

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

MIRNA MEANA DIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro*  
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO E METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DOS FRUTOS DA *Arctium lappa* L.  
(Asteraceae).

JUIZ DE FORA, MG

2013

MIRNA MEANA DIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* DO EXTRATO BRUTO E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS FRUTOS DA *Arctium lappa* L. (Asteraceae).

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

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

JUIZ DE FORA

2013

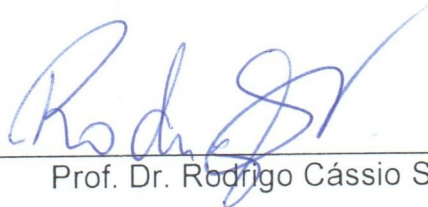
**Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e metabólitos secundários dos frutos da *Arctium lappa* L. (Asteraceae).**

**Mirna Meana Dias**

**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.

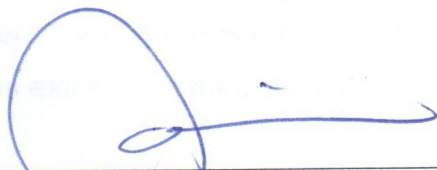
Aprovada em 30 / 07 /2013



Prof. Dr. Rodrigo Cássio Sola Veneziani



Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

“Desistir...

Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.  
É que tem mais chão nos meus olhos, do que cansaço nas minhas pernas;  
Mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros;  
Mais estrada no meu coração, do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

## DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho ao meu pai, meu herói, *Francisco* que pelo modo como me educou: na bondade, dignidade e honestidade, me fez chegar até aqui. Ao senhor, Pai, que sempre lutou, desejou e esperou que todos os meus sonhos se concretizassem sintam-se realizado junto comigo. Minha eterna saudade...

A minha querida mãe, *Aparecida*, pelo seu amor, por viver a minha vida, nas minhas constantes ausências. Nunca seria capaz de agradecer somente com palavras.

Ao meu marido *Rodrigo*, que com seu amor nunca desistiu do meu sonho e não mediu esforços para concretizá-lo, sem seu companheirismo em todos os momentos nada seria possível.

À minha filha, tão amada, *Sofia*, razão da minha vida que sempre aceitou com paciência e compreensão meu tempo tão reduzido para um amor tão grande.

Ao meu irmão *Fabricio*, pelo incentivo e amizade de sempre.

A QUEM COM MUITO AMOR DEDICO.....

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por fazer o impossível acontecer todos os dias em minha vida.

A toda minha família, tios (as), primos (as) que sempre me incentivaram. Em especial, a tia Hilda, que foi sempre presente comigo, pelo apoio desde o começo e principalmente no final desta caminhada. E a Madrinha Marlene que, mesmo na fragilidade da sua condição de vida, ainda conseguiu saber e se alegrar com a notícia da minha aprovação para este curso.

Aos meus avós, particularmente ao vovô Carlos Meana que sempre apostou em mim.

Ao Sérgio Sefair e Katarina Nascimento pela confiança depositada em nossa família que viabilizou a conclusão deste sonho.

Ao Prof. Ademar Alves da Silva Filho pelos ensinamentos, oportunidades e confiança que deposita em seus alunos.

Aos companheiros e amigos do NIPPAN: nas pessoas de Lara Soares e Túlio Pessoa, pela ajuda e convivência durante esse período e a aluna de iniciação científica, Polyana Zaquine pela colaboração na etapa inicial deste trabalho.

A Faculdade de Farmácia da UFJF, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências, na pessoa de seus coordenadores: Prof. Dr. Orlando de Vieira de Sousa e Profa. Dra. Maria Silvana Alves.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos grandes ensinamentos passados.

Ao laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, pelo suporte constante oferecido na realização deste trabalho. A funcionária técnico-administrativa Celinha, pela paciência de sempre e a Profa. Fabíola Dutra Dias pela confiança desde o início dos trabalhos. Meu carinho e admiração a Profa. Dra. Magda Narciso Leite que sempre me incentivou, agradeço a oportunidade de aprender e conviver mais uma vez com você.

Aos colaboradores na realização dos ensaios esquistossomicidas: Dr. Josué de Moraes (Instituto Adolfo Lutz) e Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto (Instituto de Ciências Biológicas/UFJF).

Ao Departamento de Química da UFJF, pelas análises de RMN realizadas.

Aos companheiros da segunda turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF pelo compartilhamento de sabedorias e experiências. Especialmente aos amigos: Clarissa Campos, Antônio V. Doriguetto, Kamilla Coelho, Paulo Henrique Dias e Renan Salgado por tornarem mais suave esta caminhada. Agradeço também a ajuda do amigo Leonardo Sousa, doutorando em Fitotecnia/UFV, na identificação do material vegetal.

Aos amigos de uma vida inteira que me sustentaram com seus sorrisos, muito obrigada.

À FAPEMIG pelos recursos financeiros fornecidos para a execução deste projeto.

Ao Programa de Monitoria da UFJF pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser completada.

**“Agradeço a meu Deus toda vez que me lembro de vocês.”**

(2 Coríntios 8:16)

## RESUMO

DIAS, M. M. **Avaliação da Atividade Esquistossomicida *in vitro* do Extrato Bruto e Metabólitos Secundários dos Frutos de *Arctium lappa* L. (Asteraceae).** 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2013.

A esquistossomíase, causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, é uma doença que afeta cerca de 240 milhões de pessoas no mundo. O Praziquantel é o fármaco de escolha para o tratamento desta parasitose e, devido principalmente aos casos de resistência do parasito a esta medicamento, se faz necessária a busca de novas moléculas e/ou protótipos com potencial atividade esquistossomicida. Neste contexto, a pesquisa com produtos naturais desponta como uma alternativa para o descobrimento de novos fármacos para o tratamento da esquistossomíase. Entre as espécies vegetais de interesse para a produção de substâncias esquistossomicidas, destaca-se a *Arctium lappa* L. (Asteraceae), a qual é reconhecida por biossintetizar lignóides, classe de metabólitos que tem demonstrado grande potencial esquistossomicida. O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato hidroalcoólico dos frutos de *A. lappa*, bem como a avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*, frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, do extrato e de seus metabólitos majoritários. O estudo fitoquímico de *A. lappa* L. resultou no isolamento de duas lignanas dibenzilbutirolactônicas, a arctiina e arctigenina. A análise dos resultados de avaliação esquistossomicida obtidos demonstrou que o extrato hidroalcoólico bruto na concentração de 200 mg/mL apresentou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro*, sendo capaz de provocar a morte de 100% dos parasitos em até 24 horas de incubação. A arctiina, metabólito majoritário purificado do extrato, foi capaz de matar e provocar lesões tegumentares em 100% dos vermes adultos. Os resultados obtidos sugerem que a atividade esquistossomicida *in vitro* demonstrada pelo extrato hidroalcoólico pode estar relacionada à presença da arctiina, corroborando com o potencial esquistossomicida *in vitro* das lignanas dibenzilbutirolactônicas, frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; *Arctium lappa* L.; lignanas; arctiina; arctigenina.



## ABSTRACT

DIAS, M. M. **Schistosomicidal Activity Evaluation *in vitro* of the crude extract and Secondary Metabolites of the *Arctium lappa* L. (Asteraceae) fruit** 2013. 108 p. Master Thesis (Master in Pharmaceutical Sciences) – Pharmacy College, Juiz de Fora Federal University, Juiz de Fora, MG, 2013.

