:2)		
Hex:AcOEt (95:5)	Ac 2-b	2,15
Hex:AcOEt (93:7)	Ac 2-c	3,63
Hex:AcOEt (90:10)	Ac 2-d	1,69
Hex:AcOEt (85:15)	Ac 2-e	1,62
Hex:AcOEt (70:30)	Ac 2-f	0,31
AcOEt (100)		

Em seguida a análise das frações em CCD, verificou-se a presença, nas condições utilizadas, de uma única mancha na subfração Ac 2-d. Sendo assim, tal substância foi submetida à análise em CLAE e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

### 3.7.2 Fração Ac 5

A fração Ac 5 (3,46 g) foi submetida à cromatografia em coluna flash (CCF) empacotada com 180 g de sílica gel, sendo a altura final da sílica de aproximadamente 15 cm. A fase móvel utilizada foi a mistura binária de diclorometano (DCM) e AcOEt em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas 106 subfrações de 25 mL agrupadas posteriormente em 5 subfrações após análise em CCD (Tabela 9).

**Tabela 9:** Subfrações obtidas por CCF da fração Ac 5.

Fase Móvel (proporções v/v)	Subfrações	Massas (g)
DCM:AcOEt (95:5)	Ac 5-a	0,42
DCM:AcOEt (93:7)	Ac 5-b	0,21
DCM:AcOEt (93:7)	Ac 5-c	0,56
DCM:AcOEt (90:10)	Ac 5-d	0,90
DCM:AcOEt (80:20)	Ac 5-e	1,00

Para o prosseguimento do processo de separação cromatográfico, a subfração Ac 5-c, por apresentar o melhor perfil de separação entre as substâncias em CCD, foi submetida a CCF. Para tanto, a coluna foi empacotada com 27 g de sílica gel com altura de empacotamento de 15 cm, aproximadamente. A fase móvel utilizada foi DCM:AcOEt (97:3). Foram recolhida 21 subfrações de 25 mL, as quais foram agrupadas em 5 subfrações posteriormente a análise em CCD (Tabela 10).

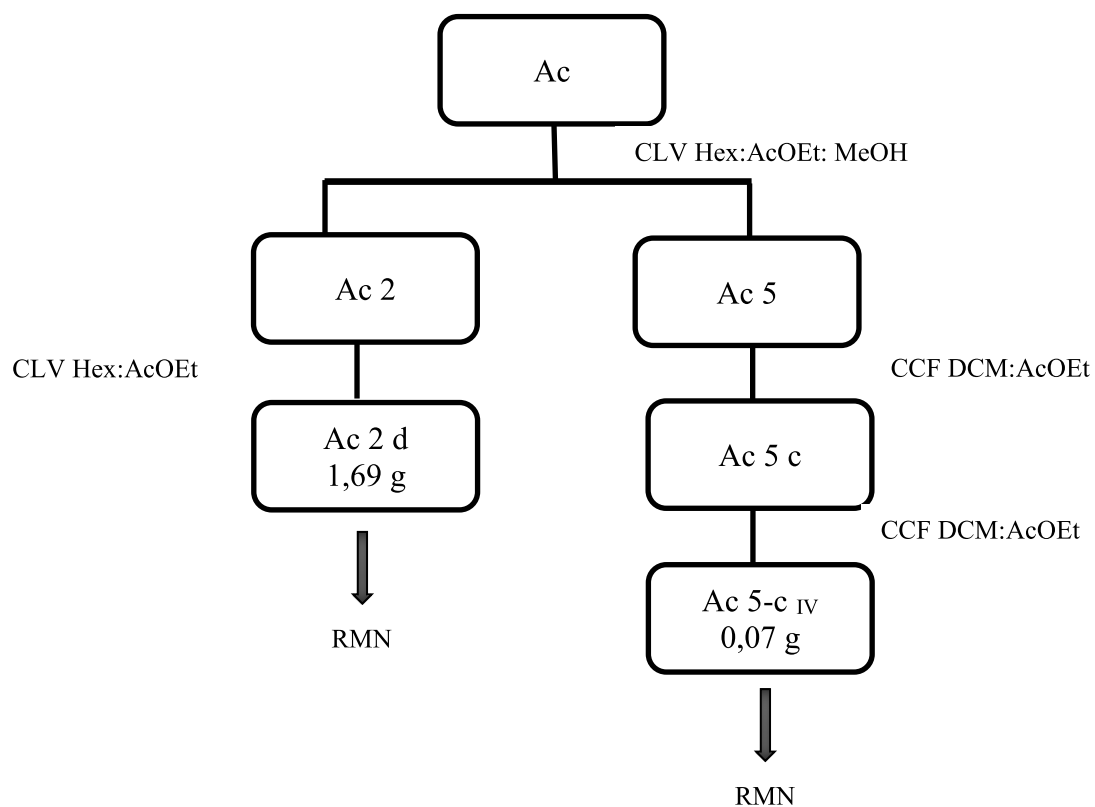
**Tabela 10:** Subfrações obtidas por CCF da subfração Ac 5-c.

Fase Móvel (proporções v/v)	Subfrações	Massas (g)
DCM:AcOEt (97:3)	Ac 5-c I	0,007
DCM:AcOEt (97:3)	Ac 5-c II	0,020
DCM:AcOEt (97:3)	Ac 5-c III	0,014
DCM:AcOEt (97:3)	Ac 5-c IV	0,385
DCM:AcOEt (97:3)	Ac 5-c V	0,071

Em seguida a análise das frações em CCD, observou-se a presença de uma mancha apenas na subfração Ac 5-c IV, dentro das condições cromatográficas utilizadas. Desta forma, esta substância foi submetida à análise em CLAE e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

O esquema simplificado dos processos cromatográficos pode ser visualizado na figura 12.

**Figura 12:** Fluxograma simplificado do isolamento das substâncias de Ac.



### **3.8 Avaliação *in vitro* da atividade esquistossomicida**

A atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das raízes de *S. microglossa* e *A. cymbifera* foram avaliadas frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

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

#### **3.8.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni***

##### **3.8.1.1 Linhagem do *S. mansoni***

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

Todos os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

##### **3.8.1.2 Manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni***

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com PELLEGRINO E KATZ (1968). Os hamsters infectados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada dos ovos infectados do fígado e posterior obtenção dos miracídios. Os fígados foram triturados em liquidificador em solução salina 0,85% (m/v), e a suspensão dos tecidos homogeneizados foi deixada para sedimentação no escuro. O sedimento foi suspenso com água declorada e exposto à luz para obtenção dos miracídios. O número e a viabilidade dos miracídios e cercárias foram determinados com o auxílio de um estereomicroscópio.

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

Cerca de 150 cercárias foram inoculadas nos hamsters por via subcutânea e

após aproximadamente 45 dias, os vermes adultos foram recuperados do sistema porta hepático por perfusão como descrito por SMITHERS & TERRY (1965).

### **3.8.2 Preparo das amostras para o ensaio**

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido 100% (DMSO) e posteriormente, adicionou-se meio “Roswell Memorial Park Institute” (RPMI 1640), esterilizado por filtração para obter concentração 200 µg/mL dos extratos brutos em DMSO 0,5% (v/v). O PZQ 10 µM preparado nas mesmas condições, foi utilizado como controle positivo.

### **3.8.3 Avaliação da citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade dos extratos Sm-R e Ac foi realizada utilizando o método de coloração por cristal violeta (CRUZ et al., 2005) em linhagem de células de mamífero, células Vero ATCC CCL-81.

### **3.8.4 Ensaio esquistossomicida *in vitro***

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

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

Diferentes concentrações das amostras foram diluídas no meio de cultura antes da adição dos parasitos, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. O PZQ (10 µM) foi utilizado como controle positivo e os poços contendo somente meio de cultura, RPMI 1640, e meio com DMSO 0,5% foram usados como controle negativo.

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%



(Thermo Scientific-Revco®) e foram monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon).

Para avaliar a toxicidade dos extratos e substâncias isoladas sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), contração muscular, alterações morfológicas no tegumento e oviposição (MORAES, 2012b).

A redução da atividade motora e as alterações morfológicas foram qualitativamente avaliadas como “leve” ou “significativa”. Para a análise da atividade motora utilizou-se um estereomicroscópio, enquanto que, para as alterações morfológicas, um microscópio invertido, usando técnica de campo claro ou contraste de interferência foi utilizado.

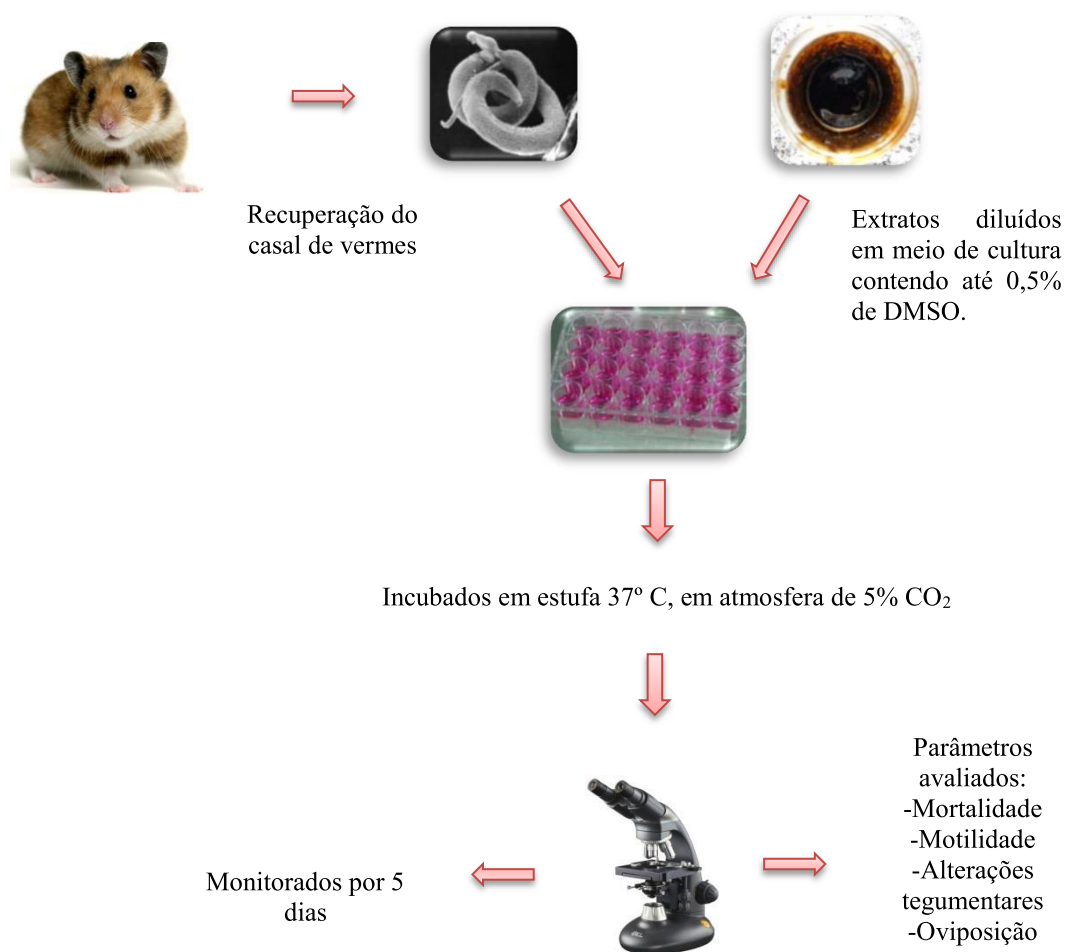
A mortalidade dos vermes foi julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos. No término do período de incubação (5 dias) ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados e analisados em microscopia confocal.

### **3.8.5 Avaliação da oviposição**

Durante 120 h, os vermes adultos acasalados foram incubados em placas de 24 poços contendo os compostos ou extratos em meio RPMI com soro fetal bovino a 10 % a 37° C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. O número de ovos foi contado diariamente com auxílio de um estereomicroscópio.

O esquema simplificado da avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* pode ser visualizado na figura 13.

**Figura 13:** Esquema simplificado do ensaio esquistossomicida *in vitro* dos extratos Sm-R e Ac.



### 3.8.5.1 Análise morfológica do tegumento dos vermes adultos utilizando microscopia confocal

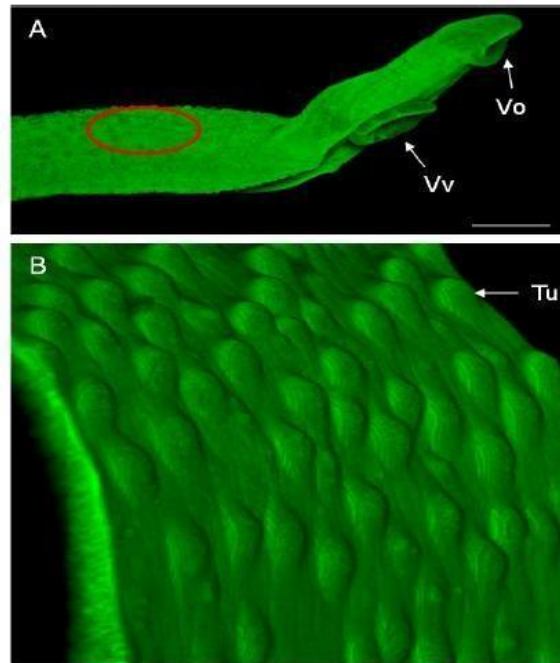
O efeito dos extratos Sm-R e Ac sobre o tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* foi monitorado com microscópio confocal de varredura a laser (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Carl Zeiss Inc, Standort Göttingen, Vertrieb, Deutschland).

Os parasitos foram fixados em solução AFA e monitorados, com captura de imagens, no microscópio usando os filtros de 488 nm (excitação) e 505 nm (emissão). A solução AFA consiste em uma mistura de ácido acético glacial, formaldeído, etanol (95%) e água destilada nas proporções, respectivamente (v/v): [2: 9: 30: 59].

Durante a análise microscópica foram capturadas imagens tridimensionais

usando o software LSM Image Browser (Zeiss) (Figura 14) DE MORAES *et al.*, 2012; DE MORAES *et al.*, 2014.

**Figura 14:** Tegumento intacto do *S. mansoni*.



Imagens tridimensionais da região dorsal de um macho de *Schistosoma mansoni*. Local onde é avaliado o efeito das amostras no tegumento. O parasito, mantido em meio RPMI, é fixado em solução AFA após 120 horas ou ocorrência de morte. A: visão geral da região anterior do helminto mostrando, em vermelho, os tubérculos. Barra = 500  $\mu$ m. B: imagem aumentada da região dorsal que está marcada em vermelho na imagem A. A e B: imagens tridimensionais, obtidas de microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510, META, Zeiss). Em A notar a presença das ventosas oral (Vo) e ventral (Vv). Em B notar os tubérculos (Tu). Fonte: DE MORAES (2012).

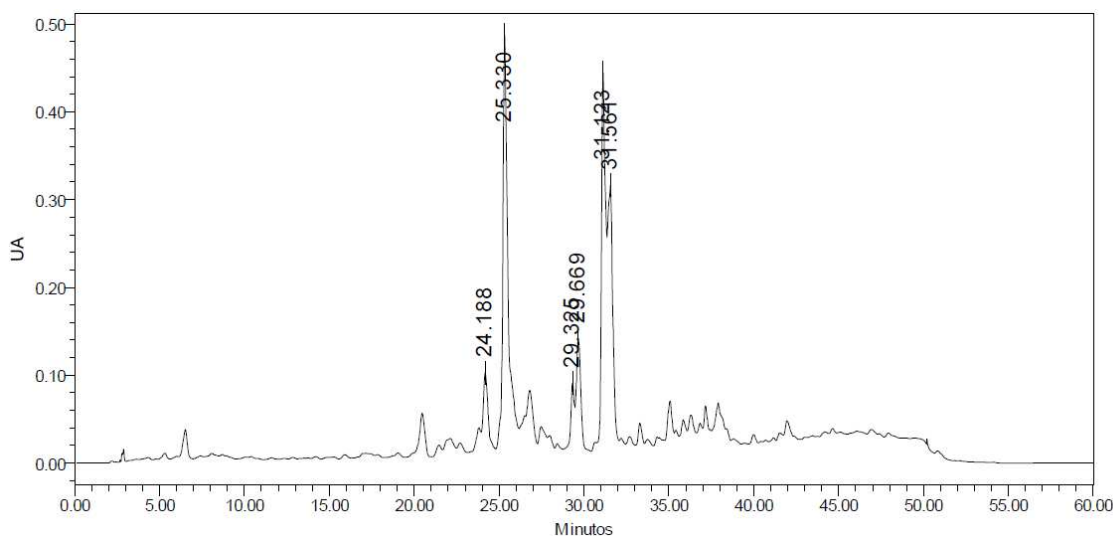
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise em CLAE-DAD do extrato Sm-R

A análise de substâncias presentes em um extrato bruto complexo requer, primeiramente, a separação efetiva destas para, em seguida, permitir a sua detecção. Nos dias atuais, a CLAE tem sido reconhecida como uma das técnicas mais versáteis e eficientes para esta finalidade (WOLFENDER, 2009).

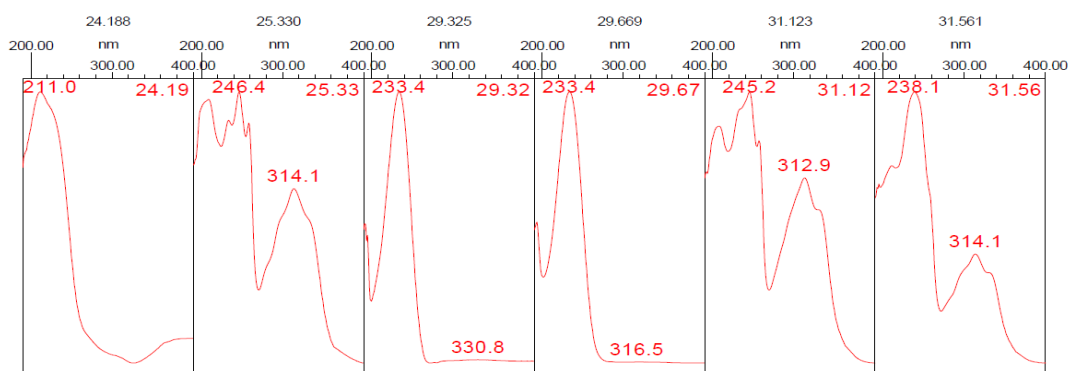
Sendo assim, o extrato bruto Sm-R foi submetido a CLAE-DAD e seu perfil cromatográfico em 240 nm pode ser verificado na figura 15, tal como o espectro de UV (Figura 16) dos picos majoritários e seus respectivos tempos de retenção ( $T_R$ ).