Schistosomiasis caused by the *Schistosoma parasite* is a disease that affects about 240 million people around the world. Praziquantel is the chosen drug for the treatment of this parasitosis. It is imperative to search for new molecules and / or prototypes with potential schistosomicidal activity. This requirement is due to the tough performance of the parasite against this medicine. In this context, the research with natural products has been recognized as an alternative to discover new pharmacos for *Schistosoma* treatment. *Arctium lappa* L. (Asteraceae) stands out among vegetal plants of interest for the production of schistosomicidal substances. This is recognized for being able to biosynthesize lignoid, a kind of metabolite that has performed great schistosomicidal potential. This master thesis describes the phytochemical study of the hydroalcoholic extract from *A. lappa* L. fruit, as well the evaluation of the schistosomicidal activity evaluation *in vitro*, facing the adult worms of *S. mansoni* from the extract and from its majority metabolite.

The phytochemical study of *A. lappa* L. resulted in the isolation of two dibenzyl butyrolactone lignan, a arctiin e arctigenin. The results obtained schistosomicidal evaluation showed that hydroalcoholic extract crude in concentration of 200 mg/mL showed significant antischistosomal activity *in vitro* and is capable of causing the death of the 100% of the parasites within 24 hours of incubation. The arctiin a major purified metabolite from the extract, was capable of killing by causing tegumentary lesions en 100% of the adult worms. The obtained results suggest that the schistosomicidal activity *in vitro* showed by the hydroalcoholic extract can be related to arctiin presence, supporting the potencial schistosomicidal *in vitro* of dibenzyl butyrolactone lignan, against the adult worms of *S. mansoni*.

**Key words:** *Schistosoma mansoni*; *Arctium lappa* L.; lignans; arctiin; arctigenin.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFA	Ácido acético glacial: formaldeído: etanol: água destilada (2: 9:30: 59)
AL	Extrato Hidroalcoólico Bruto dos Frutos de <i>A. lappa</i> L.
AL-A	Fração em acetato de etila
AL-D	Fração diclorometânica
AL-D <sub>II</sub>	Subfração Diclorometânica II
AL-D <sub>III</sub>	Subfração Diclorometânica III
AL-H	Fração hexânica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub> -D	Clorofórmio Deuterado
CF	Cromatografia em Coluna <i>Flash</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucéico
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplodupleto
FM	Fase Móvel
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
iNOS	Óxido nítrico sintase
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m/v	Massa por volume
<i>m</i>	Multiplete
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxamniquina

PZQ	Praziquantel
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Tripleto
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição global da esquistossomíase. ....	22
Figura 2	Ciclo de transmissão do <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	23
Figura 3	Estrutura química do Praziquantel (PZQ – 1) e Oxamniquina (OXA – 2). ....	25
Figura 4	Estrutura química da artemisinina (3) e seu derivado artemeter (4). ....	26
Figura 5	Metabólitos secundários antiparasitários: quinina (5) e licochalcona A (6). ....	26
Figura 6	Substâncias com atividade antiparasitária: anfotericina B (7) e ivermectina (8). ....	27
Figura 7	Padrão de ligação e numeração das lignanas, segundo a IUPAC. ....	29
Figura 8	Principais subclasses estruturais das lignanas. ....	29
Figura 9	Estrutura química da virolina (9), neolignana do tipo 8.O.4'.....	30
Figura 10	Estrutura química da podofilotoxina (10) .....	31
Figura 11	Estrutura química da neolignana veraguensina (11) e lignana justicidina B (12) com atividade antiparasitária. ....	31
Figura 12	Estrutura química da neolignana: licarina A (13). ....	32
Figura 13	Alteração tegumentar e morte do <i>S. mansoni</i> induzido por adição <i>in vitro</i> da neolignana diidrobzofurânica licarina A.(100 µM) .....	32

Figura 14	Verme adulto de <i>S. mansoni</i> incubado em controle negativo (meio RPMI 1640) e com adição <i>in vitro</i> da lignana dibenzilbutirolactólica metilcubebina.(10 µM) .....	33
Figura 15	Lignanas dibenzilbutirolactólica: cubebina (14) e dibenzilbutirolactônicas: metilpluviatolídeo (15), hinoquinina (16), 6-6'-dinitrohinoquinina (17), com atividade esquistossomicida. ....	34
Figura 16	Folhas e frutos da <i>A. lappa</i> L. (Asteraceae).. .....	36
Figura 17	Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos presentes na <i>A. lappa</i> L.: ácido cafeico (18), ácido clorogênico (19) e ácido dicafeoilquínico (20). ....	38
Figura 18	Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em <i>A. lappa</i> L.: luteolina (21), quercetina (22), quercitrina (23) e rutina (24). ....	38
Figura 19	Estruturas químicas de algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas presentes nos frutos e sementes da <i>Arctium lappa</i> L.: trachelogenina (25), Lappaol F (26), diarctigenina (27), arctiina (28) e arctigenina (29) .....	40
Figura 20	Esquema geral do procedimento de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos da <i>A. lappa</i> L. ....	52
Figura 21	Cromatografia em Coluna da Fração AL-D .....	53
Figura 22	Fluxograma do isolamento e purificação dos principais metabólitos dos frutos da <i>A. lappa</i> L. ....	54
Figura 23	Hidrólise sob refluxo da substância AL-D <sub>III</sub> 5* .....	56
Figura 24	Região dorsal de um macho de <i>Schistosoma mansoni</i> , onde é avaliado o efeito de compostos no tegumento. ....	64

Figura 25	Estrutura química da substância isolada AL-D <sub>III</sub> -5* e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctiina (arctigenina 4'-O-glicosídeo). ....	65
Figura 26	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância AL- D <sub>III</sub> 5* (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	67
Figura 27	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância AL- D <sub>III</sub> -5* (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	70
Figura 28	Estrutura química da substância isolada AL-D <sub>II</sub> 6-2 e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctigenina. ....	72
Figura 29	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância AL- D <sub>II</sub> 6-2 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	74
Figura 30	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância AL- D <sub>II</sub> 6-2 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	76
Figura 31	Estrutura química da substância isolada AL- H B e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctigenina. ....	77
Figura 32	AL- H B: Sólido branco .....	78
Figura 33	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância AL- H B (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ em ppm) .....	79
Figura 34	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância AL- H B (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> δ em ppm). ....	80
Figura 35	Controle negativo (meio RPMI 1640) e DMSO 0,5% .....	83
Figura 36	Efeito do <b>AL</b> no tegumento dos machos de <i>S. mansoni</i> . A: controle negativo (sem adição do extrato). B: controle positivo (Praziquantel 10 μM). C: 50 μg/mL. D: 100 μg/mL. A-D: Imagens tridimensionais. Barras = 50 μm .....	87

Figura 37 Vermes adultos de *S. mansoni* incubado com adição *in vitro* da substância AL- D<sub>III</sub>-5\* (arctiina) a 100 µM, Em (A) e (B), machos tratados com 100 µM de arctiina. Em (C) e (D), as fotos mostram fêmea incubadas com 100 µM de AL- D<sub>III</sub>-5\*. ..... 91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de metabólitos especiais e substâncias químicas presentes na <i>A. lappa</i> L. e suas atividades biológicas reportadas pela literatura .....	42
Tabela 2	Frações obtidas por CC da fração AL-D.....	53
Tabela 3	Frações obtidas por CC de AL-D <sub>III</sub> .....	55
Tabela 4	Frações obtidas por CF do hidrolisado de AL-D <sub>II</sub> 5*.....	57
Tabela 5	Frações obtidas por CC de AL-D <sub>II</sub> .....	58
Tabela 6	Frações obtidas por CF de AL-D <sub>II</sub> 6.....	59
Tabela 7	Dados do espectro de RMN de <sup>1</sup> H, da substância AL- D <sub>III</sub> -5*, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> ( $\delta$ em ppm, multiplicidade), <i>J</i> em Hz.. .....	68
Tabela 8	Dados do espectro de RMN de <sup>13</sup> C, da substância AL- D <sub>III</sub> -5*, a 75 MHz em CDCl <sub>3</sub> ( $\delta$ em ppm). .....	71
Tabela 9	Dados do espectro de RMN de <sup>1</sup> H, das substâncias AL- D <sub>II</sub> 6-2, a 300 MHz em CDCl <sub>3</sub> ( $\delta$ em ppm, multiplicidade), <i>J</i> em Hz ...	75
Tabela 10	Dados do espectro de RMN de <sup>13</sup> C, das substâncias AL- D <sub>II</sub> 6-2 a 75 MHz em CDCl <sub>3</sub> ( $\delta$ em ppm). .....	77
Tabela 11	Efeito <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de <i>A. lappa</i> L. frente aos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	82
Tabela 12	Atividade <i>in vitro</i> das lignanas arctiina e arctigenina isoladas a partir do AL frente aos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	90



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
1.1	Considerações Gerais .....	19
1.2.	Esquistossomíase .....	21
1.3.	Produtos naturais com atividade esquistossomicida .....	25
1.4.	Lignóides.....	27
1.4.1.	Lignanas e Neolignanas: Definição, Nomenclatura e Diversidades Estruturais .....	28
1.4.2.	Atividades biológicas das lignanas e neolignanas .....	30
1.5.	A família Asteraceae, o gênero <i>Arctium</i> e a espécie <i>Arctium lappa</i> L. ....	34
2.	OBJETIVOS .....	47
2.1	Objetivos gerais.....	47
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.1.	Instrumentação e materiais cromatográficos .....	48
3.1.1	Materiais e reagentes .....	49
3.2.	Coleta e identificação do material vegetal .....	50
3.3.	Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de <i>Arctium lappa</i> L. ....	50
3.4.	Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto utilizando processo de partição líquido-líquido .....	50
3.5.	Estudo da fração diclorometânica - AL- D .....	53
3.5.1.	Estudo da fração diclorometânica - AL- D <sub>III</sub> .....	55
3.5.1.1.	Hidrólise da substância isolada AL- D <sub>III</sub> 5*.....	55
3.5.1.2.	Purificação da aglicona obtida a partir da hidrólise .....	56
3.5.2.	Estudo da fração diclorometânica - AL- D <sub>II</sub> .....	57
3.5.2.1.	Estudo da fração diclorometânica - AL- D <sub>II</sub> 6 .....	58
3.6.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade esquistossomicida do extrato hidroalcoólico bruto e das substâncias isoladas dos frutos da <i>A.</i>	

	<i>lappa</i> L .....	59
3.6.1.	Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	59
3.6.1.1.	Linhagem de Origem do Parasito .....	59
3.6.1.2.	Animais hospedeiros .....	59
3.6.1.3.	Manutenção do Ciclo Evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	60
3.6.1.4.	Recuperação dos Vermes Adultos de <i>S. mansoni</i> .....	61
3.6.2.	Preparo das amostras e materiais utilizados no ensaio esquistossomicida .....	61
3.6.3.	Ensaio <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	62
3.6.4.	Avaliação do ensaio esquistossomicida .....	63
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
4.1.	Isolamento e purificação dos metabólitos de interesse .....	65
4.2.	Determinação e identificação estrutural das substâncias isoladas .....	65
4.2.1.	Substância isolada AL- D <sub>III</sub> -5* .....	65
4.2.2.	Substância isolada AL- D <sub>II</sub> 6-2 .....	72
4.2.3.	Substância isolada AL- B .....	77
4.3.	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de <i>A. Lappa</i> L. (AL) frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	81
4.4.	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> das substâncias isoladas dos frutos de <i>A. Lappa</i> L. (AL) frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	89
5.	CONCLUSÕES .....	94
6.	REFERÊNCIAS .....	95

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

Meana Dias, Mirna.

Avaliação da Atividade Esquistossomicida in vitro do Extrato Bruto e Metabólitos Secundários dos Frutos da *Arctium lappa* L. (Asteraceae) / Mirna Meana Dias. -- 2013.  
113 p.

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, 2013.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Arctium lappa* L.. 3. lignanas.  
4. arctiina. 5. arctigenina. I. Alves da Silva Filho, Ademar, orient. II. Título.

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. Considerações gerais:

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (PASA, 2011). As plantas medicinais e seus extratos têm sido utilizados por muitos séculos para o tratamento de diversas patologias, de dores de cabeça a infecções parasitárias. No Brasil, o uso de plantas medicinais pela população com a finalidade de se tratar enfermidades sempre foi expressivo, principalmente devido à extensa e diversificada flora (ANTHONY et al., 2005, HOTEZ et al., 2007).

Ainda hoje, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorra às plantas medicinais como único lenitivo para seus males, visto que o comércio de medicamentos no Brasil atende apenas à faixa economicamente ativa (cerca de 30% da população), supondo-se que o restante encontra nos produtos de origens naturais, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Dentro deste contexto social e econômico, as plantas medicinais e os fitoterápicos adquirem enorme importância no tratamento e cura das doenças e por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo métodos modernos disponíveis (ALI, 2011; FREZZA, 2012; LAPA et al., citado em SIMÕES, 2003).

Grande número de medicamentos sintéticos foi obtido a partir de precursores naturais (ELISABETSKY et al., 1995), sendo que estes representam uma valiosa alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Exemplos de fármacos obtidos de plantas são a digoxina (*Digitalis sp.*- Plantaginaceae), utilizada em insuficiência cardíaca; o taxol (*Taxus brevifolia*- Taxaceae), usado como antitumoral e a morfina (*Papaver somniferum* - Papaveraceae), um potente analgésico (MISHRA e TIWARI, 2011). A descoberta de produtos naturais ativos é constituída não apenas pela necessidade de caracterização das propriedades químicas das moléculas, mas também pela descoberta de novas substâncias que podem servir de modelos (protótipos) para o desenvolvimento de novos fármacos (BARBOSA DE CASTRO et al.; 2013). Assim, as plantas continuam mantendo a sua histórica significância como importante fonte de novos fármacos, produzindo compostos ativos ou substâncias

## Introdução

---

que também podem ser modificadas estruturalmente. Atualmente, 25% dos compostos ativos prescritos nos Estados Unidos e Reino Unido foram isolados de plantas medicinais (ANTHONY et al., 2005; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Nos últimos 30 anos várias pesquisas têm sido realizadas para se determinar quais os efeitos e os mecanismos de ação de diversos metabólitos secundários vegetais. No entanto, menos de 10% das espécies de plantas floridas do mundo (aproximadamente 250.000 espécies) têm sido investigadas cientificamente quanto às suas propriedades químicas e farmacológicas. Contudo, a diversidade do reino vegetal representa uma extraordinária reserva de novas moléculas, uma vez que apenas uma pequena porcentagem das espécies vegetais existentes no mundo tem sido investigadas quimicamente, sendo a triagem biológica e farmacológica de seus constituintes é ainda menor (CORDELL, 2000; HOSTETTMAN e WOLFENDER, 1997).