**Figura 15:** Análise cromatográfica e espectro de UV do extrato bruto Sm-R em CLAE-DAD.



Perfil cromatográfico de Sm-R obtido em 240 nm em CLAE-DAD. Fase móvel binária consistiu em gradiente de eluição composta de H<sub>2</sub>O (0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e MeOH em gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Utilizou-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5µm) e fluxo de 1 mL/min.

**Figura 16:** Espectros de UV dos picos majoritários do extrato bruto Sm-R em CLAE-DAD.



Espectro de UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção de 24,188; 25,330; 29,325; 29,669; 31,123; 31,564 minutos.

A análise do perfil cromatográfico de Sm-R demonstra uma composição química complexa do extrato. No cromatograma, observa-se que os picos eluíram-se em tempos de retenção muito próximos sugerindo, assim, uma possível similaridade química entre as substâncias. Ainda, infere-se que as principais substâncias possuem de média a baixa polaridade como é característico dos terpenos biossintetizados pela espécie, visto que o tempo para a eluição está próximo à porcentagem máxima do solvente orgânico (metanol) utilizado para realizar a eluição.

Em adição, a análise dos espectros absorção de ultravioleta dos picos majoritários permite relacioná-los a compostos que apresentam grupos cromóforos, pela presença de bandas médias de absorção com  $\lambda_{\text{máx}}$  acima de 200 nm, o que indica, em geral, a presença de um sistema aromático (WOLFENDER, 2009; PAVIA et al., 2010).

#### 4.1.1 Identificação estrutural das substâncias de Sm-R

##### 4.1.2 Fração Sm-R III

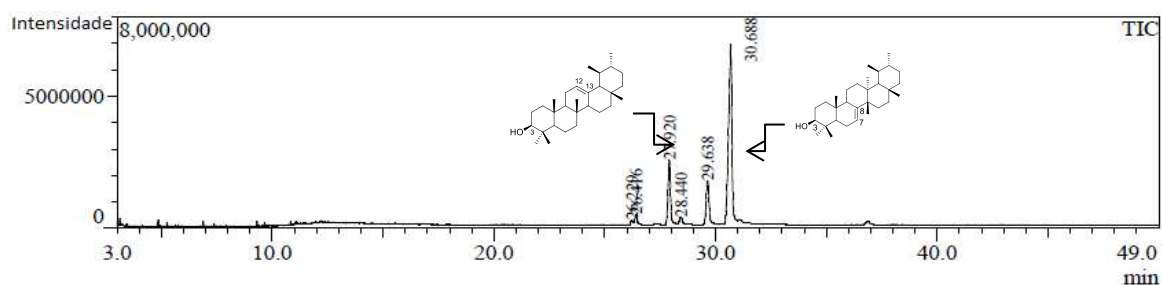
Após a realização da VLC, a fração Sm-R III apresentou-se como um sólido branco e, após análise em CCD, foi verificada a presença de uma mancha majoritária nas condições cromatográficas utilizadas. Posto isto, a fração Sm-R III foi submetida à técnicas de CG-EM e, posteriormente, a RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para elucidação estrutural da substância.

O cromatograma obtido da fração Sm-R III em CG-EM (Figura 17) demonstrou a presença de 1 pico principal, 2 picos minoritários e 3 outros presentes. Os tempos de

retenção próximos podem indicar uma possível similaridade entre os pesos moleculares dos constituintes químicos desta fração.

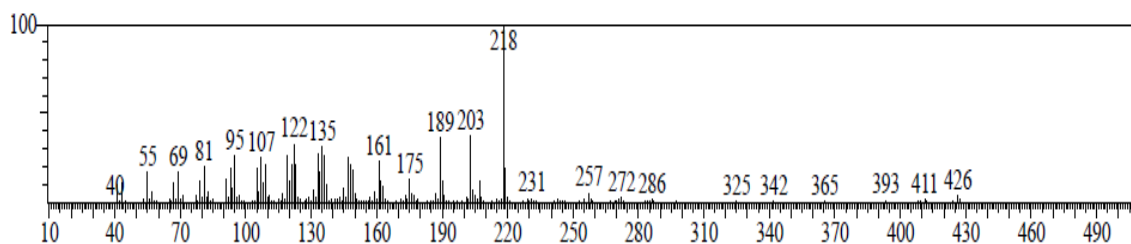
De acordo com o banco de dados NIST, o espectro de massas da figura 18, referente ao pico de  $T_R$  de 27,920 minutos, sugere a presença de uma substância de fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$  com índice de similaridade de 84% para a  $\alpha$ -amirina. Em adição, é possível verificar no espectro a presença do pico base em 218  $m/z$ , além do íon molecular em 426  $m/z$ . Há destaque, também, para os sinais de maiores intensidades em  $m/z$  189 e 203 e que, de acordo com os dados publicados na literatura, apontam o padrão típico de fragmentação para triterpenos do esqueleto de  $\alpha$ -amirina (Figura 19) (FERNANDES et al., 2013; FINGOLO et al., 2013, JEMMALI et al., 2016).

**Figura 17:** Cromatograma da fração Sm-R III em CG-EM.



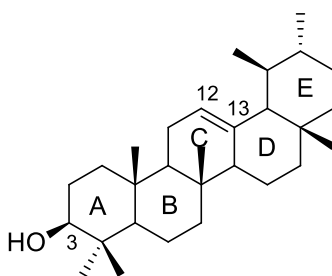
Perfil cromatográfico de Sm-R-III obtido em CG-EM. Utilizou-se hélio como gás de arraste a uma vazão de 34,6 mL/min. A temperatura do injetor foi de 250° C e o volume de injeção de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada 150°C por 2 minutos; rampa de aquecimento de 12,5°C/min até 200°C com patamar mantido por 2 minutos; rampa de 20°C/min até 280°C com patamar mantido até completados 30 minutos de corrida. Coluna capilar Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25µm).

**Figura 18:** Espectro de massas do pico 2 da fração Sm-R III obtido por CG-EM.



Espectro de massas do pico de  $T_R = 27,920$  min. do cromatograma da fração Sm-R III. Espectro de massas por impacto eletrônico 70e V.

**Figura 19:** Estrutura química da  $\alpha$ -amirina.



Em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20), foi possível observar sinais na região entre  $\delta$  0,7 e 1,7 ppm correspondentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Verifica-se, também, um sinal em  $\delta$  3,2 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila diretamente ligada ao carbono C-3 e um conjunto de sinais entre  $\delta$  5,12 e 5,14 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos do composto.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) foi possível observar alguns dos sinais característicos do composto e que permitiram a identificação da  $\alpha$ -amirina (Tabela 11). Além disso, foi possível observar um sinal em  $\delta$  79,4 ppm atribuído ao carbono C-3, o qual possui uma hidroxila ligada na posição  $\beta$  e encontra-se mais desblindado devido ao efeito eletronegativo do oxigênio. Sinais característicos dos carbonos de hibridização  $sp^2$  foram observados em  $\delta$  124,5 ppm (C-12) e 139,5 ppm (C-13) e os demais sinais referentes aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos são observados entre  $\delta$  13,3 a 59,2 ppm (JEFFREYS et al., 2016).

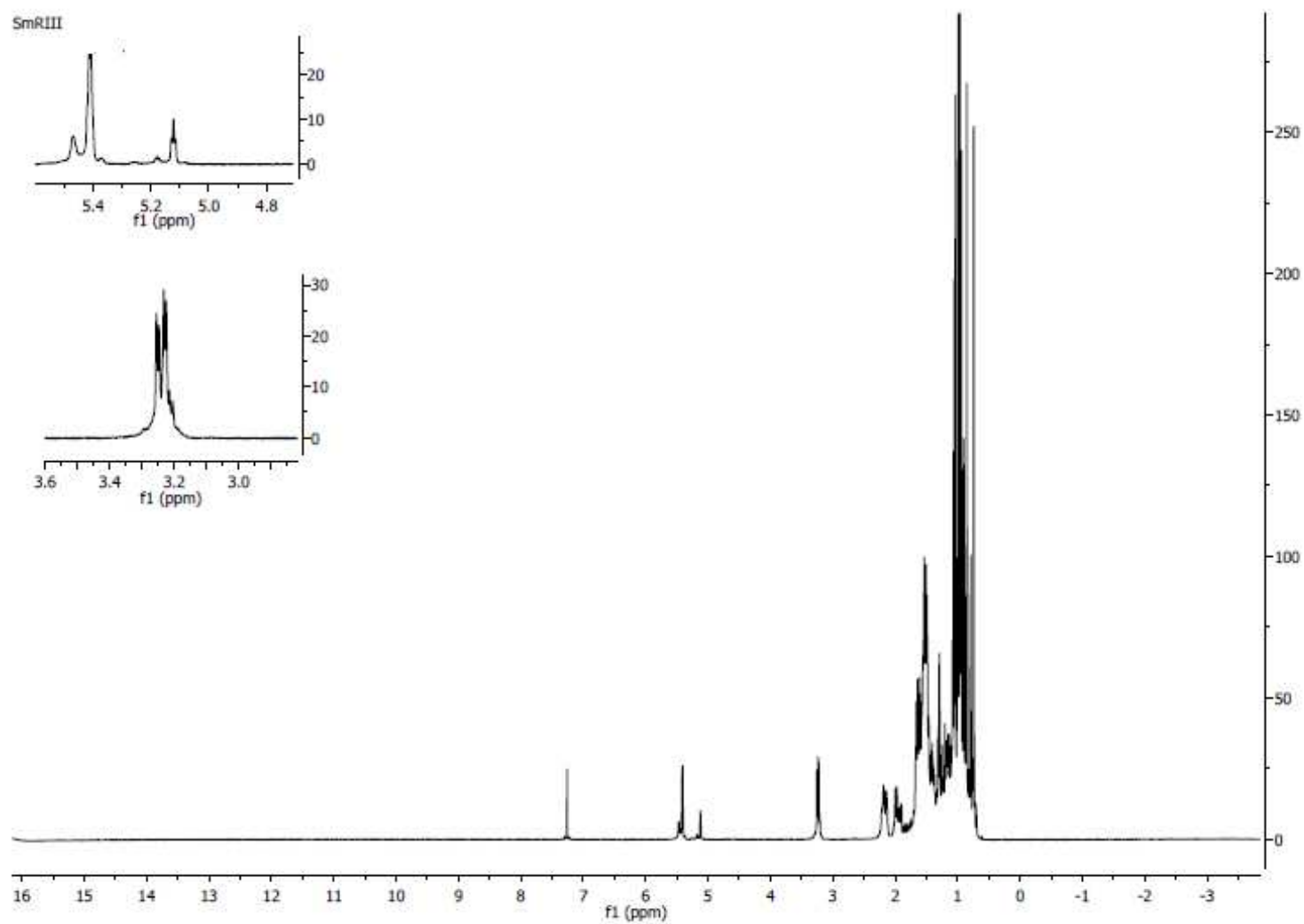
**Tabela 11:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da  $\alpha$ -amirina.

Carbono	$\alpha$ -amirina	
	$\delta$ experimental	$\delta$ literatura*
1	38,1	38,8
2	27,8	27,4
3	79,4	79,4
4	39,0	39,0
5	55,0	55,5
6	18,5	18,6
7	32,5	32,8
8	41,3	40,0
9	48,3	47,8
10	37,0	37,1
11	23,8	23,7
12	124,5	125,3
13	139,7	139,6
14	41,6	41,9
15	28,2	28,6
16	26,3	26,3
17	33,8	33,5
18	59,2	59,9
19	38,9	39,0
20	39,8	40,0
21	31,4	31,3
22	41,6	41,9
23	29,0	28,3
24	15,7	15,7
25	15,8	15,8
26	16,9	17,0
27	23,5	23,9
28	28,8	28,3
29	16,9	17,0
30	21,5	21,8

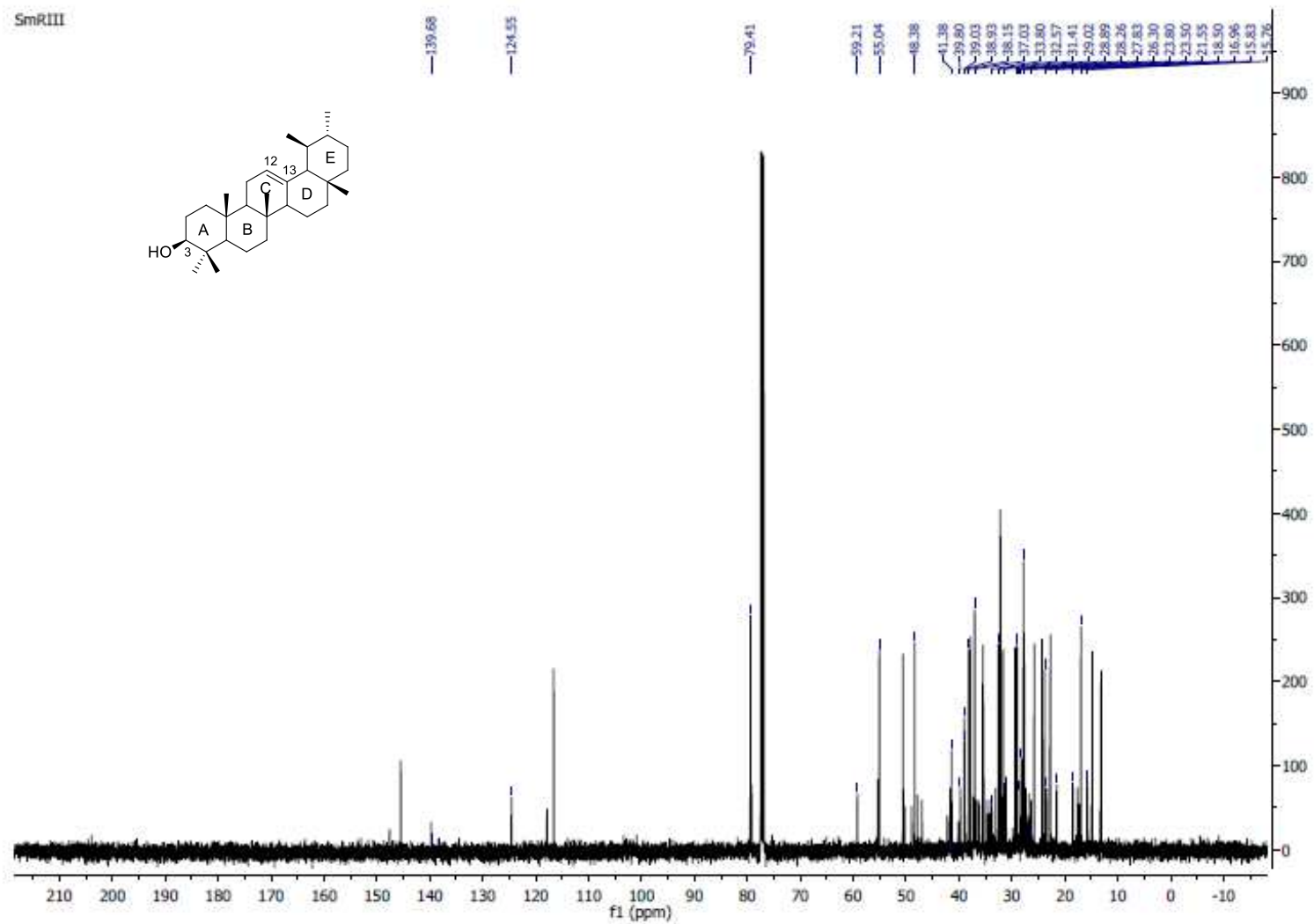
\* JEFFREYS et al., 2016;  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$



**Figura 20:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração Sm-R III (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  referente aos sinais de  $\alpha$ -amirina presente na fração Sm-R III (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



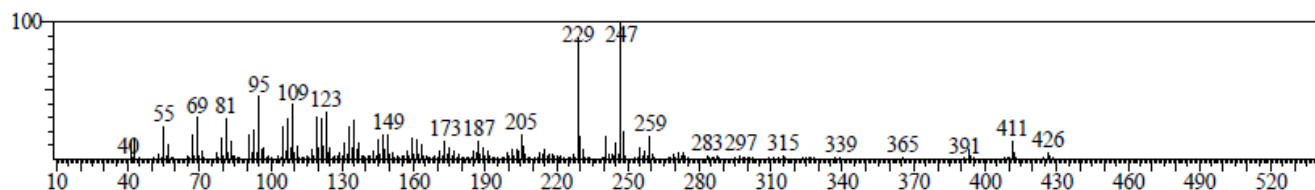
Estudos anteriores já evidenciaram o isolamento e identificação de  $\alpha$ -amirina de outras espécies vegetais. Entre estas, plantas pertencentes ao gênero *Pouteria* e *Manilkara* (Sapotaceae), *Vitex* (Verbenaceae), *Vernonia* (Asteraceae) e *Trichogonia* (Asteraceae). Em relação à espécie *S. microglossa*, GASTALDO (2013) isolou e identificou a  $\alpha$ -amirina das partes aéreas da planta. Sobre as raízes, esta é a primeira vez em que a  $\alpha$ -amirina é isolada e identificada.

Inúmeras atividades biológicas já foram descritas para  $\alpha$ -amirina e sua forma isomérica  $\beta$ -amirina, a saber: anti-inflamatória, gastroprotetora, antifúngica, antiviral e inseticida. Em um estudo de *docking*, foi atribuída à  $\alpha$ -amirina a propriedade de inibição tumoral e da enzima COX-2. Além disso, RODRIGUES e colaboradores (2013) atribuíram à mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas presentes no extrato de *Protium spruceanum* a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva verificadas em seu estudo (MOREIRA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; YOUSEFBEYK et al., 2014; RANJBAR et al., 2016).

Porém, até o momento, não há estudos na literatura que relacionem  $\alpha$ -amirina a atividades esquistossomicida.

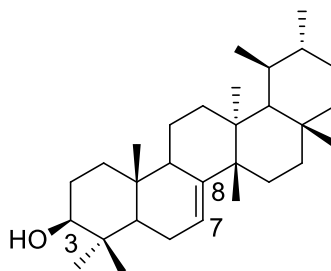
Verifica-se, ainda, no cromatograma de CG-EM da fração Sm-R III a presença de um pico majoritário no  $T_R$  de 30,688 minutos. A comparação do espectro de massas (Figura 22) obtido deste pico com os dados já descritos na literatura permite inferir que a substância em análise é o triterpeno pentacíclico bauerenol (Figura 23), visto a presença do íon molecular em  $m/z$  426 e pico base em  $m/z$  247.