Considerando a enorme riqueza da flora do Brasil, que possui a maior biodiversidade genética vegetal do mundo e em torno de 22% das espécies de plantas existentes no planeta, ainda há uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários vegetais com inúmeras propriedades químicas e medicinais ainda não reveladas (CALIXTO e SIQUEIRA-JR., 2008; KATZ e COELHO 2008; ROKNI et al., 2012; SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Inicialmente, muitos pesquisadores da área de produtos naturais preocupavam-se principalmente em elucidar as estruturas e propriedades químicas dos metabólitos vegetais purificados. Recentemente, grande número de estudos têm-se concentrado na investigação das propriedades biológicas desempenhadas por tais substâncias. Como consequência, diversas classes de metabólitos secundários vegetais, incluindo os lignóides estão sendo “redescobertas”, já que suas potencialidades biológicas estão sendo investigadas empregando-se grande variedade de novos ensaios e metodologias biológicas (DA SILVA FILHO et al., 2004, 2008; VUORELLA et al., 2004).

Dentre as várias patologias pelas quais as substâncias químicas especiais, produzidas pelas plantas, possuem potencial para o desenvolvimento de novos

medicamentos, destacam-se, as doenças tropicais negligenciadas, especialmente a esquistossomíase. Esta parasitose devido à sua complexa epidemiologia, grande prevalência mundial e a existência de poucos medicamentos atualmente eficazes para o seu tratamento vêm adquirindo destaque, na pesquisa de novos fármacos de origem natural para o controle e tratamento dos indivíduos infectados (BARBOSA DE CASTRO et al., 2013).

A epidemiologia da esquistossomíase no Brasil encontra-se bem descrita no estudo realizado por Coura Amaral (2004), no período compreendido entre os anos de 1977 e 2002. Onde os autores concluíram que nenhum método isolado é capaz de controlar a esquistossomíase e que todos os programas de controle devem considerar a necessidade de uma aplicação multidisciplinar dos métodos existentes. No longo prazo, devem ser desenvolvidas medidas de saneamento básico, abastecimento de água potável, bem como a educação sanitária e a participação efetiva da comunidade para controlar a infecção. Em curto prazo, o tratamento dos indivíduos doentes associado com o controle dos focos de infestação dos hospedeiros intermediários são relevantes para o controle da morbidade da doença, embora não seja o suficiente para interromper a transmissão da doença.

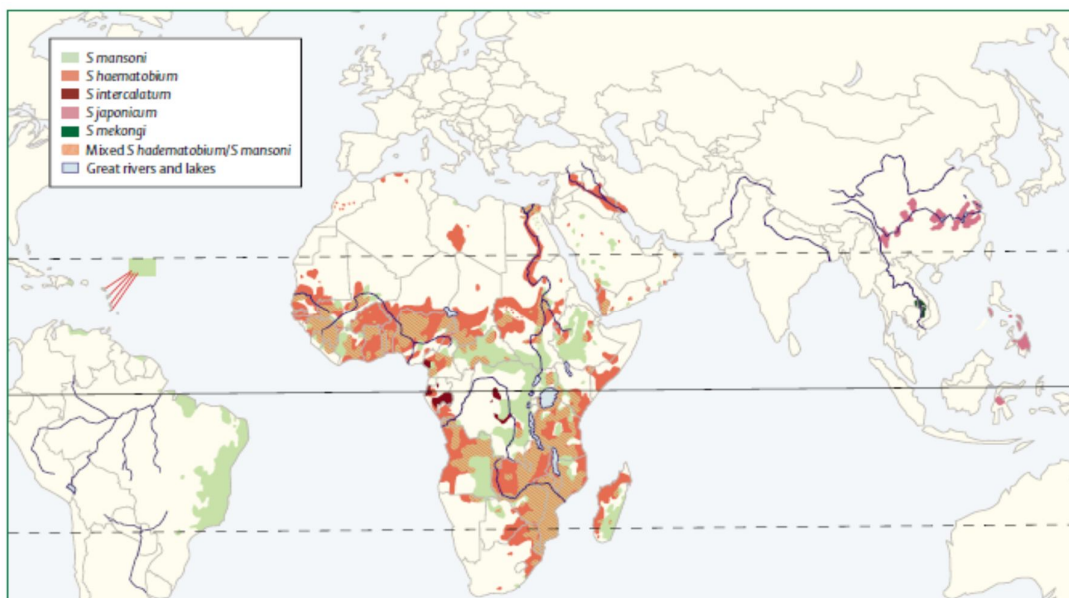
## **1.2. Esquistossomíase:**

A esquistossomíase é uma doença típica de países em desenvolvimento, que contam com recursos reduzidos para investimento em saúde pública. Causada por vários trematóides pertencentes ao gênero *Schistosoma*, atualmente a esquistossomíase ou esquistossomose afeta mais de 240 milhões de pessoas, sendo que aproximadamente 20 milhões têm consequências severas da doença (DE MELO et al., 2011). Esta parasitose está distribuída em 76 países (Fig. 1) dos continentes africano, asiático e americano e cerca de 780 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair uma das esquistossomoses (BARBOSA DE CASTRO et al. 2013; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; OMS, 2006, 2011a, 2011b; STEINMAMM et al., 2006).

No Brasil, a área abrange 19 estados sendo endêmica em 9 destes (especialmente o Estado de Minas Gerais), com aproximadamente 42 milhões de

## Introdução

habitantes expostos ao risco e cerca de 7 milhões de indivíduos infectados, os quais em muitos casos apresentam severas deficiências orgânicas, comprometendo o desenvolvimento de jovens e a produtividade de adultos e fazendo desta doença um dos mais sérios problemas de saúde (KING, 2009; MELO e COELHO, 2005; OMS 2011a, 2011b).



**Figura 1.** Distribuição global da esquistossomíase. Fonte: GRYSEELS et al., 2006.

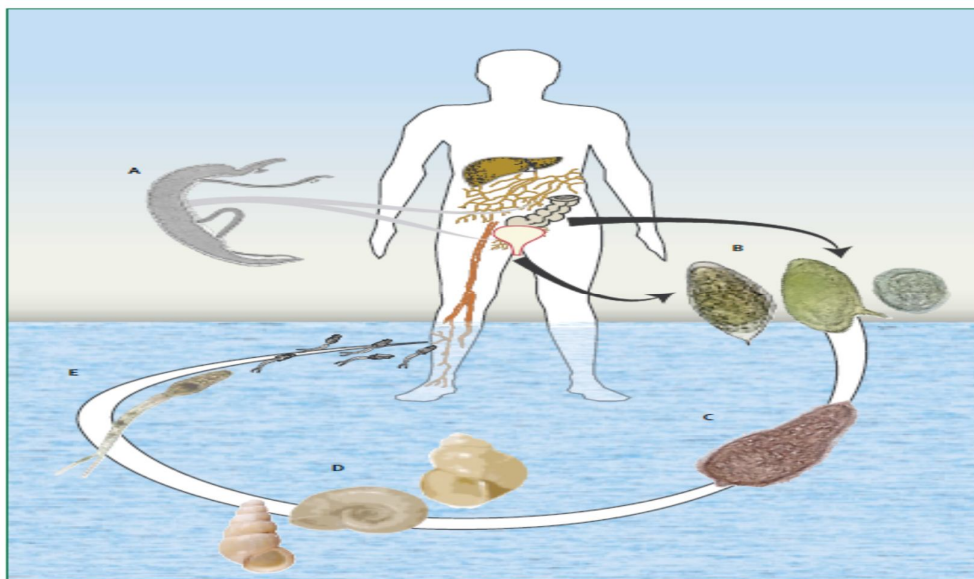
De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) a esquistossomíase humana é uma das doenças tropicais negligenciadas que continua avançando em novas áreas, sendo impulsionada por fatores sociais, econômicos e a má organização nos projetos de irrigação e ocupação de terras nos países em desenvolvimento (CHITSULO et al., 2000; OMS, 2006, 2011a).

Entre as espécies de *Schistosoma* que podem infectar o ser humano somente a espécie *S. mansoni* se adaptou no Brasil, provavelmente devido à presença de moluscos do gênero *Biomphalaria*, os quais atuam como hospedeiros intermediários (MELO e COELHO, 2005). O *S. mansoni* é um trematódeo cuja principal característica é o seu acentuado dimorfismo sexual quando adulto. A infecção por este parasito determina uma patologia denominada esquistossomíase intestinal,

## Introdução

popularmente conhecida como "Xistose", "Bilharziose" ou "Barriga d'água" (GRYSEELS et al., 2006; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2006).

Como podemos observar na figura 2, após a liberação dos ovos de *Schistosoma* pela urina (esquistossomíase urinária por *S. haematobium*) ou fezes (esquistossomíase intestinal por *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*) da pessoa infectada, estes entram em contato com a água e liberam as larvas (miracídio), as quais penetram nos caramujos de água doce (hospedeiros intermediários). Depois de várias semanas, estes moluscos eliminam as cercárias que são as formas infectantes. Após a entrada no hospedeiro definitivo (geralmente o homem), as cercárias perdem a cauda diferenciando-se em esquistossômulos, os quais alcançam a corrente sanguínea e passam pelo pulmão, fígado e veias mesentéricas inferiores, onde ocorre nova maturação e tornam-se vermes adultos. Os vermes adultos são dióicos e pareados por toda a vida. As fêmeas liberam os ovos nas pequenas vênulas intestinais alcançando a luz intestinal, onde são liberados, juntamente com as fezes, para o meio, reiniciando o ciclo (OMS, 2006, 2011a).



**Figura 2.** Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. Fonte: GRYSEELS et al., 2006. A: vermes adultos emparelhados (masculino resistente alojando o feminino delgado). B: ovos (da esquerda para direita, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*). C: miracídio ciliado. D: caramujos hospedeiros intermediários (da esquerda para a direita, *Oncomelania*, *Biomphalaria*, *Bulinus*). E: cercárias.



Com relação ao tratamento da esquistossomíase, estão incluídos na lista da OMS, o Praziquantel (PZQ, estrutura **1**, Fig. 3) e a Oxamniquina (OXA, estrutura **2**, Fig. 3). O PZQ, um derivado de pirazino-isoquinolínico, é um composto comercializado na forma racêmica, contendo partes iguais de seus isômeros ópticos, muito embora o isômero ativo seja o levógiro (OMS, 2011a, 2011c; XIAO et al., 1989). Este fármaco é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* humano, demonstrando atividade também sobre as cercárias e vermes adultos (GÖNNERT et al., 1977; UTZINGER et al., 2003). Embora seja considerado um fármaco de baixa toxicidade e apresentar elevada eficácia terapêutica contra todas as espécies de *Schistosoma*, o praziquantel possui baixa efetividade sobre os esquistossômulos e, portanto, não é utilizado como fármaco profilático (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; UTZINGER et al., 2003). Além disso, o PZQ não previne a re-infecção, necessita de tratamentos repetidos em áreas endêmicas e já há inúmeros relatos demonstrando o crescente surgimento de linhagens resistentes a este medicamento (ARAÚJO, 2011; COUTO et al., 2011; FALLON et al., 1998; ISMAIL et al., 1999; OMS, 2006, 2011c).

Desta forma, a pesquisa de novos fármacos para a terapêutica experimental da esquistossomose deve ser uma prioridade e poderá também ser direcionada para a obtenção de compostos profiláticos, os quais irão prevenir a infecção por agirem nas formas jovens do *Schistosoma* sp. (COUTO et al., 2011).

A Oxamniquina (OXA, estrutura **2**, Fig. 3), um derivado de tetraidroquinolínico, é ativa somente contra o *S. mansoni* e tem efeito esquistossomicida principalmente contra machos adultos. O medicamento é de baixo custo, mas causa efeitos colaterais severos. Em pacientes não curados ocorre redução de ovos nas fezes da ordem de 80 a 90% (COUTO et al., 2011; DELGADO et al., 1992; GRYSEELS et al., 2006).



**Figura 3.** Estrutura química do Praziquantel (PZQ – 1) e Oxamniquina (OXA – 2).

Portanto, considerando a situação atual da farmacoterapia da esquistossomose, o investimento em pesquisa para a obtenção de novos fármacos esquistossomicidas se faz necessário (ANTHONY et al., 2005, OMS, 2011c). Dentro deste contexto, os produtos naturais e, especialmente as plantas medicinais, possuem grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos empregados na medicina humana.

### 1.3. Produtos naturais com atividade esquistossomicida:

Produtos naturais são definidos como substâncias produzidas por sistemas vivos (FISCHBACH et al., 2007; KAYSER et al., 2003; VERPOORTE, 1998), incluindo também os extratos (por exemplo, extrato bruto de plantas) e os compostos isolados (como os metabólitos secundários) obtidos a partir de plantas, animais ou microorganismos (SARKER et al., 2005).

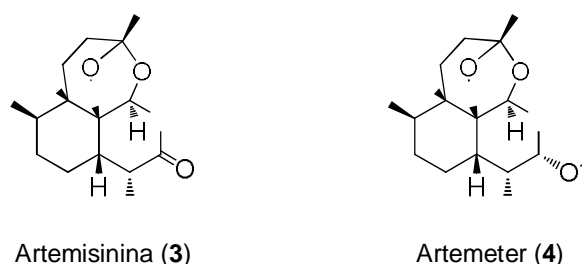
De acordo com a literatura, atualmente mais de 70% dos novos fármacos guardam alguma relação com produtos naturais. Estudos realizados no período de 1981 a 2010 mostram que foram desenvolvidos, por exemplo, 14 novos fármacos antiparasitários, sendo que somente 4 destes possuem origem puramente sintética, e todos os demais possuem sua origem ou são derivados diretos de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Muitas plantas têm sido pesquisadas tanto química quanto biologicamente na tentativa de se detectar preparações brutas ou constituintes ativos que possam ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (FERREIRA et al., 2011; KAYSER et al., 2003; KONÉ et al., 2011; KRON et al., 2007; MIRANDA et al., 2012; YOUSIF et al., 2007). Uma vez

## Introdução

conhecida a atividade biológica do extrato bruto, é possível encontrar os componentes mais ativos por fracionamento e, assim, isolar as substâncias ativas principais (CHITWOOD, 2002).