**Figura 22:** Espectro de massas do pico 6 da fração Sm-R III obtido por CG-EM.



Espectro de massas do pico de  $T_R = 30,688$  min. do cromatograma da fração Sm-R III. Espectro de massas por impacto eletrônico 70 eV.

**Figura 23:** Estrutura química do bauerenol.



Em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , este apresenta os mesmos deslocamentos químicos da  $\alpha$ -amirina em razão de serem isômeros de posição. A diferenciação entre os triterpenos é evidenciada no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24).

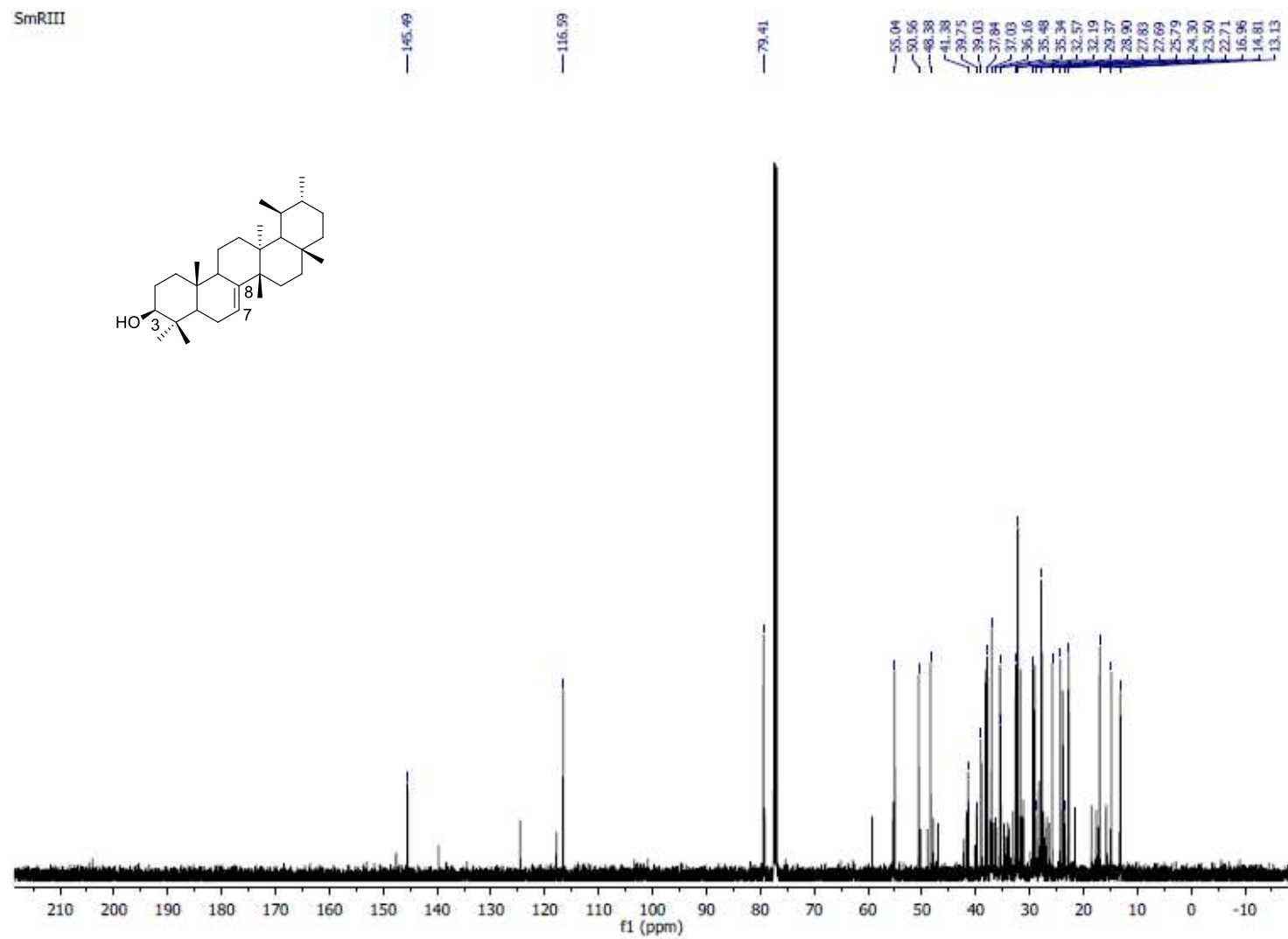
Sendo assim, observam-se os sinais em  $\delta$  79,4 ppm referente ao carbono C-3 ligado diretamente a hidroxila na posição  $\beta$ , proporcionando maior desblindagem deste carbono. Os sinais atribuídos aos carbonos de hibridização  $sp^2$  foram observados em  $\delta$  116,5 ppm (C-7) e 145,3 ppm (C-8). Os demais sinais atribuídos aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos são observados entre  $\delta$  13,1 a 55,0 ppm (Tabela 12) (RAGA et al., 2015).

**Tabela 12:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do bauerenol.

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> experimental</b>	<b><math>\delta</math> literatura*</b>
1	37,0	36,9
2	27,8	27,7
3	79,4	79,0
4	39,0	38,9
5	50,5	50,4
6	24,3	24,1
7	116,5	116,4
8	145,4	145,2
9	48,3	48,2
10	35,3	35,3
11	16,9	16,9
12	32,5	32,4
13	37,8	37,7
14	41,3	41,5
15	28,9	28,9
16	37,8	37,7
17	32,1	32,0
18	55,0	54,9
19	35,4	35,3
20	32,1	32,0
21	29,3	29,7
22	31,6	31,5
23	27,6	27,5
24	14,8	14,7
25	13,1	13,0
26	23,5	23,7
27	22,8	22,7
28	39,7	40,0
29	25,7	25,6
30	22,7	22,5

\* RAGA et al., 2015;  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$

**Figura 24:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  referente aos sinais do bauerenol presente na fração Sm-R III (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



A literatura assinala o isolamento e identificação do bauerenol de poucas espécies vegetais dentre elas 2 espécies de *Baccharis* (Asteraceae), *Cinnamomum cebuense* (Lauraceae), *Hoya multiflora* (Apocynaceae), *Ardisia elliptica* e, em relação aa espécies do gênero *Solidago*, OKANO e colaboradores (1983) o isolou das raízes de *S. altissima* e GASTALDO (2013) isolou e identificou o bauerenol das partes aéreas de *S. microglossa*. Logo, este é o primeiro relato do seu isolamento e identificação das raízes de *S. microglossa* (OKANO et al., 1983; FREITAS et al., 2009; RAGASA et al., 2013; EBAJO et al., 2015).

Assim como são escassos os estudos de isolamento do bauerenol, poucos são os relacionados às suas atividades biológicas. Como exemplo de suas atividades biológicas está a atividade em processo inflamatório agudo e potente efeito analgésico e antidiarreico quando associado a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas. Ainda, foi verificada a capacidade de supressão da angiogênese quando, também, em mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas (FREITAS et al., 2009; RAGA et al., 2015).

#### **4.1.3 Subfração Sm-R IV 5**

Após análise em CCD da subfração Sm-R IV 5, foi possível observar, dentro das condições cromatográficas utilizadas, a presença de uma mancha isolada. Sendo assim, esta subfração foi submetida às técnicas de CG-EM e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e encontra-se em processo de identificação estrutural.

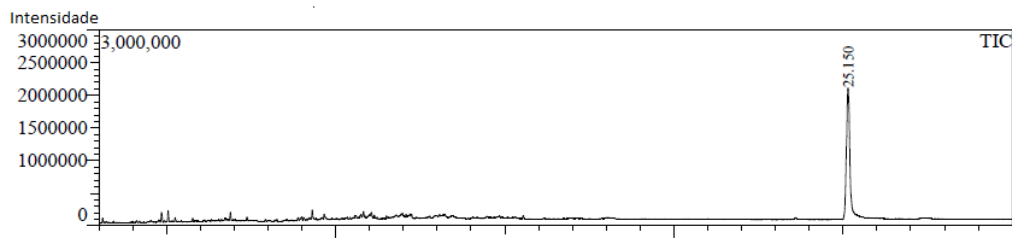
#### **4.1.4 Subfração Sm-R IV 6**

Em seguida a CC realizada, a análise em CCD da subfração Sm-R IV 6 apresentou uma única mancha dentro das condições cromatográficas empregadas. Logo, esta subfração foi submetida às técnicas de CG-EM e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para elucidação estrutural.

O cromatograma procedente da subfração Sm-R IV 6 (Figura 25) evidenciou a presença de apenas um pico de  $T_R=25,150$  minutos dentro das condições cromatográficas utilizadas. De acordo com o bando de dados NIST, foi sugerido que o espectro de massas (Figura 26) da substância possui fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$  com índice de similaridade de 84% para o esteroide espinasterol. Observa-se, no espectro, o

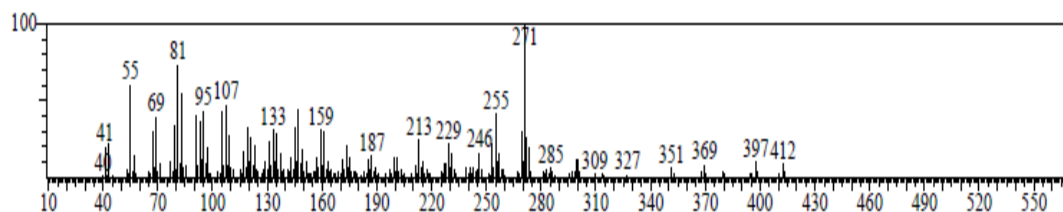
pico base em 271  $m/z$ , bem como o fragmento íon molecular em 412  $m/z$  coerentes com os dados já publicados na literatura corroborando com a estrutura do espinasterol (Figura 27) (KRASTEVA et al., 2008).

**Figura 25:** Cromatograma da subfração Sm-R IV 6 em CG-EM.



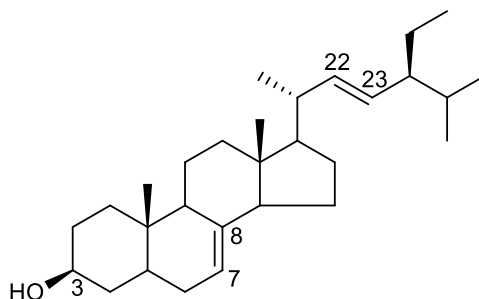
Perfil cromatográfico da subfração Sm-R IV 6 obtido em CG-EM.

**Figura 26:** Espectro de massas da subfração Sm-R IV 6 obtido por CG-EM.



Espectro de massas do pico de  $T_R = 25,150$  min. do cromatograma da fração Sm-R IV 6. Espectro de massas por impacto eletrônico 70e V.

**Figura 27:** Estrutura química do espinasterol.



Em relação ao espectro de RMN de  $^1H$ , foi possível observar sinais entre  $\delta$  0,5 e 2,0 ppm atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Observa-se,



também, um sinal em  $\delta$  3,6 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila que se encontra ligada ao carbono C-3, além de um conjunto de sinais entre  $\delta$  5,0 e 5,2 ppm correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos de hibridização  $sp^2$  do composto (Figura 28).

Já no de RMN de  $^{13}C$  (Figura 29), observa-se um sinal em  $\delta$  71,2 ppm correspondente ao carbono C-3 ligado diretamente a uma hidroxila na posição  $\beta$  contribuindo, desta forma para a desblindagem do mesmo. Os sinais típicos dos carbonos de hibridização  $sp^2$  foram observados em  $\delta$  117,6 ppm (C-7), 129,5 ppm (C-23), 138,3 ppm (C-22) e 139,7 ppm (C-8). Os sinais referentes aos carbonos metílicos (C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 e C-29) são observados entre  $\delta$  12,4 e 21,5 ppm. Os sinais referentes aos carbonos metilênicos (C-1, C-2, C-4, C-6, C-11, C-12, C-15, C-16 e C-28), observados entre  $\delta$  21,5 e 39,6 ppm e os sinais de carbonos metínicos (C-5, C-9, C-14, C-17, C-20, C-24 e C-25) observados entre  $\delta$  32,0 e 56,0 ppm (Tabela 12) (KOJIMA et al., 1990).

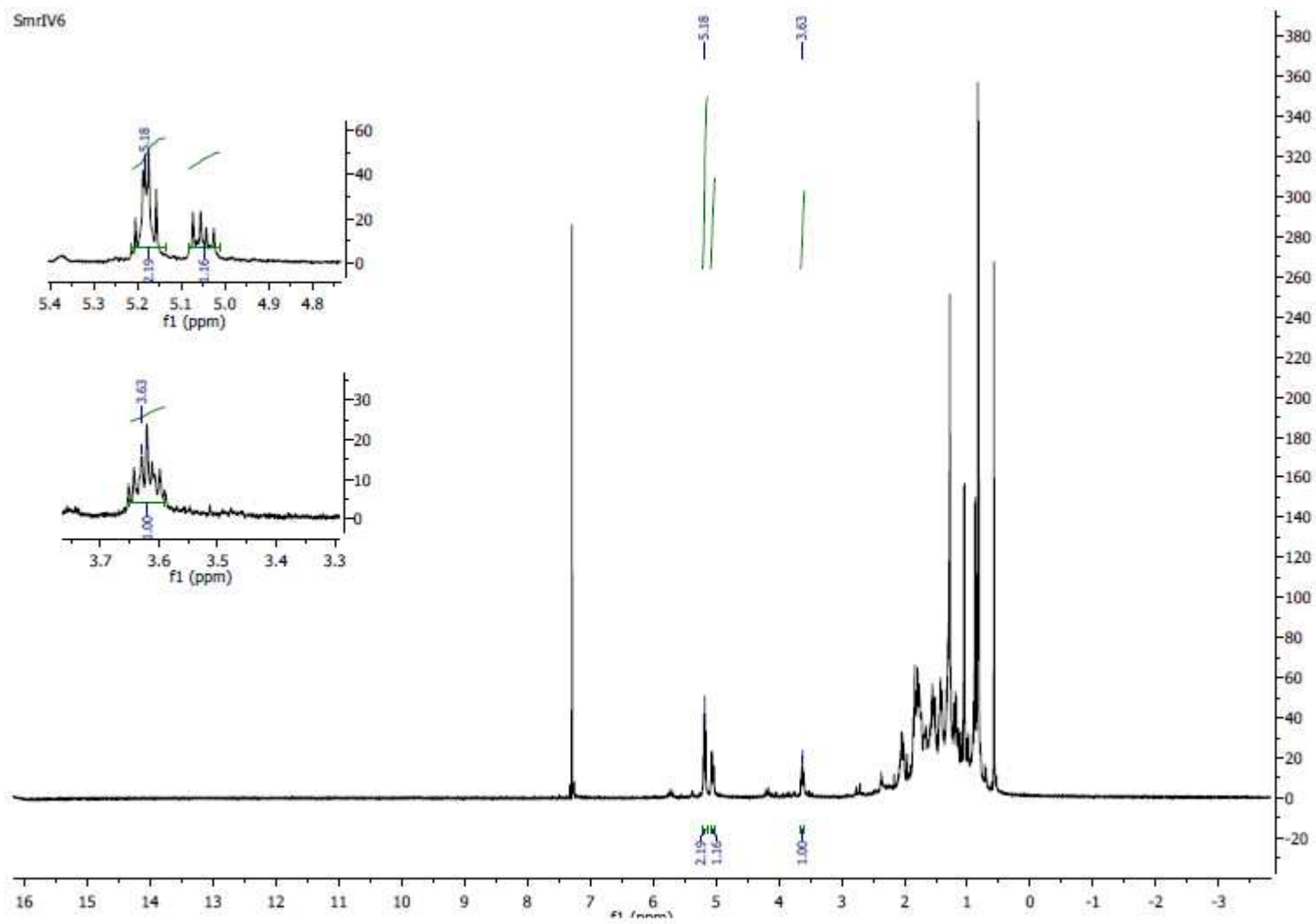
Os resultados encontrados nos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  em comparação com os dados descritos na literatura confirmam a estrutura química do espinasterol (Tabela 13).

**Tabela 13:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do espinasterol (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

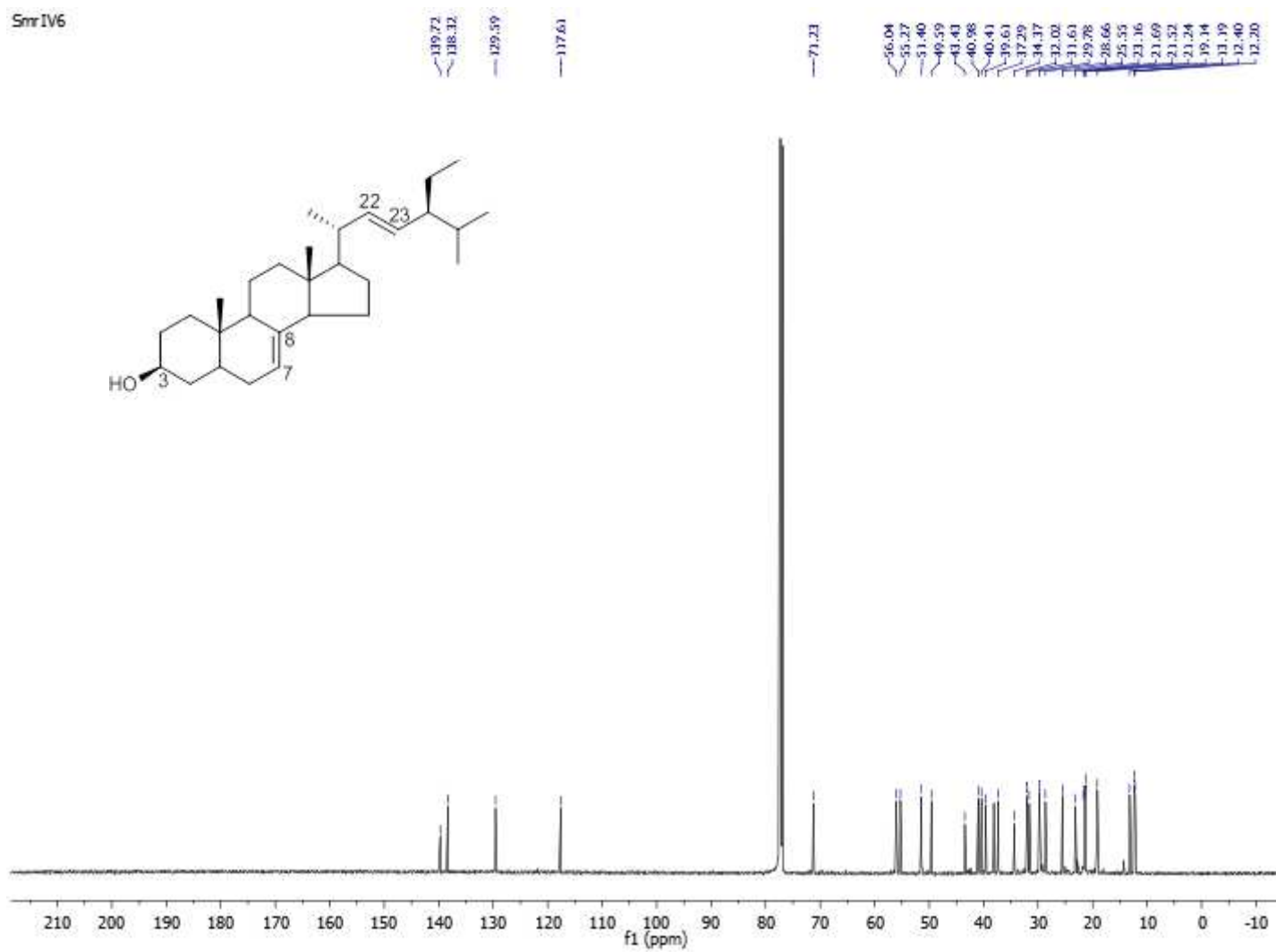
<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> experimental</b>	<b><math>\delta</math> literatura*</b>
<b>1</b>	37,2	37,1
<b>2</b>	31,6	31,4
<b>3</b>	71,2	71,0
<b>4</b>	38,1	38,0
<b>5</b>	40,4	40,2
<b>6</b>	29,7	29,6
<b>7</b>	117,6	117,7
<b>8</b>	139,7	139,5
<b>9</b>	49,5	49,4
<b>10</b>	34,3	34,4
<b>11</b>	21,5	21,5
<b>12</b>	39,6	39,4
<b>13</b>	43,4	43,3
<b>14</b>	55,2	55,1
<b>15</b>	23,1	23,0
<b>16</b>	28,6	28,5
<b>17</b>	56,0	55,8
<b>18</b>	12,2	12,0
<b>19</b>	13,1	13,0
<b>20</b>	40,9	40,8
<b>21</b>	21,5	21,4
<b>22</b>	138,3	138,8
<b>23</b>	129,5	129,4
<b>24</b>	51,4	51,3
<b>25</b>	32,0	31,9
<b>26</b>	21,2	21,1
<b>27</b>	19,1	19,4
<b>28</b>	25,5	25,4
<b>29</b>	12,4	12,3

\*KOJIMA et al., 1990,  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$

**Figura 28:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do espinasterol (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 29:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do espinasterol (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espinasterol, também identificado na literatura como  $\alpha$ -espinasterol, é um esteroide encontrado em diversas espécies vegetais, sendo comumente isolado do óleo de argan (*Argania spinosa*) e em espécies de *Polygala* (Polygalaceae). Outros trabalhos também descrevem seu isolamento das sementes de *Polyalthia cerasoides* (Annonaceae), além das raízes de *Conyza canadenses* (Asteraceae). Ainda, é descrito o isolamento desta substância das partes aéreas de *Aster scaber* (Asteraceae). Em relação às espécies pertencentes ao gênero *Solidago* (Asteraceae), há relatos do seu isolamento das partes aéreas de *S. wrightii* e *S. altissima* e, ainda, das raízes de *S. microglossa* (JOLAD et al., 1989; MEOTTI et al., 2006; MOREL et al., 2006; RIBAS et al., 2008; JANSON et al., 2009; CSUPOR-LÖFFLER et al., 2011; BORGES et al., 2014).

Os chamados fitoesteróis, dentre os quais se encontram o espinasterol, têm sido estudados quanto suas propriedades benéficas em desordens do sistema nervoso central. Neste contexto, a capacidade comprovada do espinasterol em aumentar a resistência de células do hipocampo e micróglia frente a injúrias oxidativas e suprimir a expressão de enzimas e mediadores pró-inflamatórios torna-o um grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas (JEONG et al., 2010; VANMIERLO et al., 2015).

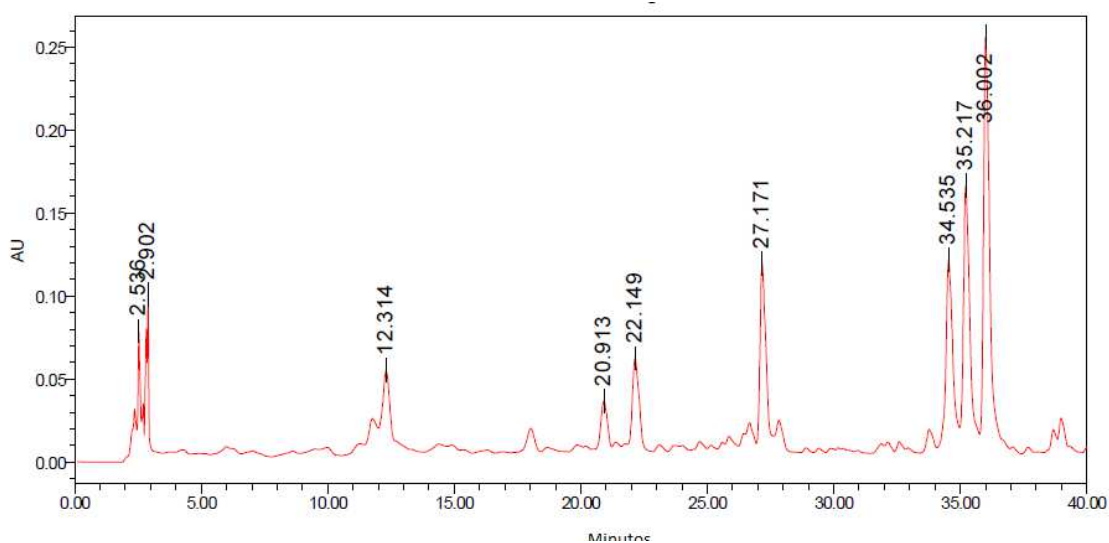
Além disso, outras atividades farmacológicas também têm sido atribuídas ao espinasterol, tais como atividade antiulcerogênica, antihiperalgésico, anti-inflamatório, além da atividade seletiva frente a linhagens tumorais de células de adenocarcinoma cervical, pele e de mama. Em continuidade, ao espinasterol têm sido descrita a propriedade antinociceptiva associada a sua interação antagonista com receptores vaniloides e, também, pela interrupção da via glutamatérgica (RIBAS et al., 2008; CSUPOR-LÖFFLER et al., 2011; KLEIN JÚNIOR et al., 2012; TREVISAN et al., 2012; BORGES et al., 2014).

Entretanto, não há, até o presente momento, dados publicados quanto o potencial esquistossomicida do espinasterol.

## 4.2 Análise em CLAE-DAD do extrato Ac

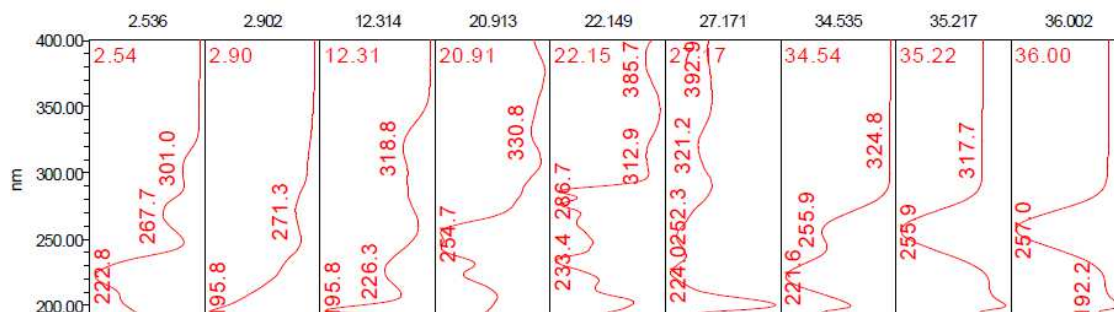
O extrato bruto Ac foi submetido à análise em CLAE-DAD e seu perfil cromatográfico no comprimento de onda de 245 pode ser visualizado na figura 30, bem como o espectro de UV (Figura 31) dos picos majoritários e seus respectivos  $T_R$ .

**Figura 30:** Perfil cromatográfico do extrato Ac em CLAE-DAD.



Perfil cromatográfico de Ac em 240 nm em CLAE-DAD. Fase móvel binária consistiu em gradiente de eluição composta de  $H_2O$  (0,1%  $H_3PO_4$ ) e MeOH em gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Utilizou-se coluna de fase reversa  $C_{18}$  (4,6 mm x 250 mm, 5 $\mu$ m) e fluxo de 1 mL/min.

**Figura 31:** Espectros de UV dos picos majoritários presentes no extrato bruto Ac em CLAE-DAD.



Espectro de UV dos picos majoritários obtidos nos tempos de retenção de 2,536; 2,902; 12,314; 20,913; 22,149; 27,141; 34,535; 35,217 e 36,002 minutos.

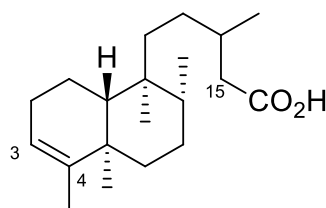
Através da análise do perfil cromatográfico de Ac, observa-se a complexidade química do extrato. Nota-se que os picos majoritários eluíram em diferentes tempos de retenção, indicando a presença de substâncias de natureza química diferentes. Além disso, infere-se que as mesmas possuem polaridades muito distintas, visto que a interação das mesmas com as fases estacionária e móvel proporcionou grande diferença entre os tempos de retenção.

Já o espectro de UV, este indica que as substâncias presentes no extrato apresentem grupos cromóforos como, por exemplo, insaturações e sistemas aromáticos (WOLFENDER, 2008; PAVIA et al., 2010).

#### 4.2.1 Identificação da Substância Ac-2d

Após os processos cromatográficos realizados, a subfração Ac-2d foi analisada em CCD e, dentro das condições cromatográfica utilizadas, apresentou-se, aparentemente isolada. Sendo assim, Ac-2d foi submetida à técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Os dados espectroscópicos obtidos em comparação com os anteriormente publicados na literatura (Tabela 14) permitiu concluir que a substância em análise era o diterpeno ácido populifólico (Figura 32).

**Figura 32:** Estrutura química do ácido populifólico.

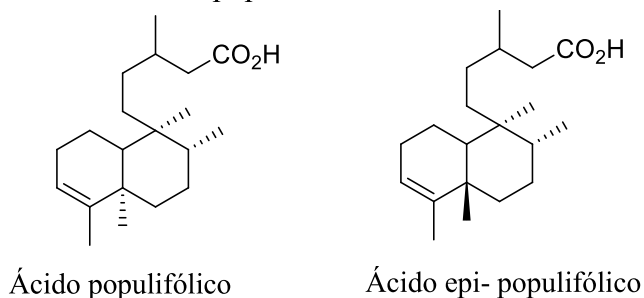


O ácido populifólico possui um epímero conhecido como ácido *epi*-populifólico também já isolado da espécie *A. cymbifera*. Ambos podem ser diferenciados pela técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$ , uma vez que o carbono C-18 do ácido populifólico possui  $\delta$  19,9 ppm enquanto que o ácido *epi*-populifólico possui  $\delta$  33,0 ppm (LEITÃO et al., 1992).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) foi possível observar os sinais característicos de carbonos de hibridização  $sp^2$  em  $\delta$  120,3 e 144,4 ppm sendo atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-3 e C-4. Já o sinal em  $\delta$  179,2 ppm foi atribuído ao carbono carboxílico C-15 e que se encontra mais desblindado devido ao efeito eletronegativo dos átomos de oxigênio adjacentes a ele.

Os sinais referentes aos carbonos metílicos foram observados entre  $\delta$  15,9 e 19,9 ppm (C-16, C17, C-18, C-19, C-20). Entre  $\delta$  18,2 e 41,4 ppm encontram-se os sinais atribuídos aos carbonos metilênicos (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-14) e os demais sinais observados entre  $\delta$  36,2, 46,4 e 30,8 ppm são referentes aos carbonos metínicos (C-8, C-10 e C-13) (LEITÃO et al., 1992).

**Figura 33:** Estrutura química dos diterpenos ácido populifólico e do ácido *epi*-populifólico.





**Tabela 14:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido populifólico.

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> experimental</b>	<b><math>\delta</math> literatura*</b>
<b>1</b>	18,2	18,3
<b>2</b>	26,8	26,8
<b>3</b>	120,3	120,5
<b>4</b>	144,4	144,5
<b>5</b>	38,1	38,2
<b>6</b>	36,8	36,9
<b>7</b>	27,5	27,6
<b>8</b>	36,2	36,2
<b>9</b>	38,5	40,0
<b>10</b>	46,4	46,4
<b>11</b>	35,4	35,5
<b>12</b>	29,4	29,5
<b>13</b>	30,8	30,9
<b>14</b>	41,4	41,6
<b>15</b>	179,2	179,4
<b>16</b>	19,9	19,9
<b>17</b>	15,9	16,0
<b>18</b>	19,8	19,9
<b>19</b>	17,9	18,0
<b>20</b>	18,4	18,5

\*LEITÃO et al., 1992;  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$

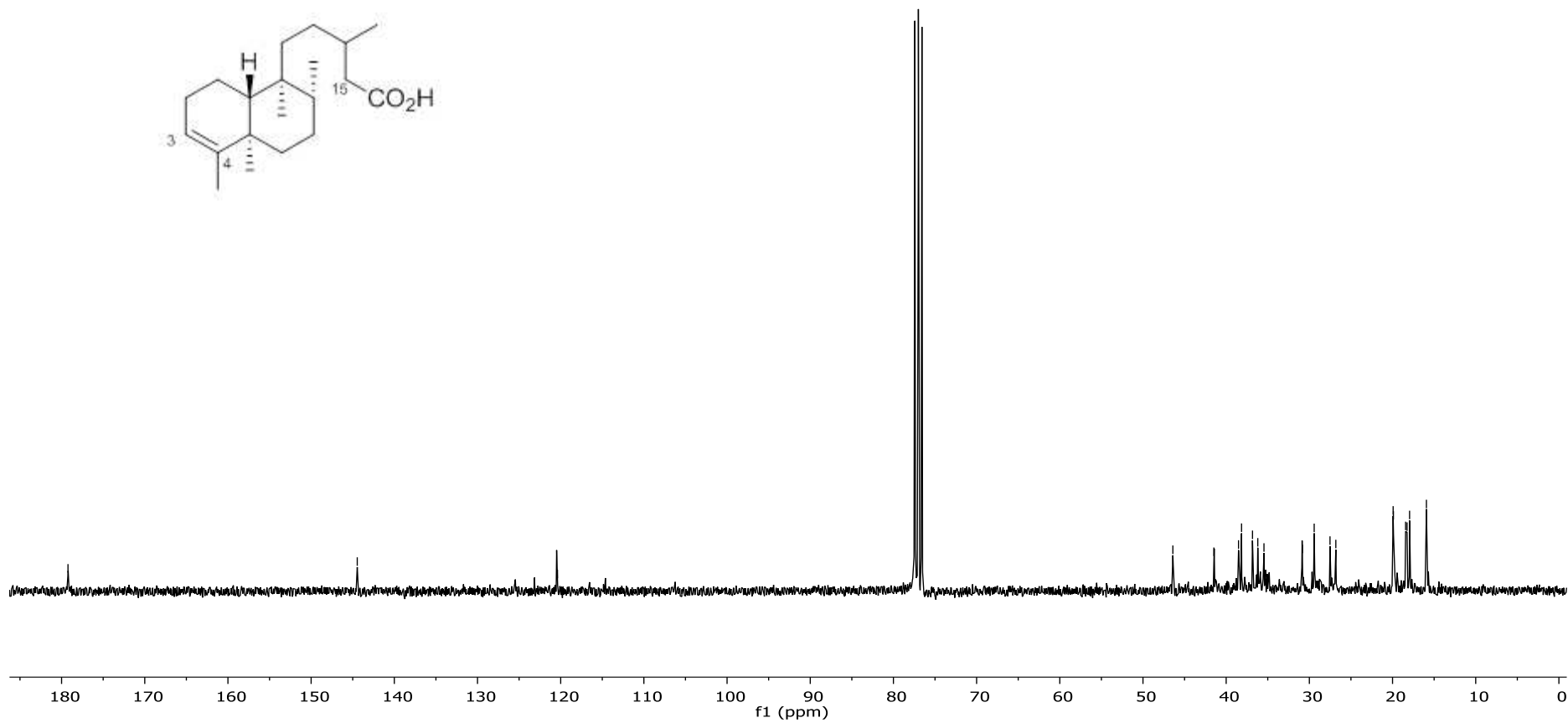
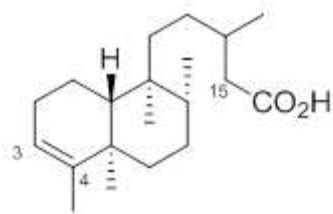
—179.23

—144.46

—120.39

**Figura 34:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido populifólico (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

46.41  
41.48  
38.51  
38.15  
36.83  
36.20  
35.45  
30.84  
29.42  
27.52  
26.82  
19.93  
19.89  
18.43  
18.25  
17.95  
15.93



Adicionalmente, o ácido populifólico já foi identificado em algumas espécies do gênero *Aristolochia* como *A. brasiliensis*, *A. galeata* (LOPES et al., 1987; LOPES & BOLZANI, 1988) e inclusive na espécie em estudo, *A. cymbifera* (LEITÃO et al., 1992).