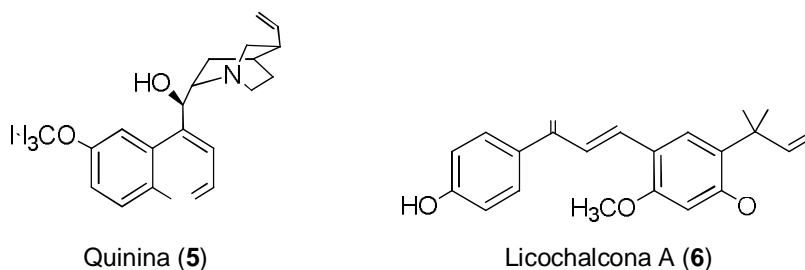
Com relação a metabólitos secundários antiparasitários, temos o exemplo da artemisinina (estrutura **3**, Fig. 4), uma lactona sesquiterpênica obtida das folhas de *Artemisia annua* (Asteraceae) e utilizada no tratamento da malária que se mostrou eficaz contra o *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni* (LESCANO et al., 2004; NDJONKA et al., 2013; UTZINGER et al., 2001; XIAO et al., 2000a e 2000b).



**Figura 4.** Estrutura química da artemisinina (**3**) e seu derivado artemeter (**4**).

Além disso, Araújo e Colaboradores (1991, 1999) verificaram uma discreta redução do número de vermes em *hamsters* infectados com *S. mansoni*, após o tratamento com artemeter (estrutura **4**, Fig. 4), um derivado da artemisinina (ABDIN et al., 2003).

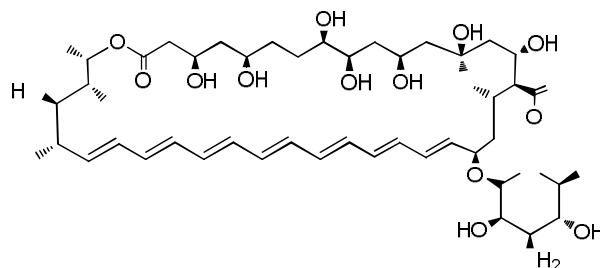
Da mesma forma, a quinina (estrutura **5**, Fig. 5) e a licochalcona A (estrutura **6**, Fig. 5) são exemplos de metabólitos secundários vegetais antiparasitários.



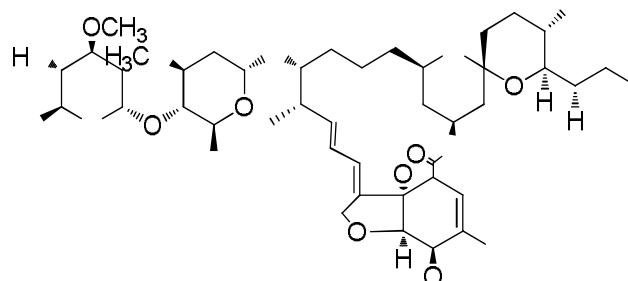
**Figura 5.** Metabólitos secundários antiparasitários: quinina (**5**) e licochalcona A (**6**).

## Introdução

Já a anfotericina B (estrutura **7**, Fig. 6) e a ivermectina (estrutura **8**, Fig. 6) são importantes antiparasitários isolados de microrganismos, como os do gênero *Streptomyces* (FERREIRA et al., 2011; KAYSER et al., 2003; PONTIN et al., 2008).



Anfotericina B (**7**)



Ivermectina (**8**)

**Figura 6.** Substâncias com atividade antiparasitária: anfotericina B (**7**) e ivermectina (**8**)

Recentemente, várias pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais com o objetivo de se encontrar compostos que possam ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos esquistossomicidas (BRAGUINE et al., 2010; FREZZA, 2012; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; PARREIRA et al., 2010; SAYED et al., 2008). Dentre as classes de substâncias químicas especiais, produzidas pelas plantas, com potencial esquistossomicida estão os lignóides.

### 1.4. Lignóides:

O termo lignóide é uma designação genérica que caracteriza um grupo de metabólitos secundários cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, sendo *n* restrito a poucas unidades (WARD, 1999). Devido à

grande diversidade de ocorrência, ao amplo espectro de atividades biológicas e ao importante papel que exercem no desenvolvimento do vegetal, os lignóides têm sido objeto de estudo em várias pesquisas, especialmente aquelas focadas na busca de novos fármacos antiparasitários (DA SILVA FILHO et al., 2008; MACRAE e TOWERS, 1984; SOUZA e LORENZI, 2005). Dentre os lignóides, destacam-se as lignanas e as neolignanas.

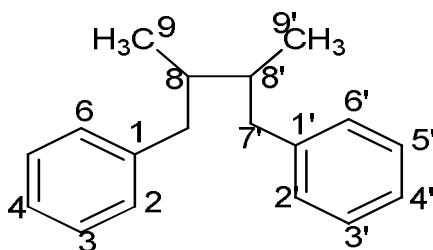
#### 1.4.1. Lignanas e Neolignanas: Definição, Nomenclatura e Diversidades Estruturais.

As lignanas são dímeros derivados da condensação por acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos, cujo carbono  $\gamma$  (C3) da cadeia lateral encontra-se oxidado (WARD, 1999). Assim, as lignanas são biossintetizadas por meio da dimerização, por acoplamento oxidativo, de unidades fenilpropanoídicas ( $C_6C_3$ ), formando uma variedade de subclasses estruturalmente bem distintas.

O termo lignana foi introduzido primeiramente por Haworth em 1936, em sua revisão sobre resinas naturais para designar e agrupar uma então rápida e crescente classe de produtos naturais. Definição esta que vigorou por aproximadamente três décadas, até que um grande número de novas substâncias foi sendo descoberto, juntamente com os avanços nas técnicas espectroscópicas de elucidação estrutural que criaram uma nova e mais complexa diversidade estrutural de lignanas (TRAZZI, 2008).

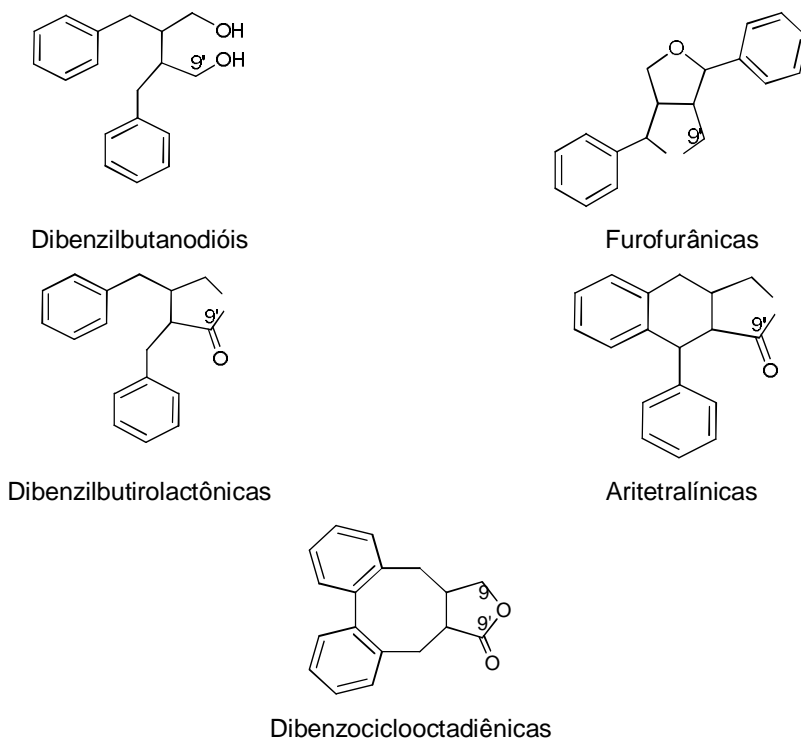
Com o objetivo de padronizar a terminologia empregada para nomeá-las, em 2000, a IUPAC propôs uma definição que visou formalizar as principais tendências da literatura, recomendando uma definição similar à inicialmente proposta por Haworth, na qual se denomina como lignana toda substância originária do acoplamento entre duas unidades  $C_6C_3$  (propilbenzeno), particularmente caracterizada por uma ligação carbono-carbono nas posições 8 e 8' (Fig. 7) (TRAZZI, 2008).

## Introdução



**Figura 7.** Padrão de ligação e numeração das lignanas, segundo a IUPAC.

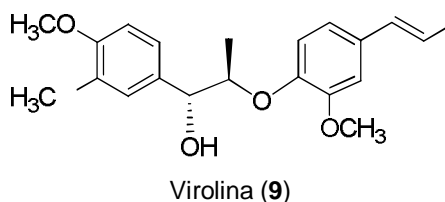
Considerando que a grande maioria das lignanas de origem natural, até hoje conhecidas, apresenta oxidadas as posições 9 e 9', estas podem ser divididas em 5 principais grandes subclasses estruturais (WHITING, 1985), como demonstrado na figura 8 abaixo:



**Figura 8.** Principais subclasses estruturais das lignanas.

Já as neolignanas são dímeros, derivados da condensação por acoplamento oxidativo de alil e/ou propenil fenóis e, ao contrário das lignanas, são isentas de oxidação no carbono  $\gamma$ . A nomenclatura sistemática é um pouco mais complexa

(Fig. 9), que apesar da diversidade de esqueletos e funções, formam um grupo de compostos naturais, singularmente homogêneo (LOPES et al., 2004).



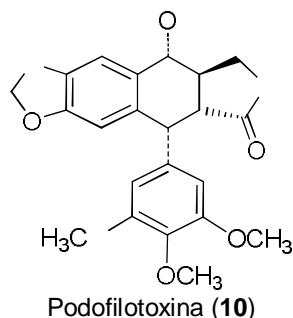
**Figura 9.** Estrutura química da virolina (9), neolignana do tipo 8.O.4'.

#### 1.4.2. Atividades biológicas das lignanas e neolignanas

Desde que o homem introduziu os vegetais em sua dieta, ele tem consumido, sem conhecimento, diversas plantas ricas em lignanas e neolignanas. Muitas destas plantas têm sido largamente utilizadas, há milênios pela tradicional medicinal oriental, como a planta japonesa *Fraxinus japônica* (Oleaceae), utilizada como: diurético, analgésico e antireumático, que possui majoritariamente a lignana: pinoresinol (TRAZZI, 2008).

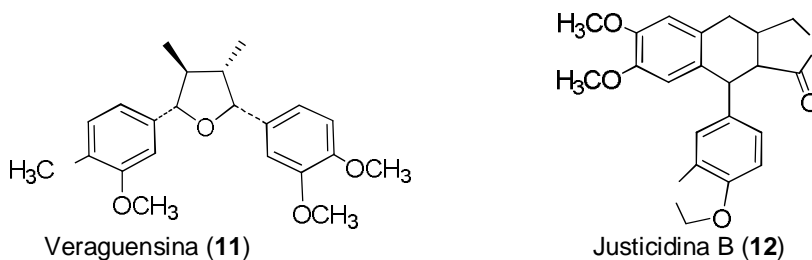
A atividade antiviral destas classes de metabólitos tem sido muito pesquisada. Desde 1942, quando do extrato alcoólico da *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae) foi identificada a podofilotoxina (estrutura **10**, Fig. 10), a qual foi relatada como agente antiviral no tratamento do vírus HPV – *Condiloma acuminata*, causador de verrugas venéreas, estendendo-se depois a outros tipos de verrugas viróticas. Há mais de uma década, de acordo com estimativas modestas, já existiam mais de 200 novas substâncias naturais e semi-sintéticas conhecidas, estruturalmente derivadas da podofilotoxina (**10**). Com efeito, podemos destacar o etoposídeo e o teniposídeo (Sandoz®), ambos em pleno uso clínico no tratamento de vários tipos de tumores (BARBOSA DE CASTRO et al., 2013; DAVID et al., 2001).

## Introdução



**Figura 10.** Estrutura química da podofilotoxina (10)

Entre as diferentes atividades biológicas atribuídas a estas classes de substância, tem-se ressaltado a ação antiparasitária das lignanas e neolignanas frente ao *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania sp* (DA SILVA et al., 2005; DA SILVA FILHO et al., 2004, 2008; SOUZA et al., 2004, 2005). Em relatos de Schmidt e Colaboradores (2012), cita-se a ação tripanocida e leishmanicida da neolignana tetraidrofurânica: veraguensina (estrutura 11, Fig.11). E a potente ação tripanocida da lignana ariltetralínica: justicidina B (estrutura 12, Fig.11).



**Figura 11.** Estrutura química da neolignana veraguensina (11) e lignana justicidina B (12) com atividade antiparasitária.

O destaque especial tem sido dado principalmente à atividade esquistossomicida das lignanas e neolignanas. Estudos recentes demonstraram que algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas e dibenzilbutirolactólica, bem como as neolignanas tetraidrofurânicas e diidrobenzofurânicas, produzidas sinteticamente ou oriundas do metabolismo secundário de plantas, possuem expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* contra o *Schistosoma mansoni*, sendo capazes de promover tanto a separação quanto a morte dos parasitos adultos (BARBOSA DE



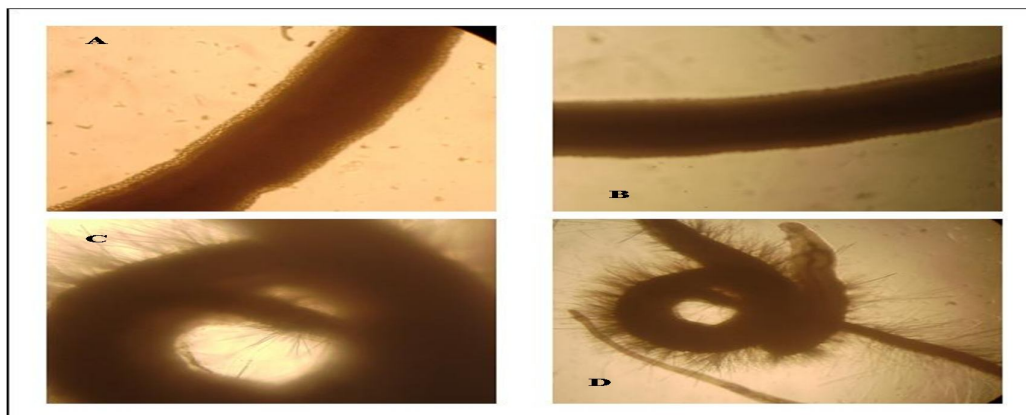
CASTRO et al., 2013; DA SILVA et al., 2005; DA SILVA FILHO et al., 2004, 2008; SOUZA et al., 2004, 2005; **Patente PI 0503951-7**).