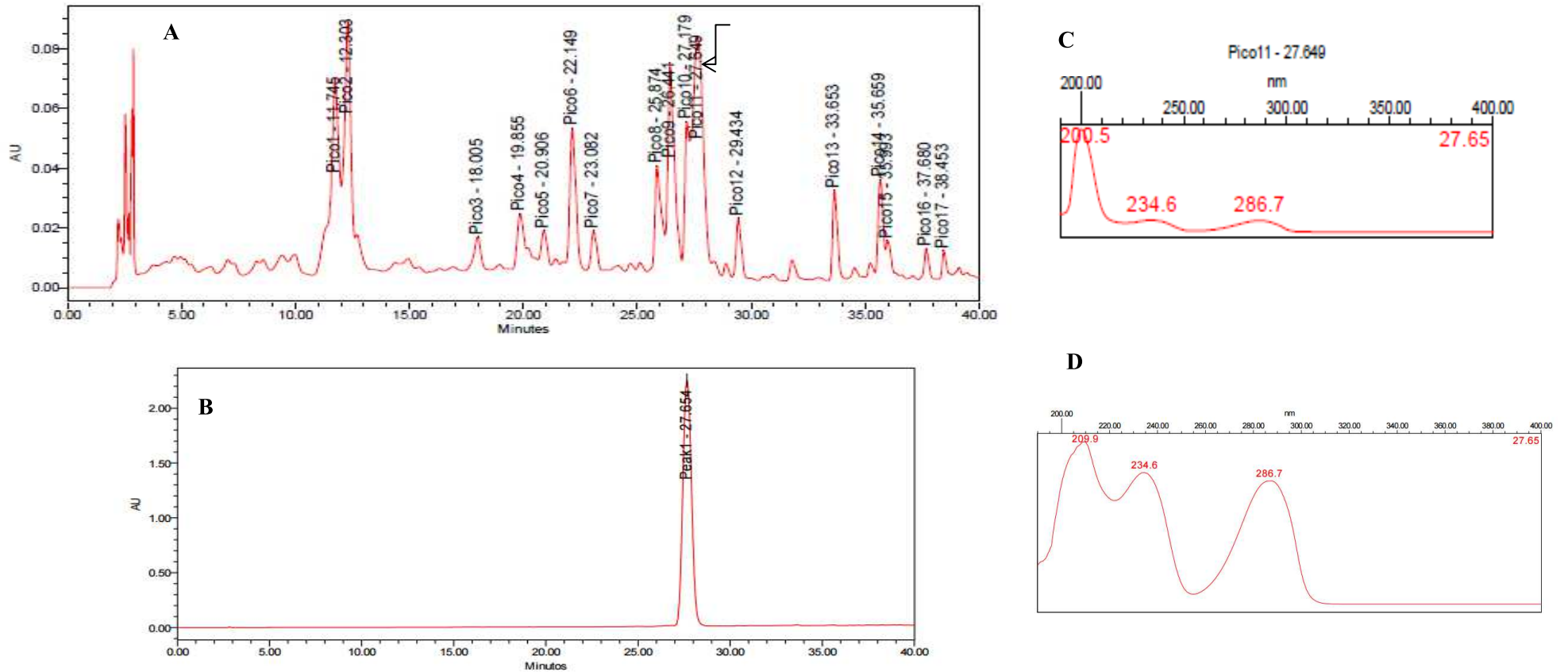
A respeito das atividades biológicas relacionadas a ele, não há estudos na literatura que demonstrem seu potencial biológico. Apenas DE BARROS MACHADO e colaboradores (2005) verificaram a atividade antimicrobiana frente a espécies de *Staphylococcus* do ácido 2- oxo-populifólico.

#### **4.2.2 Identificação da subfração Ac 5-c IV**

A análise em CCD da subfração Ac 5-c IV, permitiu a visualização de uma única mancha dentro das condições cromatográficas utilizadas. Assim, a mesma foi submetida à análise em CLAE-DAD e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

O cromatograma, obtido por varredura de 190 a 400 nm, demonstrou a presença de um pico isolado, nas condições cromatográficas utilizadas, no  $T_R$  de 27,654 minutos. Já o espectro de UV demonstra que a substância possui grupos cromóforos, visto que as bandas de absorção acima de  $\lambda_{\text{máx}}$  200 nm indicam a presença dos mesmos. Ademais, a análise do extrato bruto Ac mediante as mesmas condições cromatográficas do pico isolado permite identifica-lo no extrato com o mesmo tempo de retenção e mesmo espectro de ultravioleta (Figura 35).

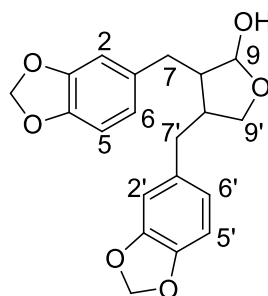
**Figura 35:** Análise cromatográfica do extrato bruto Ac e subfração Ac 5- c<sub>IV</sub> em CLAE-DAD.



Perfil cromatográfico de Ac obtido em 290 nm em CLAE-DAD. Fase móvel binária consistiu em gradiente de eluição composta de H<sub>2</sub>O (0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e MeOH em gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 40 minutos. Utilizou-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5µm) e fluxo de 1 mL/min.. (A) Cromatograma do extrato bruto Ac (B) Cromatograma da subfração Ac 5-c<sub>IV</sub>; (C) Espectro de UV-vis do extrato Ac; (D) Espectro de UV-vis da subfração Ac 5-c<sub>IV,5</sub>

Com o intuito de identificar a estrutura química de Ac 5-c IV, esta substância foi submetida à técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Após a comparação dos dados obtidos com os já publicados na literatura, concluiu-se que a substância em análise refere-se a lignana cubebina (Figura 36).

**Figura 36:** Estrutura química da cubebina.



A comparação dos dados de espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  com os descritos na literatura propõe a presença de cubebina na mistura epimérica de  $8R,8'R,9S$ -cubebina e da  $8R,8'R,9R$ -cubebina (Figura 37).

Em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38), observam-se sinais na região de  $\delta$  6,75 – 6,51 (m) referentes aos hidrogênios do anel aromático (H-2, H-5, H-6 e H-2', H-5', H-6'). Verifica-se, ainda, o sinal em  $\delta$  5,94 atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono  $sp^3$  dioxigenado.

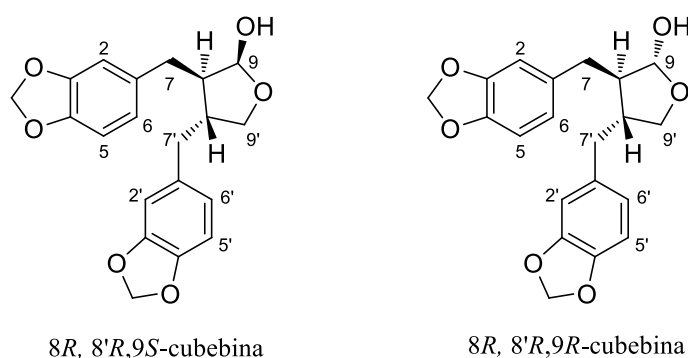
Em adição, foi possível observar sinais na região de  $\delta$  2,43 (m) e  $\delta$  2,69 (m) atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-7 e H-7'. Observa-se, também, a presença de um multiplete (2H) em  $\delta$  2,16 correspondentes aos hidrogênios metínicos H-8 e H-8'. Ainda, foi observado o simpleto (2H) em  $\delta$  5,24 referente ao hidrogênio H-9, além dos sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono  $sp^3$  mono-oxigenado H-9' em  $\delta$  4,01 (t, 1H,  $J = 8,4\text{Hz}$ ) e  $\delta$  3,81 (t, 1H,  $J = 8,4\text{Hz}$ ).

Contudo, são observados sinais em  $\delta$  4,11 (t, 1H,  $J = 7,8\text{Hz}$ , H-9');  $\delta$  3,59 (t, 1H,  $J = 7,8\text{Hz}$ , H-9');  $\delta$  2,01 (m, 1H, H-8) e  $\delta$  2,43 (m, H-8') sugerindo a presença da mistura de estereoisômeros da cubebina em concordância com os dados já publicados na literatura (Tabela 15) (DE PASCOLI et al., 2006).

Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 39) é possível observar a ocorrência de sinais duplicados reforçando a presença da mistura dos estereoisômeros. Os sinais em  $\delta$

147,6 (C-3), 147,5 (C-3'), 145,7 (C-4) e 145,9 (C-4') correspondem aos carbonos do anel aromático ligado diretamente ao oxigênio enquanto que os sinais em  $\delta$  133,2/133,8 (C-1) e 134,1/134,5 (C-1') correspondem aos carbonos do anel aromático não hidrogenado. Já os sinais entre  $\delta$  121,7 e 108,0 podem ser atribuídos aos carbonos do anel aromático (C-2, C-5, C-6 e C-2', C-5', C-6'). O sinal correspondente ao carbono metilendioxílico foi observado em  $\delta$  100,8 e os sinais correspondentes ao carbono metínico dioxigenado (C-9) encontram-se em  $\delta$  103,3/98,8. Os sinais em  $\delta$  53,0/52,0 e 45,8/42,8 podem ser atribuídos a núcleos de carbono metínico, C-8 e C8', respectivamente. Já os sinais em  $\delta$  72,1/72,5 (C-9'), 39,2/38,8 (C-7') e 38,4 e 33,6 (C-7) podem ser atribuídos a núcleos de carbonos metilênicos (Tabela 16).

**Figura 37:** Mistura de estereoisômeros da cubebina.



**Tabela 15:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da cubebina.

Hidrogênio	<i>8R,8'R,9S</i>	<i>8R,8'R,9R</i>	<i>8R,8'R,9S</i>	<i>8R,8'R,9R</i>
	$\delta$ experimental		$\delta$ literatura*	
<b>2</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,56 d (1,5)	6,45 d (1,5)
<b>5</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,66 d (8,0)	6,61 d (8,5)
<b>6</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,52 dd (8,0; 1,5)	6,44 dd (8,5; 1,5)
<b>7</b>	2,43 m / 2,69 m	2,43 m / 2,69 m	2,37 m / 2,52 m	2,37 m / 2,60 dd (13,5; 7,5)
<b>8</b>	2,01 m	2,16 m	1,93 m	2,07 m
<b>9</b>	5,24 s	5,24 s	5,15 d (4,5)	5,15 d (1,5)
<b>2'</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,67 d (2,0)	6,51 d (1,5)
<b>5'</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,66 d (8,0)	6,63 d (7,5)
<b>6'</b>	6,75 - 6,51 m	6,75 - 6,51 m	6,62 dd (8,0 ; 2,0)	6,49 dd (7,5 ; 1,5)
<b>7'</b>	2,43 m / 2,69 m	2,43 m / 2,69 m	2,50 m / 2,70 dd (14,0; 10,0)	2,50 m / 2,52 m
<b>8'</b>	2,43 m	2,16 m	2,37 m	2,07 m
<b>9'</b>	3,59 t (7,8) / 4,11 t (7,8)	3,81 t (8,4) / 4,01 t (8,4)	3,50 dd (8,5; 7,5) / 4,03 t (8,5)	3,73 dd (8,5; 8,0) / 3,93 dd (8,5; 7,0)
<b>O-CH<sub>2</sub>-O</b>	4x 5,94 s	4x 5,94 s	4x 5,85 d (1,5)	4x 5,85 d (1,5)
<b>OH</b>	2,80 – 2,01	2,80 – 2,01	2,86 s	1,72 s

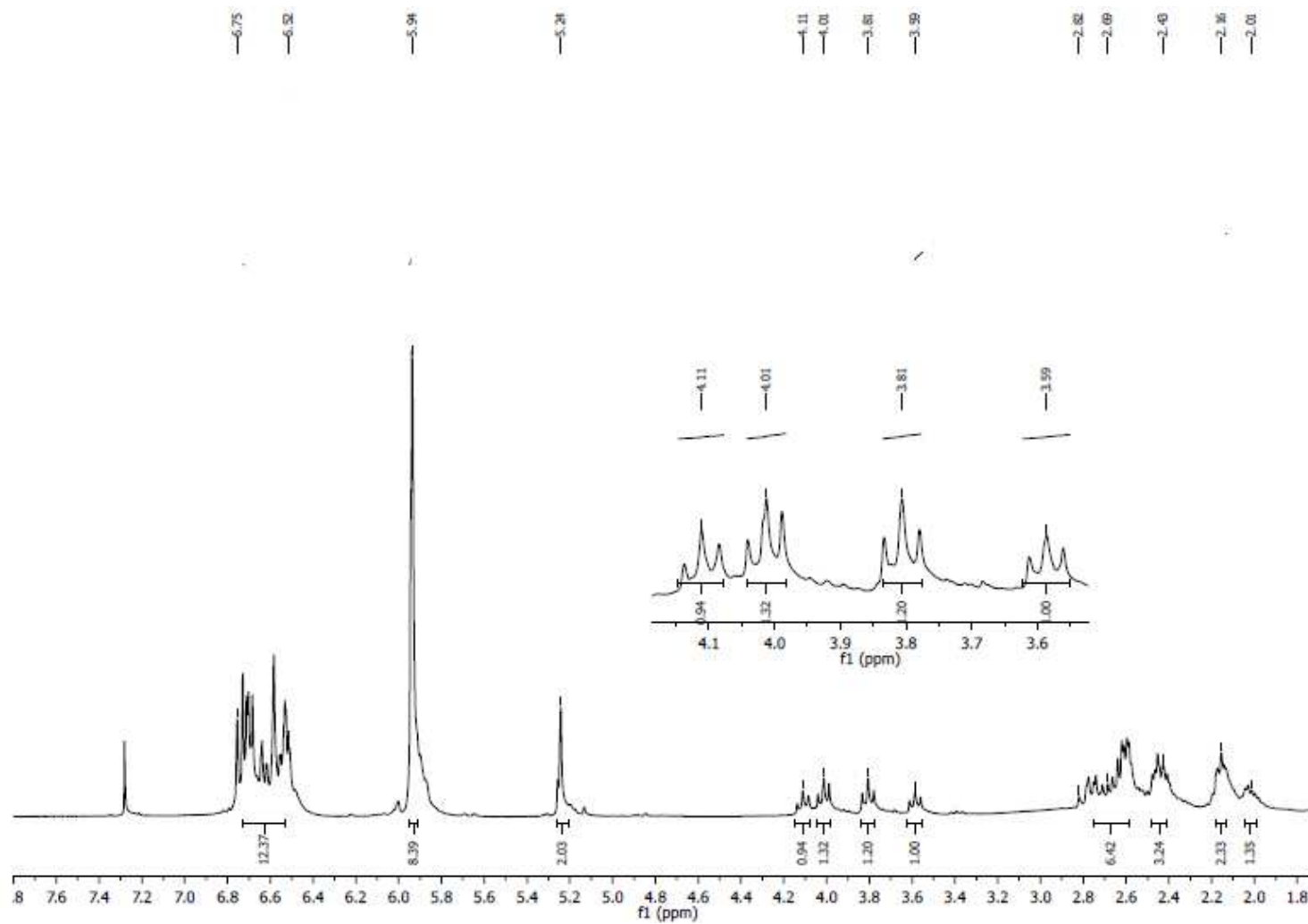
\* DE PASCOLI et al., 2006 (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabela 16:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da cubebina.

Carbono	<i>8R,8'R,9S</i>	<i>8R,8'R,9R</i>	<i>8R,8'R,9S</i>	<i>8R,8'R,9R</i>
	$\delta$ experimental		$\delta$ literatura*	
<b>1</b>	133,8	133,2	133,8	133,3
<b>2</b>	108,9	108,9	108,9	108,9
<b>3</b>	147,6	147,6	147,7	147,6
<b>4</b>	145,7	145,7	145,7	145,7
<b>5</b>	108,2	108,2	108,2	108,0
<b>6</b>	121,3	121,4	121,3	121,4
<b>7</b>	33,6	38,4	33,6	38,4
<b>8</b>	52,0	53,0	51,9	53,0
<b>9</b>	98,8	103,3	98,8	103,3
<b>1'</b>	134,5	134,1	134,5	134,1
<b>2'</b>	109,3	109,1	109,3	109,1
<b>3'</b>	147,5	147,5	147,5	147,5
<b>4'</b>	145,9	145,9	145,9	145,9
<b>5'</b>	108,1	108,0	108,1	108,0
<b>6'</b>	121,6	121,7	121,6	121,7
<b>7'</b>	38,8	39,2	38,8	39,2
<b>8'</b>	42,8	45,8	42,9	45,8
<b>9'</b>	72,5	72,1	72,5	72,1
<b>OCH<sub>2</sub>O</b>	2 x 100,8	2 x 100,8	2 x 100,8	2 x 100,8

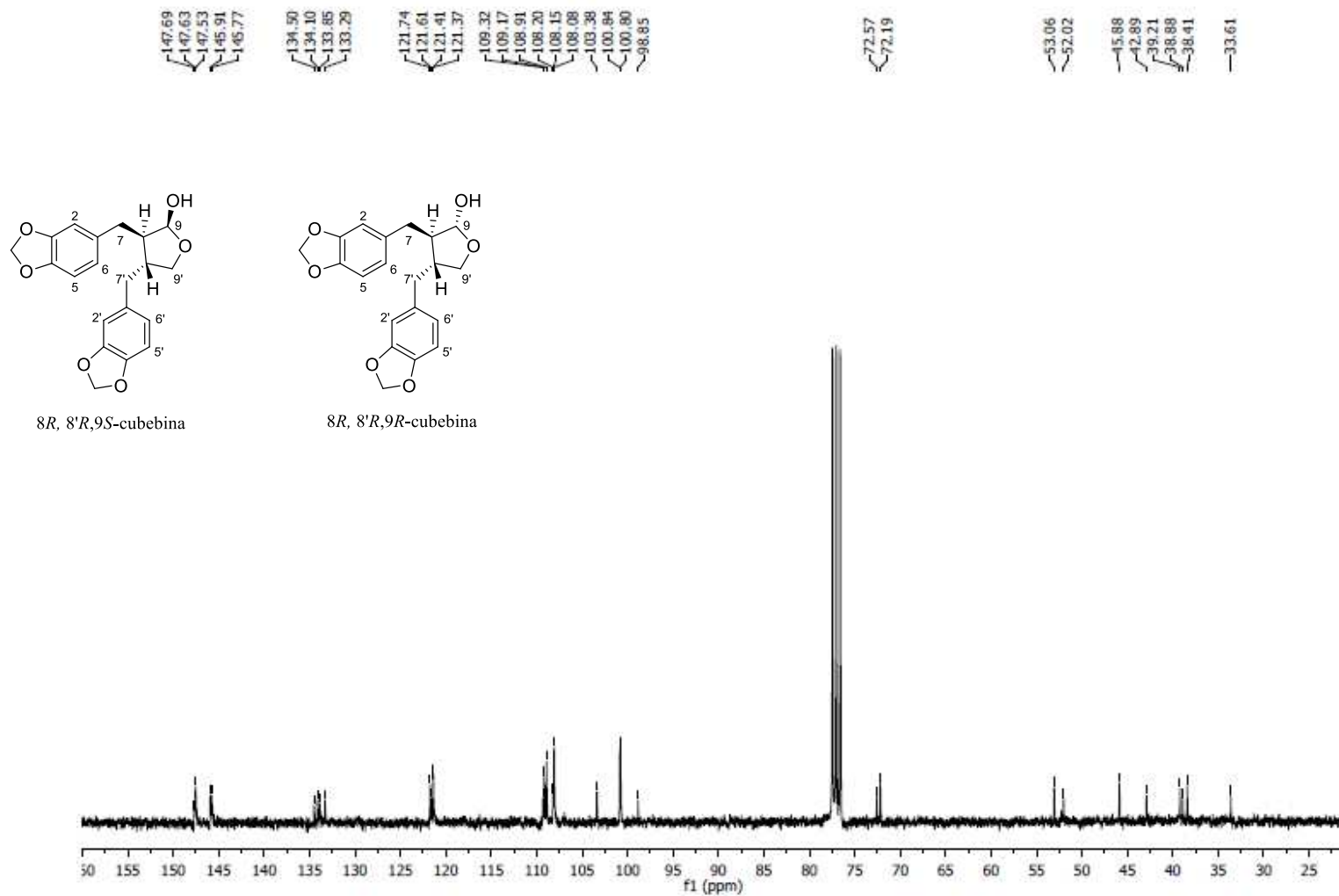
\* DE PASCOLI et al., 2006 (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Figura 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da cubebina (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).





**Figura 39:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da cubebina (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



A cubebina é comumente isolada das sementes de *Piper cubeba*, porém seu isolamento já foi assinalado de espécies vegetais pertencentes ao gênero *Aristolochia*, a saber: *A. cymbifera*, e em espécies de *A. pubescens* e *A. lagesiana* (LOPES & BOLZANI, 1988; SARAIVA et al., 2007; DE PASCOLI et al., 2006; PACHECO, 2013; REZENDE et al., 2013).

À cubebina diversas atividades biológicas têm sido relatadas. Dentre elas, podem-se destacar as atividades anti-inflamatória, antidepressiva, antitumoral, antiviral e inibidora do fator de agregação plaquetária (ESPERADIM et al., 2010;2013).

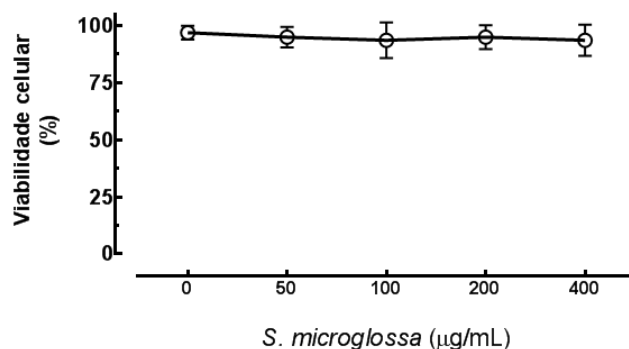
Quanto ao potencial antiparasitário da cubebina, verificou-se que a mesma possui expressivo potencial em reduzir a parasitemia *in vitro* e *in vivo* de animais infectados por *Trypanosoma cruzi* (SARAIVA et al., 2007; ESPERADIM et al., 2010). Quanto à atividade esquistossomicida, (-)-O-metilcubebina, derivado semi-sintético da cubebina, demonstrou expressiva atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No ensaio *in vivo* realizado, houve, aproximadamente, redução de 90% de vermes viáveis, após 40 dias de infecção. Ainda, a (-)-O-metilcubebina foi administrada após 7 e 21 dias de infecção, fase em que os parasitos ainda se encontram na forma jovem, com expressiva redução do número de vermes demonstrando, desta forma, que a substância atua de forma eficiente tanto na forma adulta quando na intermediária (esquistossômulo) (SILVA et al., 2008).

### 4.3 Atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos Sm-R e Ac e substâncias isoladas.

Embora inúmeros estudos apontem os potenciais efeitos de extratos brutos de espécies vegetais frente ao *S. mansoni* (CARRARA et al., 2014; DEJANI et al., 2014; JATSA et al., 2015) até o presente momento não há estudos científicos relacionados à atividade esquistossomicida do extrato bruto de *S. microglossa* e *A. cymbifera*.

Previamente ao ensaio esquistossomicida, a citotoxicidade dos extratos de Sm-R (Figura 40) e Ac (Figura 41) foi avaliada em células Vero (fibroblastos de rim de macaco) em diferentes concentrações.

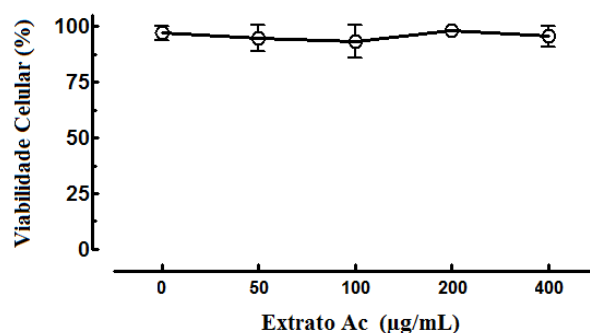
**Figura 40:** Viabilidade celular do extrato Sm-R em células Vero.



As células crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença do extrato Sm-R (50-400 µg/mL). Após 24 h as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Como apresentado na figura 40, não houve citotoxicidade do extrato Sm-R em células Vero, nas concentrações avaliadas (50 a 400 µg/mL), mantendo a viabilidade celular. Dentre as concentrações empregadas neste ensaio, encontram-se as concentrações utilizadas no ensaio esquistossomicida para o extrato Sm-R (25 a 200 µg/mL). Desta forma, o extrato Sm-R demonstrou atividade frente aos vermes adultos de *S. mansoni* sem alterar a viabilidade das células de mamíferos.

**Figura 41:** Viabilidade celular do extrato de Ac em células Vero.



As células crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença do extrato Ac (50-400 µg/mL). Após 24 h as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

Similarmente ao extrato Sm-R, o extrato Ac foi capaz de manter a viabilidade celular nas concentrações de 50-400 µg/mL. As concentrações ensaiadas para a avaliação equistossomicida foram citotóxicas apenas para os parasitos mantendo, assim, a viabilidade das células de mamíferos.

Logo, houve o prosseguimento dos ensaios esquistossomicidas e os resultados obtidos estão representados nas tabelas 17 e 18 para os extratos Sm-R e Ac, respectivamente.

**Tabela 17:** Efeito do extrato Sm-R frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>Praziquantel 10 µM</b>	24	100	0	100	0	100
<b>Sm-R 200 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0
	48	60	40	60	40	60
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Sm-R 100 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	50	50	50	0	50
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Sm-R 50 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	20	0	0	0
	120	30	70	30	70	30
<b>Sm-R 25 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes.

<sup>b</sup> DMSO em meio RPMI.

**Tabela 18:** Efeito do extrato Ac frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>Praziquantel 10 µM</b>	24	100	0	100	0	100
<b>Ac 200 µg/mL</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Ac 100 µg/mL</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Ac 50 µg/mL</b>	24	0	0	100	100	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Ac 25 µg/mL</b>	24	0	100	0	0	0
	48	0	0	100	100	0
	72	70	0	100	30	70
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Ac 10 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	40	0	0	0
	96	0	100	0	0	0
	120	0	0	100	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes.

<sup>b</sup> DMSO em meio RPMI.

Destaca-se que o grupo utilizado como controle negativo em todos os ensaios, RPMI e DMSO 0,5%, não apresentou quaisquer alterações motoras, tegumentares e morte dos parasitos.

Conforme os resultados apresentados na tabela 15, Sm-R foi capaz de promover, na concentração de 200 µg/mL, morte, redução na atividade motora e alterações tegumentares em 100% dos vermes após 72 h de incubação.

Já a concentração de 100 µg/mL, Sm-R foi capaz de provocar morte, redução na atividade motora e alterações tegumentares em 100% dos vermes somente após 96 h de incubação. Porém, os resultados nas concentrações de 25 e 50 µg/mL não foram considerados significativos devido ao longo período de incubação em que os vermes foram expostos ao extrato.

Quanto ao extrato de Ac (Tabela 16), este foi capaz de promover morte, redução da atividade motora e alterações tegumentares em 100% dos vermes adultos em apenas 24 h de incubação nas concentrações de 200 e 100 µg/mL com resultado equiparado ao controle positivo, PZQ (10 µM). Ainda, nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, a mortalidade e redução da atividade motora foram verificadas, respectivamente, após 48 h de incubação. Porém, na menor concentração avaliada, 10 µg/mL, a mortalidade dos parasitos não foi verificada.

O *S. mansoni* faz de seu sistema muscular uma relevante ferramenta para sua sobrevivência e desenvolvimento dentro do corpo do hospedeiro. Utiliza-o para fixação das ventosas às paredes das vênulas mesentéricas, além de estar intimamente relacionado ao acoplamento do casal permitindo, desta forma, a maturidade sexual da fêmea. Logo, o sistema muscular do *S. mansoni* é um possível alvo de fármacos esquistossomicidas, uma vez que qualquer perturbação na atividade motora pode interferir no ciclo normal de vida do parasito e contribuir para sua eliminação (EL-SHEHABI et al., 2012; DE SARAM et al., 2013; RIBEIRO e PATOCKA, 2013; PATOCKA et al., 2014).

Ainda, nota-se um maior efeito deletério frente aos vermes adultos de *S. mansoni* do extrato Ac quando comparado com o extrato Sm-R. Neste contexto, a potencial do extrato Ac pode estar relacionado como a propriedade curativa, ou seja, a capacidade de causar a mortalidade dos parasitos (DE OLIVEIRA et al., 2012).

A literatura destaca trabalhos que evidenciam o potencial esquistossomicida de espécies vegetais. Podemos destacar o trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa em que De CASTRO e colaboradores (2015), ao avaliarem a fração clorofórmica proveniente do extrato bruto das inflorescências de *Piper aduncum* (Piperaceae), observaram a mortalidade de 100% dos parasitos a 200 µg/mL no período de 24 horas de incubação. Em continuidade a este trabalho, isolou-se desta fração a chalcona identificada como cardamonina (25 µM), cuja expressiva atividade esquistossomicida também foi verificada.

Já o extrato diclorometânico das folhas de *Baccharis trimera* (Asteraceae)

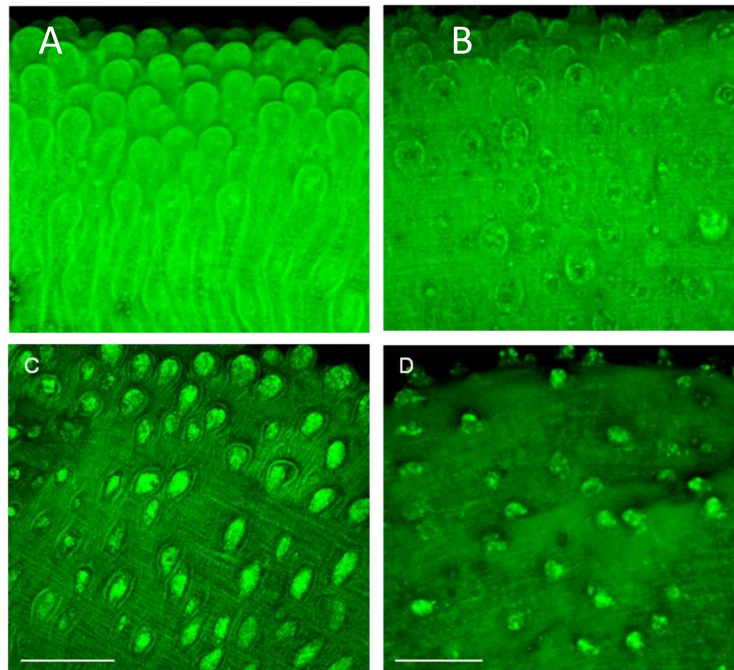
foi efetivo tanto em vermes adultos do *S. mansoni* quanto nas formas jovens, os esquistossômulos, *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, ocasionando, neste último ensaio maior redução do número de vermes nos animais tratados com o extrato (42,0%) quando comparado com o grupo tratado com PZQ (12,2%). Semelhantemente, os óleos essenciais de *B. trimera* (Asteraceae) e *B. dracunculifolia* (Asteraceae) também se mostraram eficazes ao serem avaliados frente aos vermes adultos com redução da motilidade, alterações tegumentares e morte dos parasitos (PARREIRA et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Ainda, o extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* foi capaz de promover, *in vitro*, a paralisia e a perda dos movimentos das ventosas, assim como o escurecimento do tegumento. Em continuidade, o estudo *in vivo* demonstrou significativa redução do granuloma equiparando-se aos resultados encontrados nos animais tratados com PZQ (FABRI et al., 2014). Já o extrato etanólico dos frutos de *Garcinia brasiliensis* foi capaz de promover a mortalidade de 100% dos parasitos adultos na concentração de 100 µg/mL dentro de 24 horas. Ainda, em concentrações superiores a 50 µg/mL o casal de *S. mansoni* permaneceu separado e não foi verificada a oviposição (CASTRO et al., 2015).

A fim de se realizar a análise mais pormenorizada do efeito dos extratos Sm-R (Figura 42) e Ac (Figura 43) sobre o tegumento de *S. mansoni*, os parasitos foram afixados em solução AFA e analisados em microscopia confocal de varredura a laser.

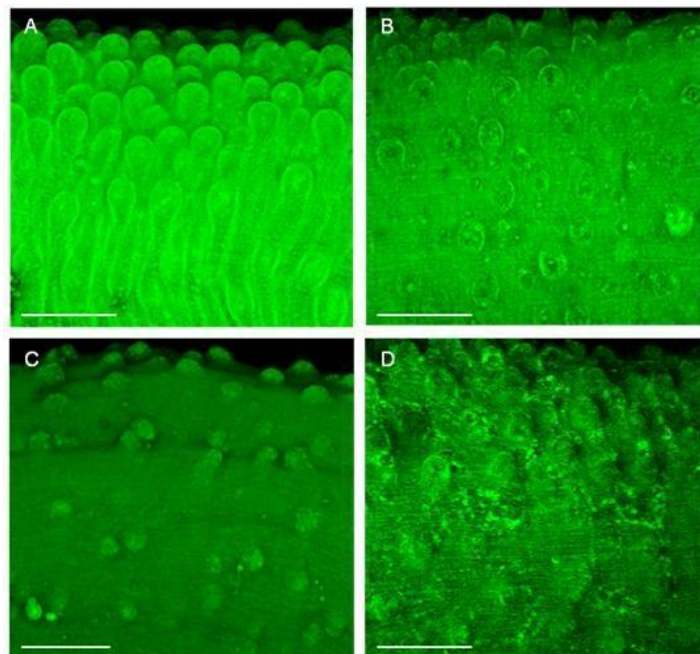


**Figura 42:** Alterações no tegumento de *S. mansoni* em presença do extrato Sm-R.



Imagens realizadas após 120 h de incubação ou ocorrência de morte dos parasitos. A: controle negativo: meio RPMI com 0,5% de DMSO; B: controle positivo - PZQ 2  $\mu$ M; C: Sm-R -100  $\mu$ g/mL; D: Sm-R - 200  $\mu$ g/mL. A-D: Imagens tridimensionais

**Figura 43:** Alterações no tegumento de *S. mansoni* em presença do extrato Ac.

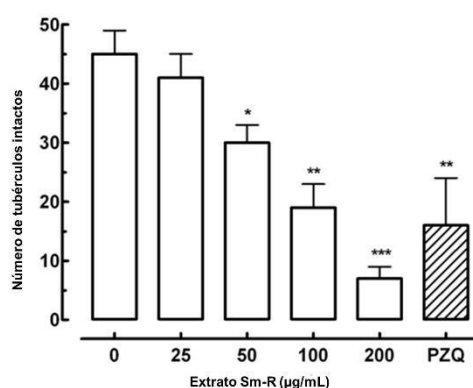


Imagens realizadas após 120 h de incubação ou ocorrência de morte dos parasitos. A: controle negativo: meio RPMI com 0,5% de DMSO; B: controle positivo - PZQ 2  $\mu$ M; C: Ac - 25  $\mu$ g/mL; D: Ac - 50  $\mu$ g/mL. A-D: Imagens tridimensionais.

A análise das imagens permite concluir que o extrato Sm-R é capaz de promover alterações tegumentares em ambas as concentrações analisadas, 100 µg/mL e 200 µg/mL. Em relação ao extrato Ac, consideráveis danos no tegumento foram verificados na concentração de 25 µg/mL e extensiva alteração tegumentar observada na concentração de 50 µg/mL. Vale ressaltar que no grupo controle negativo (RPMI 1640 com 0.5% DMSO) os tubérculos permaneceram intactos. Em contraste, no grupo controle positivo, (PZQ 10 µM) extensivos danos tegumentares foram observados.

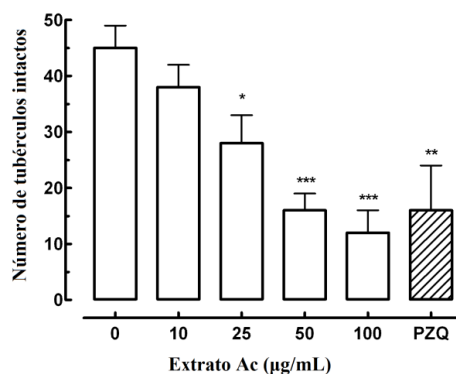
Complementando o estudo das alterações tegumentares, a análise morfológica quantitativa também foi realizada e os resultados estão expressos nas figuras 44 e 45 para os extratos de Sm-R e Ac, respectivamente.

**Figura 44:** Contagem do número de tubérculos intactos no tegumento de *S. mansoni* após exposição ao extrato Sm-R.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo o extrato bruto de *S. microglossa*. Após 120 h de incubação ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados em solução AFA e monitorados por microscopia confocal. O número de tubérculos intactos foi contado em pelo menos três áreas (20.000 µm<sup>2</sup>) da superfície dorsal dos helmintos machos utilizando o software LMS Imagens Browser (Zeiss). Os valores são média ± desvio padrão de dez vermes em experimentos realizados em triplicata. Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados \*( $P < 0,05$ ), \*\*( $P < 0,01$ ), \*\*\*( $P < 0,001$ ). PZQ – Praziquatel (2 µM).

**Figura 45:** Contagem do número de tubérculos intactos no tegumento de *S. mansoni* após exposição ao extrato Ac.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo o extrato bruto de *A. cymbifera*. Após 120 h de incubação ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados em solução AFA e monitorados por microscopia confocal. O número de tubérculos intactos foi contado em pelo menos três áreas ( $20.000 \mu\text{m}^2$ ) da superfície dorsal dos helmintos machos utilizando o software LMS Imagens Browser (Zeiss). Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de dez vermes em experimentos realizados em triplicata. Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados \*( $P < 0,05$ ), \*\*( $P < 0,01$ ), \*\*\*( $P < 0,001$ ). PZQ – Praziquatel (2  $\mu\text{M}$ ).

A análise quantitativa dos tubérculos de *S. mansoni* quando encubados com o extrato Sm-R mostrou-se significativa em relação ao controle negativo (tubérculos intactos) na maior concentração, 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,001$ ). Reduções significativas também foram verificadas nas concentrações 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,01$ ) e 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,05$ ). Já na menor concentração avaliada, não houve alterações significativas indicando que o extrato de Sm-R atue de forma concentração-dependente.

Através da análise dos resultados, pode-se verificar que o extrato Ac foi capaz de reduzir o número de tubérculos intactos também de forma dependente da concentração. Quando comparado ao grupo controle negativo, apenas incubado com meio de cultura, observa-se que a redução foi significativa para as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,001$ ), com maior efetividade que o PZQ. Já a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,05$ ) também se mostrou eficaz em reduzir o número de tubérculos intactos. Todavia, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  a redução verificada não se mostrou significativa em relação ao número de tubérculos intactos do controle negativo.

Neste âmbito, as alterações tegumentares produzidas por ambos os extratos podem estar diretamente relacionadas a morte dos parasitos, uma vez que as concentrações dos extratos em que a morte foi verificada são similares às que

promoveram as lesões no tegumento.

O tegumento é a superfície de interação entre o *S. mansoni* e o seu hospedeiro. Este participa de diferentes processos fisiológicos do parasito, a saber: nutrição, transdução de sinais, ormorregulação, entre outros. Ainda, trata-se de uma membrana que se encontra sob constante renovação e, por isso, acredita-se que esteja relacionada com evasão ao sistema imunológico. Pesquisadores acreditam que a evasão ao sistema imunológico relacionada ao tegumento esteja relacionada a minimização de proteínas na superfície do parasito, mascaramento antigênico com antígenos do hospedeiro, além da própria renovação tegumentar que ocorre no intervalo de horas (SEPULVEDA et al., 2010; GRENFELL et al., 2013; SOTILLO et al., 2015).

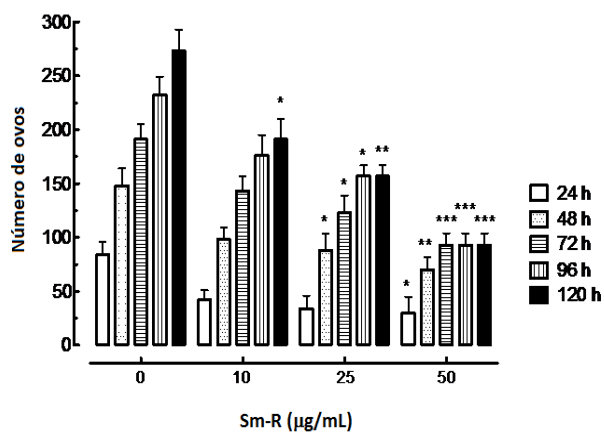
A superfície do tegumento do *S. mansoni* é rico em proteínas expostas, as quais têm sido extensivamente estudadas por serem possíveis alvos para o desenvolvimento de novas quimioterapias. Muitas destas proteínas também estão sendo relacionadas como necessárias à sobrevivência do parasito no hospedeiro. Estudos proteômicos identificaram proteínas constituintes do citoesqueleto, de membranas e algumas motoras. Proteínas imunoassociadas também foram identificadas, tais como lisozima e enolase as quais estão, provavelmente, relacionadas à interação parasita-hospedeiro. Nesse contexto, enzima ATP-difosfohidrolase que se supõe estar relacionada ao controle dos nucleotídeos de adenosina, responsáveis pela sinalização do processo de coagulação sanguínea ao redor do parasito e que contribuiria para sua eliminação do organismo do hospedeiro têm despertado o interesse da comunidade científica quanto ao seu potencial para alvo de novos fármacos (BHARDWAJ e SKELLY, 2009; HAN et al., 2009; ALEIXO DE CARVALHO et al., 2015).

Quanto aos estudos esquistossomicidas com extratos vegetais publicados na literatura, pode-se citar o extrato de *G. brasiliensis* que foi capaz de promover alterações tegumentares significativas pela exposição dos vermes adultos a concentrações a partir de 50 µg/mL do extrato etanólico (CASTRO et al., 2015).

No estudo *in vivo* realizado com o extrato aquoso de gengibre (*Zingiber officinale*), pronunciadas alterações tegumentares, entre elas perda dos espinhos presentes no tegumento, erosão e distorção morfológica da ventosa oral de alguns parasitos foram observadas. Ainda, observou-se que tais alterações foram mais representativas nos vermes machos como já havia sido destacado em outros estudos publicados na literatura (MOSTAFA et al., 2011).

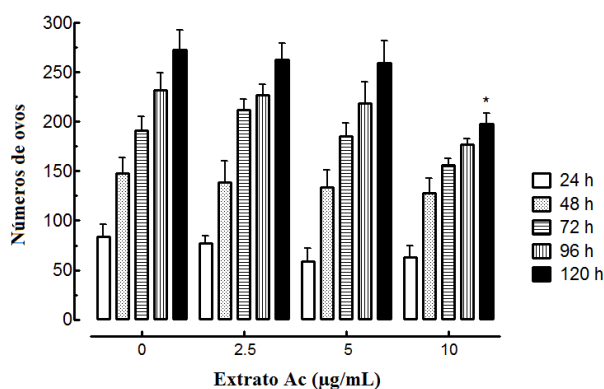
Além disso, a atividade esquistossomicida também pode ser avaliada por sua capacidade de suprimir a oviposição das fêmeas (DE OLIVEIRA et al., 2012). Desta forma, a avaliação quantitativa foi realizada na presença dos extratos de Sm-R (Figura 46) e Ac (Figura 47).

**Figura 46:** Efeito extrato Sm-R, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de *S. mansoni*.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo o extrato Sm-R. As contagens de ovos foram realizadas diariamente, durante 5 dias, antes da separação dos casais de vermes ou da ação helminticida. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de dez casais adultos acasalados em experimentos realizados em triplicata. Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados  $*(P<0,05)$ .

**Figura 47:** Efeito extrato Ac, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de *S. mansoni*.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo o extrato Ac. As contagens de ovos foram realizadas diariamente, durante 5 dias, antes da separação dos casais de vermes ou da ação helminticida. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de dez casais adultos acasalados em experimentos realizados em triplicata. Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados  $*(P<0,05)$ .

Ressalta-se, nessa análise, que as concentrações utilizadas na avaliação da oviposição correspondem às concentrações não letais: 10 a 50 µg/mL para o extrato Sm-R e 2.5 a 10 µg/mL para o extrato Ac permitindo, desta forma, a postura de ovos pela fêmea.

Como se observa na figura 45, a máxima oviposição foi observada na ausência do extrato Sm-R (0 µg/mL). À medida que houve a exposição das fêmeas ao extrato, observa-se a diminuição da postura de ovos de maneira concentração-dependente e do tempo de incubação. Quando se compara a maior concentração subletal com o grupo controle, encubado com meio de cultura, verifica-se redução maior que 50% na oviposição ( $P < 0,05$ ). Em relação ao extrato Ac (Figura 46), verifica-se que a redução da oviposição ocorreu apenas na concentração de 10 µg/mL após 120 h de incubação ( $P < 0,05$ ).

Salvo exceções nas quais os vermes adultos parasitam regiões do corpo humano que não compreendem o sistema portal-mesentérico, os ovos de *S. mansoni* podem ser encontrados nas fezes, intestino e fígado. A morbidade da doença é verificada pela reação imunológica do homem aos ovos culminando na formação do granuloma. A inflamação crônica granulomatosa está associada à resposta mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> juntamente com sua interação com macrófagos e citocinas. Entre as principais consequências da formação do granuloma estão a fibrose periportal e obstrução do fluxo sanguíneo para a veia portal intra-hepática culminando na hipertensão portal e hepatoesplenomegalia (MEEVISSSEN et al., 2012; HAGEN et al., 2014; GOBBI et al., 2015).

Estudos anteriormente publicados na literatura demonstram a capacidade de alguns fármacos em alterar o sistema reprodutor de machos e/ou fêmeas culminando, conseqüentemente, na redução da oviposição. A exemplo disto, a sinvastatina, comumente utilizada no tratamento da redução do colesterol, promoveu alterações morfológicas tanto no sistema reprodutor do macho quanto da fêmea de *S. mansoni* (ALENCAR et al., 2016). Semelhantemente, o estudo realizado por HULSTIJN e colaboradores (2003) comprovou o potencial da estreptozotocina, empregada na indução de diabetes experimental, em causar alterações nos ovários e lobos testiculares interferindo, assim, na oogênese e espermatogênese dos parasitos adultos.

Comparativamente ao extrato Ac, o extrato Sm-R mostrou maior potencial em diminuir a oviposição. Desta forma, pode-se correlacionar o extrato Sm-R a uma capacidade supressora, isto é, capaz de suprimir a oviposição. No entanto, não foram

realizados ensaios que comprovem as alterações morfológicas nos sistemas reprodutores dos vermes adultos de *S. mansoni* fazendo-os necessários para elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a supressão e se o mesmo promove danos irreversíveis aos órgãos reprodutores (DE OLIVEIRA et al., 2012).

Neste panorama, pesquisas realizadas com o extrato aquoso e metanólico das folhas de *Clerodendrum umbellatum* (Verbenaceae) evidenciaram o potencial esquistossomicida desta espécie vegetal com a oviposição, a qual foi reduzida significativamente. Os resultados obtidos apontaram redução dos ovos nas fezes em 75,49% e 97,72% em camundongos tratados com o extrato aquoso e metanólico, respectivamente, e 90,53% de redução foi verificada no fígado dos animais quando tratados com o extrato metanólico (JATSA et al., 2009; JATSA et al., 2015).

Além disso, o extrato etanólico das raízes de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) foi efetivo ao reduzir a produção de ovos *in vitro* após exposição das fêmeas às doses subletais. Porém, neste estudo, não houve consenso a respeito do possível mecanismo de ação do extrato, se o mesmo poderia interferir na fecundidade da fêmea ou se a diminuição da oviposição era decorrente de danos citotóxicos (SANDERSON et al., 2002).

Considerando a atividade *in vitro* do extrato Sm-R, as substâncias isoladas também foram submetidas ao ensaio esquistossomicida e os resultados podem ser visualizados na tabela 19.

**Tabela 19.** Efeitos das substâncias isoladas de Sm-R frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupo	Período de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>		Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>			
				Leve		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
<b>Controle<sup>b</sup></b>	24	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
<b>0.5% DMSO</b>	24	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
<b>Praziquantel 2 µM</b>	24	100	100	0	0	100	100
<b>Fração Sm-R III (α-amirina + bauerenol) 200 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
	96	0	0	100	100	0	0
<b>100 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
	96	0	0	100	100	0	0
<b>Espinasterol 200 µg/mL</b>	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
	96	0	0	100	100	0	0
<b>100 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
	96	0	0	100	100	0	0
<b>Sm-R IV 5 200 µg/mL</b>	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
	96	100	100	0	0	100	100
<b>100 µg/mL</b>	24	0	0	100	100	0	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
	96	100	100	0	0	100	100
<b>50 µg/ml</b>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	100	100	0
	72	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-
<b>25 µg/mL</b>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes. <sup>b</sup> DMSO em meio RPMI.



Conforme os resultados apresentados na tabela 19 é possível verificar que a subfração contendo a mistura de  $\alpha$ -amirina e bauerenol foi capaz de promover leve redução da atividade motora nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  após 48 de incubação. De forma semelhante, o espinasterol apenas promoveu leves alterações na redução da atividade motora na concentração de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  após 72 e 24 h, respectivamente.

Já a subfração Sm-R IV 5, em processo de identificação, foi mais ativo que os demais compostos testados. Após 48 h de incubação, em 100  $\mu\text{g/mL}$ , o composto foi capaz de promover a morte de 100% dos parasitos e, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , promoveu significativa redução da atividade motora e morte dos parasitos em 24 h de incubação.

A literatura assinala que pode haver diferenças na susceptibilidade aos compostos analisados em machos e fêmeas de *S. mansoni*. Como exemplo, machos são, frequentemente, mais susceptíveis a ação do PZQ em relação às fêmeas como já demonstrado em estudos de resistência. Da mesma forma, a benzofenona tetraprenilada, 7-epiclusianona mostrou-se mais potente também em machos adultos de *S. mansoni*. Em contrapartida, foi verificado que as fêmeas de *S. mansoni* são mais sensíveis ao arteméter que os vermes machos. Observa-se, porém, que os compostos analisados neste estudo não demonstraram seletividade em relação a machos e fêmeas sugerindo que o mecanismo de ação dos compostos possa ser semelhante para ambos (DE OLIVEIRA et al., 2014; CASTRO et al., 2015).

Ainda, diante da atividade esquistossomicida do extrato Ac, as substâncias provenientes dos processos cromatográficos do extrato também tiveram seus potenciais avaliados frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Assim, os resultados verificados tanto para o ácido populifólico quanto para a cubebina estão demonstrados na tabela 20. Vale lembrar que o grupo controle negativo, composto por meio RPMI e DMSO 0,5%, não apresentou quaisquer alterações e morte dos parasitos.

**Tabela 20:** Efeitos do ácido populifólico e cubebina frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>Controle</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
<b>Praziquantel 10 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Ácido populifólico 100 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	80	0	80	0
	96	0	100	0	100	0
	120	0	100	0	100	0
<b>Cubebina 100 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	20	0	0	0
	96	50	0	100	50	50
	120	80	0	100	20	80

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes;

<sup>b</sup> Meio RPMI;

<sup>c</sup> DMSO em meio RPMI.

O ácido populifólico não foi capaz de provocar a morte dos parasitos na concentração avaliada, 100 µM. Entretanto, leve redução na atividade motora, assim como alterações tegumentares foram observadas apenas 72 h depois da incubação dos parasitos com os compostos. Em relação à cubebina, esta se demonstrou capaz de promover redução da atividade motora e alterações tegumentares significativas a partir de 96 h de incubação.

A literatura já destacou diterpenos com atividade esquistossomicida comprovadas. Como exemplo, o ácido pimaradienoico, isolado da *Viguiera arenaria* (Asteraceae), demonstrou atividade esquistossomicida tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PORTO et al., 2012). EDWARDS e colaboradores (2015) descreveram a atividade antihelmíntica do diterpeno 7-ceto-sempervirol, isolado de *Lycium chinense*

(Solanaceae), frente às formas jovens e vermes adultos de *S. mansoni* e *Fasciola hepática*.

Em contraste com os resultados apresentados na literatura, a cubebina não demonstrou atividade esquistossomicida *in vitro* como o observado com a (-)-O-metilcubebina, derivado semi-sintético da cubebina, apresentou expressiva atividade *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al., 2008).

Apesar dos extratos Sm-R e Ac terem sido ativos frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, as substâncias isoladas não se mostraram ativas, excetuando-se a substância Sm-R IV 5. Diante do exposto a continuidade do estudo deve realizada no intuito de identificar a(s) substância (s) presente nos extratos responsável pela atividade esquistossomicida, bem como os prováveis mecanismos de ação dos extratos e substâncias isoladas.

## 5.0 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das raízes de *S. microglossa* resultou na identificação dos triterpenos bauerenol e  $\alpha$ -amirina, além do isolamento e identificação do esteroide espinasterol. Dentre os metabólitos isolados, o presente estudo relata pela primeira vez a presença de bauerenol,  $\alpha$ -amirina nas raízes nesta espécie. Já o extrato das raízes de *A. cymbifera* culminou no isolamento e identificação do diterpeno ácido populifólico e da lignana cubebina, ambos já isolados e identificados nas raízes da espécie.

O extrato bruto de *S. microglossa* mostrou-se moderadamente ativo frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, porém os resultados mais expressivos relacionam-se à capacidade de suprimir a oviposição das fêmeas.

Em relação à atividade esquistossomicida *in vitro* das substâncias isoladas das raízes de *S. microglossa*, a subfração Sm-R IV 5 mostrou-se ativa, ao passo que a mistura contendo  $\alpha$ -amirina e bauerenol, bem como o esteroide espinasterol demonstraram-se pouco ativos.

Já o extrato bruto de *A. cymbifera*, por sua vez, apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* demonstrando capacidade de causar a mortalidade dos vermes nas primeiras horas de incubação. Todavia, as substâncias isoladas do extrato, cubebina e o ácido populifólico, não demonstraram atividade esquistossomicida.

Por fim, considerando a atividade esquistossomicida dos extratos avaliados, faz-se necessário a continuidade dos estudos para o isolamento e identificação das substâncias ativas e verificação dos prováveis mecanismos de ação pelos quais atuam.

## 6.0 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. P. et al. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil from the flowers of *Bidens sulphurea* (Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 10, p. 920-924, 2013.
- ALENCAR, A. C. M. D. B. et al. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult *Schistosoma mansoni* in hypercholesterolemic mice. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 115-123, 2016.
- ALBERTO-SILVA, A. C. et al. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 68-74, 2015.
- ALERICO, G.C et al. Proliferative effects of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.176, p. 305-310, 2015.
- ALEIXO DE CARVALHO, L. S. et al. Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae). **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 207-14, 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, 2012.
- ALMEIDA, M. L. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1078-1082, 2016.
- ALVIANO, W. S. et al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 6, p. 545-52, 2008.
- APÁTI, P. et al. *In-vitro* effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 251-256, 2006.
- BANERJEE, P. et al. Super Natural II-a database of natural products. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 935-939, 2015.
- BARBOSA DE CASTRO,C.C., DIAS,M.M., PESSOADEREZENDE,T., MAGALHÃES,L.G., DASILVAFILHO,A.A.,2013. Natural products with activity against *Schistosoma* species. In:Rai,M.K.,Kon,K.V.(Eds.), Fighting Multidrug Resistance with HerbalExtracts, Essential Oils and their Components. AcademicPress, SanDiego, pp.109–134 (Chap-ter8).
- BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 604-615, 2015.
- BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 6, p. 256-260, 2009.

- BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- BORGES, F. R. M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 144-150, 2014.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 141-148, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde/SVS. DATASUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação- Sinan Net**. 2015. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/esquisto/bases/esquistobrnet.d> ef. Acesso em: 17 set. 2015
- BUCCIARELLI, A. et al. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1025-1030, 2010.
- CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Advances**, v. 4, n. 7, p. 3131-3144, 2014.
- CARRARA, V. S. et al. *In vitro* schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 3, p. 321-326, 2014.
- CARVALHO, G. B. F. D. et al. Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. **Experimental Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 24-32, 2014.
- CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, 2015.
- CATARINO, H. R. C. et al. InGaP 670-nm laser therapy combined with a hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen in burn injuries. **Lasers in Medical Science**, 2015.
- CHATURVEDULA, et al. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase  $\beta$ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.6271-6275, 2004.
- CHOWANSKI, S. et al. A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. **Toxins**, v. 60, n. 8, p. 2-28, 2016,
- CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.

- CRUZ, A. H.; MENDONCA, R. Z.; PETRICEVICH, V. L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. **Mediators of inflammation**, v. 2005, n. 6, p. 349-59, 2005.
- CSUPOR-LÖFFLER, B. et al. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 8, p. 1109-1115, 2009.
- CSUPOR-LÖFFLER, B. et al. Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*. **Planta Medica**, v. 77, n. 11, p. 1183-1188, 2011.
- DA SILVA, A. G. et al. Evaluation of an extract of Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 2, p. 283-287, 2010.
- DA SILVA, A. G. et al. A clinical trial with Brazilian Arnica (*Solidago chilensis* Meyen) glycolic extract in the treatment of tendonitis of flexor and extensor tendons of wrist and hand. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 6, p. 864-869, 2015.
- DE BARROS, M. et al. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 4, p. 403-417, 2016.
- DE BARROS MACHADO, T. et al. Brazilian phytopharmaceuticals evaluation against hospital bacteria. **Phytotherapy research**, v. 19, n. 6, p. 519-25, 2005.
- DE CASTRO, C. C. B. et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-928, 2015.
- DEJANI, N. N. et al. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x piperita* L. **Immunobiology**, v. 219, n. 8, p. 627-632, 2014.
- DE OLIVEIRA, C.B. et al. The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. **Molecules**, v. 18, p. 11022-11032, 2013.
- DE OLIVEIRA, R. N. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 135-143, 2012.
- DE OLIVEIRA, R. N. 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.
- DE MORAES, J. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012.
- DE MORAES, J. et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 112, n. 2, p. 603-10, 2013.

DE MORAES, J. et al. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. 2617, 2014

DE MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 6, p. 801-20, 2015.

DE PASCOLI, I. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 735-742, 2006.

DESAI, D. C. et al. Isolation, structural elucidation and anti-inflammatory activity of astragalín, (-)hinokínin, aristolactam and aristolochic acids (I & II) from *Aristolochia indica*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 17, p. 1413-1417, 2014.

DHOUIOUI, M. et al. Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 301-306, 2016.

DINIZ, P. P. et al. Two SmDLC antigens as potential vaccines against schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 140, p. 193-201, 2014.

DO NASCIMENTO, D. S.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. The family Aristolochiaceae Juss. In Parana state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 414-422, 2010.

DOS SANTOS, A. F. et al. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology research**, v. 113, p. 1077-1084, 2014.

DONG, Y. et al. Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 8, p. 2481-2484, 2010.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DUAN, W. W. et al. Praziquantel derivatives exhibit activity against both juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 4, p. 1587-1590, 2012.

DUVAL, D. et al. A Novel Bacterial Pathogen of *Biomphalaria glabrata*: A Potential Weapon for Schistosomiasis Control? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015.

EBAJO, V. D.; SHEN, C. C.; RAGASA, C. Y. Terpenoids and sterols from *Hoya multiflora* Blume. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 4, p. 33-39, 2015.

EDWARDS, J. et al. The Diterpenoid 7-Keto-Sempervirol, Derived from *Lycium chinense*, Displays Anthelmintic Activity against both *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.



- EL-SHEHABI, F. et al. A novel g protein-coupled receptor of *Schistosoma mansoni* (smgpr-3) is activated by dopamine and is widely expressed in the nervous system. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- ESPERADIM, V.R. et al. Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones. **Parasitology Research**, v. 107, p. 525-530, 2010.
- ESPERANDIM, V. R. et al. Evaluation of the *in vivo* therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-hinokinin against *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 4, p. 442-6, 2013.
- FABRI, R. L. 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.
- FERNANDES, C. P. et al. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard, sapotaceae. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- FINGOLO, C. E. et al. Triterpene esters: Natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4247-4256, 2013.
- FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, S. C.; ALVES, C. C. Eliminating schistosomes through vaccination: What are the best immune weapons? **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAR, 2015.
- FREITAS, C. S. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 4, p. 285-292, 2009.
- GASTALDO, B.C. Ação dos constituintes de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013.
- GARCIA, F.A.O. et al. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellularcalcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v.21, p. 1021-1025, 2014.
- GOBBI, F. et al. *Schistosoma mansoni* eggs in spleen and lungs, mimicking other diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1-6, 2015.
- GODINHO, L. S. 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.
- GONÇALVES DE ASSIS, N. R. et al. DNA vaccine encoding the chimeric form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 confers partial protection against challenge infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

- GOULART, S. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 346-353, 2007.
- GOWLAND, M. H.; WALKER, M. J. Food allergy, a summary of eight cases in the UK criminal and civil courts: Effective last resort for vulnerable consumers? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 10, p. 1979-1990, 2015.
- GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243-265, 2014.
- GUIMARÃES, M. 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, 2015.
- GRENFELL, R. et al. The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 75-78, 2013.
- HAGEN, J. et al. Omega-1 knockdown in *Schistosoma mansoni* eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size *in vivo*. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- HAN, Z. Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **Functional Genomics Analysis of Schistosomes**, v. 10, p. 211-240, 2009.
- HAREL, D. et al. Natural Product Derived Antiprotozoal Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–Activity Relationships of Novel Chromene and Chromane Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.56, p.7442-7448, 2013.
- HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and alkamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9462-9472, 2010.
- HOSSAIN, M. K. et al. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 2-32, 2016.
- HOTEZ, P. J. et al. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.
- HOUWELING, T. A. J. et al. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2016.
- HUANG, Y. et al. Chemical constituents from *Solidago canadensis* with hypolipidemic effects in HFD-fed hamsters. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 4, p. 319-324, 2013.
- HULSTIJN, M. et al. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. **Parasitology**, v. 126, n. 1, p. 53-61, 2003.

- JANSON, E. M. et al. Same host-plant, different sterols: Variation in sterol metabolism in an insect herbivore community. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 11, p. 1309-1319, 2009.
- JATSA, H. B. et al. Evaluation of the in vivo activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* Poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 3, p. 216-221, 2009.
- JATSA, H. B. et al. Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.
- JEFFREYS, M. F.; NUNEZ, C. V. Triterpenes of leaves from *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 2, p. 189-194, 2016.
- JEMMALI, Z. et al. Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts. **Talanta**, v. 147, p. 35-43, 2016.
- JEONG, G. S. et al. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1587-1594, 2010.
- JIN, H. et al. A new kaempferol trioside from *Solidago altissima* L. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 3, p. 351-354, 2007.
- JOLAD, S. D. et al. Wrightol, a sesquiterpene of the eremophilane type from *Solidago wrightii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3229-3231, 1989.
- KASINATHAN, R. S.; GREENBERG, R. M. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 2-6, 2012.
- KENNY, O. et al. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, v. 161, p. 79-86, 2014.
- KLEIN-JÚNIOR, L. C. et al. Antihyperalgesic Activity of the Methanol Extract and Some Constituents Obtained From *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 111, n. 3, p. 145-153, 2012.
- KLEIN JR, L. C. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire (Polygalaceae). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 381, n. 2, p. 121-126, 2010.
- KOJIMA, H., SATO, N., HATANO, A., OGURA, H. Sterol glucides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 2351-2355, 1990.
- KRASTEVA, I. N. et al. Phytochemical study of *Gypsophila trichotoma* wend. (Caryophyllaceae). **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1125-1126, 2008.

- KRASTEVA, I. et al. Phytochemical study of leaves and roots of *Gypsophila trichotoma* Wend. using gas chromatography - Mass spectrometry. **Pharmacia**, v. 56, n. 1-4, p. 3-6, 2009.
- KUNZ, W. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 5, p. 227-231, 2001.
- LAMBERTON, P. H. L. et al. Sensitivity and Specificity of Multiple Kato-Katz Thick Smears and a Circulating Cathodic Antigen Test for *Schistosoma mansoni* Diagnosis Pre- and Post-repeated-Praziquantel Treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.
- LAMBERTUCCI, J. R. et al. An outbreak of acute *Schistosoma mansoni* schistosomiasis in a nonendemic area of Brazil: A report on 50 cases, including 5 with severe clinical manifestations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 1, p. e1-e6, 2013.
- LAURENÇON, L. et al. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea* alpestris with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. **Phytochemistry**, v. 86, p. 103-111, 2013.
- LEE, S. et al. Identification of plant compounds that disrupt the insect juvenile hormone receptor complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 6, p. 1733-1738, 2015.
- LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C.; GALEFFI, C. Epi-populifolic acid from *Aristolochia cymbifera*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3277-3279, 1992.
- LEITNER, P. et al. Production of a concentrated natural dye from Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis*) extracts. **Dyes and Pigments**, v. 93, p. 1416-1421, 2012.
- LENK, E. J. et al. Productivity Loss Related to Neglected Tropical Diseases Eligible for Preventive Chemotherapy: A Systematic Literature Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.
- LE QUESNE, P. W. et al. Oxidized kaurene derivatives from leaves of *Solidago missouriensis* and *S. Rigida*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1785-1787, 1985.
- LIZ, R. et al. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 515-521, 2008.
- LOPES, L. M. X.; BOLZANI, V. D. S. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2265-2268, 1988.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª edição. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008.
- LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 163-170, 2002.
- MANTOVANI, A. L. L. et al. Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 6, p. 877-884, 2013.

- MARCOTULLIO, M. C.; PELOSI, A.; CURINI, M. Hinokinin, an emerging bioactive lignan. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14862-14878, 2014.
- MARTINS, N. et al. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v.170, p. 378-385, 2015.
- MATOS-ROCHA, T. J. et al. In vitro evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, n. 14, p. 1307-1312, 2013.
- MEEVISSSEN, M. H. J.; YAZDANBAKHS, M.; HOKKE, C. H. *Schistosoma mansoni* egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: Molecular partners that shape immune responses. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 14-21, 2012.
- MELO, A.; COELHO, P. *Schistosoma mansoni*. In Parasitologia Humana; 1 ed.; Atheneu: São Paulo, 2005.
- MELO, A.M. et al. *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/IkB pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology and Medicine**, v.236, p. 1147–1155, 2011.
- MEOTTI, F. C. et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2- pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 107-112, 2006.
- MESSIANO, G.B. Terpenos e lignanas de Aristolochiaceae. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.
- MIRANDA, M. A. et al. Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 396-402, 2013.
- MOREIRA, F. D. L. et al. A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryns by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 14-19, 2013.
- MOREL, A. F. et al. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 453-455, 2006.
- MORGAN, J. A. T. et al. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: Past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, n. SUPPL., p. S211-S228, 2001.
- MOSTAFA, O. M. S.; EID, R. A.; ADLY, M. A. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 395-403, 2011.
- NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. 2,3-dihydrobenzofuran neolignans from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 345-350, 1999.
- NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: Epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

- NDJONKA, D. 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.
- NDLOVU, H.; BROMBACHER, F. Role of IL-4R $\alpha$  during acute schistosomiasis in mice. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 9, p. 421-427, 2014.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- NEVES, B. J.; ANDRADE, C. H.; CRAVO, P. V. L. Natural products as leads in schistosome drug discovery. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1872-1903, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NWODO, N. J. et al. Anti-trypanosomal activity of Nigerian plants and their constituents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7750-7771, 2015.
- OKANO, A. et al. Identification of bauerenol in *Solidago altissima*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 750-751, 1983.
- OLORUNNISOLA, O. S. et al. An inventory of plants commonly used in the treatment of some disease conditions in Ogbomoso, South West, Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.161, p. 60-68, 2015.
- PACHECO, A. G. et al. C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1245-1262, 2009.
- PACHECO, A. G.: Estudo Químico de Constituintes das Cascas do Caule de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae), Empregando Métodos Espectroscópicos e Teóricos., Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- PANAT, N. A. et al. Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. **Food Chemistry**, v. 194, p. 32-45, 2016.
- PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.
- PATTANAIK, B.; LINDBERG, P. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. **Life**, v. 5, n. 1, p. 269-293, 2015.
- PATOCKA, N. et al. Serotonin Signaling in *Schistosoma mansoni*: A Serotonin-Activated G Protein-Coupled Receptor Controls Parasite Movement. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.
- PAVIA, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia. LEARNING, C., Ed., 2010.

- PEREIRA, A. C. et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v. 72, n. 11-12, p. 1424-1430, 2011.
- PEREIRA, A. C. et al. In vitro and in vivo anthelmintic activity of (-)-6,6'-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 149, p. 195-201, 2015.
- PORTO, T. S. et al. Fungal transformation and schistosomicidal effects of pimaradienoic acid. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 8, p. 1465-1474, 2012.
- RADUSIENE, J. et al. Assessment of phenolic compound accumulation in two widespread goldenrods. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 158-166, 2015.
- RAGA, D. D. et al. Triterpenes from *Ardisia elliptica* (Subgenus Tinus) Limit Vascular Density and Promote von Willebrand Factor Expression on Duck Chorioallantoic Membrane. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 1, p. 24-29, 2015.
- RAGASA, C. Y. et al. Chemical constituents of *Cinnamomum cebuense*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 3, p. 264-268, 2013.
- RAMALHETE, C. et al. In vitro schistosomicidal activity of balsaminol F and karavilagenin C. **Planta Medica**, v. 78, n. 18, p. 1912-1917, 2012.
- RANJBAR, M. M. et al. Virtual dual inhibition of COX-2/5-LOX enzymes based on binding properties of Alpha-amyrins, the anti-inflammatory compound as a promising anti-cancer drug. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 238-245, 2016.
- REZENDE, A.A.A. et al. A comparative study of the modulatory effects of -cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p. 645-652, 2013.
- RIAD, N. H. A.; TAHA, H. A.; MAHMOUD, Y. I. Effects of garlic on *Schistosoma mansoni* harbored in albino mice: Molecular characterization of the host and parasite. **Gene**, v. 518, n. 2, p. 287-291, 2013.
- RIBAS, C. M. et al. Antinociceptive effect of the Polygala sabulosa hydroalcoholic extract in mice: Evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2008.
- RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522-1533, 2014.
- RIBEIRO, P.; PATOCKA, N. Neurotransmitter transporters in schistosomes: Structure, function and prospects for drug discovery. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 629-638, 2013.
- RICHTER, J. et al. Severe liver fibrosis caused by *Schistosoma mansoni*: Management and treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 731-737, 2015.

- ROCHA-FILHO, C. A. A. et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 132, p. 188-192, 2015.
- RODRÍGUEZ, J. A. et al. Gastroprotective activity of a new semi-synthetic solidagenone derivative in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 265-271, 2005.
- RODRIGUES, I. V. et al. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 1, p. 6-12, 2013.
- RODRÍGUEZ, J. A. et al. Gastroprotective activity of solidagenone on experimentally-induced gastric lesions in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. 399-404, 2002.
- RODRÍGUEZ, J. A. et al. Gastroprotective and ulcer-healing effect of new solidagenone derivatives in human cell cultures. **Life Sciences**, v. 77, n. 17, p. 2193-2205, 2005.
- ROMAN, W. A. et al. Hypolipidemic effects of *Solidago chilensis* hydroalcoholic extract and its major isolated constituent quercetrin in cholesterol-fed rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1488-1495, 2015.
- SABIR, S. M. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 741-747, 2012.
- SANDERSON, L.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P. J. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**, v. 76, n. 3, p. 241-247, 2002.
- SANG, Z. C. et al. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 49-54, 2005.
- SARAIVA, J. et al. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 791-795, 2007.
- SARTORELLI, P. et al. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. **Planta Medica**, v. 76, n. 13, p. 1454-1456, 2010.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 111-115, 2002.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and in vitro regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 60, n. 1-2, p. 5-10, 2005.
- SCHRAMM, G.; HAAS, H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 12-13, p. 881-888, 2010.



- SCOTTI, M. T. et al. Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the *Asteraceae* family. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4684-4702, 2012.
- SEPULVEDA, J. et al. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 12, p. 1407-1417, 2010.
- SHI, L. et al. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p. 439-446, 2004.
- SILVA, M. L. A. et al. Process to obtain synthetic and semi-synthetic lignan derivatives, their antiparasitic activities and corresponding pharmaceutical formulations, including the therapeutic method using said lignan for the treatment of parasitosis. Google Patents, 2008.
- SILVA-MORAES, V. et al. Biomarkers for schistosomiasis: Towards an integrative view of the search for an effective diagnosis. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 75-79, 2014.
- SILVA, M. P. N. et al. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793-3803, 2014.
- SOTILLO, J. et al. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 8, p. 505-516, 2015.
- STARKS, C. M. et al. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 104-109, 2010.
- SÜLSEN, V. P. et al. Natural Terpenoids from *Ambrosia* Species Are Active *In Vitro* and *In Vivo* against Human Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013.
- SUNG, J. H. et al. Cytotoxic constituents from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* MIQ. **Archives of Pharmacal Research**, v. 22, n. 6, p. 633-637, 1999.
- TAMURA, E. K. et al. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 478-485, 2009.
- THAO, N. P. et al. Anti-Protozoal Activities of Cembrane-Type Diterpenes from Vietnamese Soft Corals. **Molecules**, v.20, p. 12459-12468, 2015.
- TIANSHENG, L. et al. Diterpenes from *Solidago rugosa*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 451-456, 1995.
- TORI, M.; KATTO, A.; SONO, M. Nine new clerodane diterpenoids from rhizomes of *Solidago altissima*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 487-493, 1999.
- TOWLER, M. J.; WEATHERS, P. J. Variations in key artemisinin and other metabolites throughout plant development in *Artemisia annua* L. for potential therapeutic use. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 185-191, 2015.

- TREVISAN, G. et al. Identification of the plant steroid  $\alpha$ -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 2, p. 258-269, 2012.
- VANMIERLO, T. et al. Plant sterols: Friend or foe in CNS disorders? **Progress in Lipid Research**, v. 58, p. 26-39, 2015.
- VERAS, L. M. et al. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 2051-2058, 2012.
- VERDI, L.G. et al. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 85-94, 2005.
- WINK, M.; Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v.2, p.251-286, 2015.
- WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: The detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.
- WU, B. et al. New flavonoid glycosides from the leaves of *Solidago altissima*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 815-816, 2007.
- YOUSEFBEYK, F. et al. Bioactive Terpenoids and Flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *hyrcanicus* Rech.f, an Endemic Species of Iran. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n.22, p.1-6, 2014.
- ZHANG, X. G. et al. A review of dihydroartemisinin as another gift from traditional Chinese medicine not only for malaria control but also for schistosomiasis control. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1769-1773, 2014.
- ZIAEI, A. et al. Inhibitory effects of teuclatriol, a sesquiterpene from *Salvia mirzayanii*, on nuclear factor- $\kappa$ B activation and expression of inflammatory mediators. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 94-100, 2015.