Dados da literatura reportam a ação *in vitro* da neolignana diidrobzofurânica: licarina A (estrutura **13**, Fig.12) contra os vermes adultos de *S. mansoni*.

#### Licarina A (**13**)

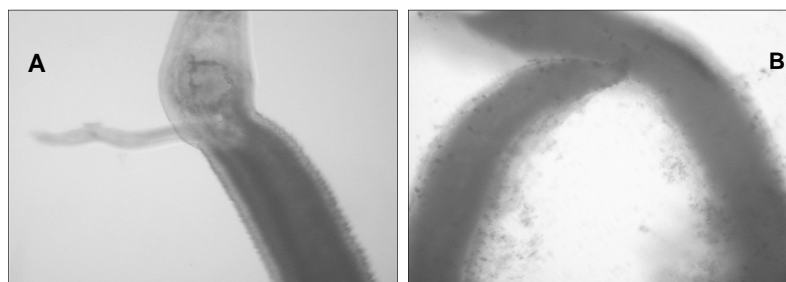
**Figura 12.** Estrutura química da neolignana: licarina A (**13**).

Como se pode observar na figura 13, esta molécula possui elevada atividade esquistossomicida, sendo capaz de matar os parasitos provocando lesões tegumentares nos mesmos (BARBOSA DE CASTRO et al., 2013; **Patente PI 0503951-7**).



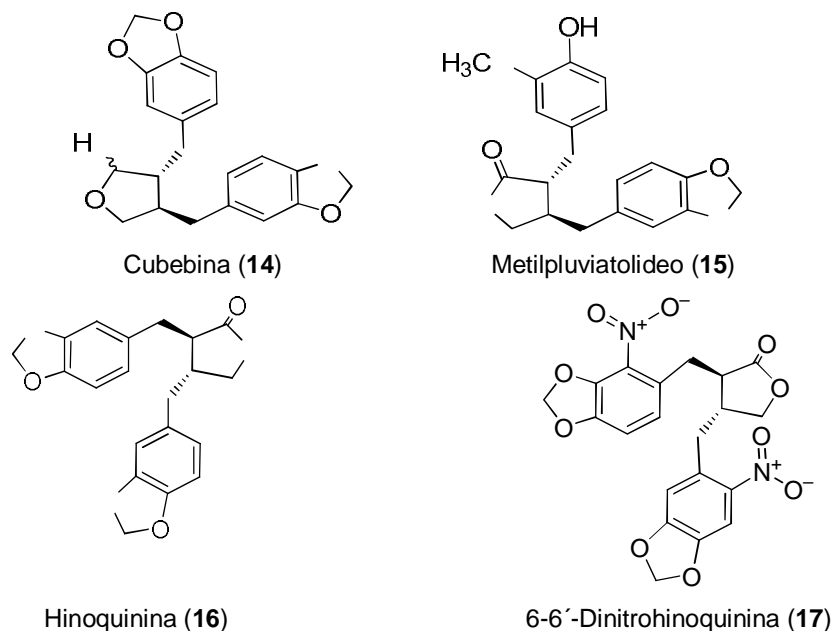
**Figura 13.** Alteração tegumentar e morte do *S. mansoni* induzido por adição *in vitro* da neolignana diidrobzofurânica licarina A. **A** – Vermes adultos mantidos em meio RPMI, **B** – Vermes adultos em meio RPMI com DMSO 10%, **C-D** Vermes adultos em meio RPMI tratado com 100 µM da neolignana durante 120 h. **A-C** aumento.

Em estudos realizados com a cubebina (estrutura **14**, Fig. 15), lignana dibenzilbutirolactólica, presente nas sementes de *Piper cubeba* (Piperaceae), além de provocar a morte de 100% dos parasitos adultos após 24 h de incubação, foi capaz de provocar alterações significativas no tegumento de *S. mansoni* (Fig. 14) (**Patente PI 0503951-7**, DA SILVA et al., 2005; DE SOUZA et al., 2005), conforme apresentado na figura 14.



**Figura 14.** Verme adulto de *S. mansoni* incubado em controle negativo (meio RPMI 1640) e com adição *in vitro* da lignana dibenzilbutirolactólica metilcubebina. (A) Verme adulto de *S. mansoni* incubado em meio RPMI 1640, sob atmosfera em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas, na ausência da substância. (B), Verme adulto de *S. mansoni* incubado em meio RPMI 1640, sob atmosfera em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h, na presença de metilcubebina (10 µM) (**Patente PI 0503951-7**).

DA SILVA FILHO e Colaboradores (2004; 2005) reportam a potente ação esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* contra os vermes adultos de *S. mansoni* das lignanas dibenzilbutirolactônicas: metilpluviatolideo (estrutura **15**, Fig. 15), hinoquinina (estrutura **16**, Fig. 15) e seu derivado semi-sintético, 6-6'-Dinitrohinoquinina (estrutura **17**, Fig. 15) (BARBOSA DE CASTRO et al., 2013; **Patente PI 0503951-7**).



**Figura 15.** Lignanas dibenzilbutirolactólica: cubebina (14) e dibenzilbutirolactônicas: metilpluviatolideo (15), hinoquinina (16), 6-6'-dinitrohinoquinina (17), com atividade esquistossomicida.

Conforme os dados apresentados vêm se tornando crescente o interesse pela pesquisa das lignanas como protótipos de novas substâncias com potencial esquistossomicida.

Dentre as espécies vegetais de interesse medicinal que biossintetizam lignanas, destaca-se a *Arctium lappa* L. (Asteraceae).

### 1.5. A família Asteraceae, o gênero *Arctium* e a espécie *Arctium lappa* L.:

A família Asteraceae é a maior família do reino vegetal (BERETTA et al., 2008), possuindo cerca de 1.600 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994; FERREIRA et al., 2009). De ampla distribuição, esta família é encontrada em diferentes localidades, destacando as regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO et al., 1991).

As plantas desta família possuem grande importância econômica, pois são cultivadas como plantas ornamentais (como a margarida), medicinais (como a

## Introdução

---

arnica, bardana, carqueja e guaco), apícolas (como o alecrim-do-campo), oleaginosas (girassol), aromáticas (camomila), inseticidas (crisântemo) e comestíveis (alface, almeirão, chicória e estévia). Além disso, muitas espécies são invasoras de lavouras e tóxicas ou potencialmente tóxicas para animais e para o homem (BERETTA et al., 2008)

No Brasil, a família é representada por 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Muitas plantas dessa família são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e diversas espécies possuem atividade analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana (LORENZI e MATOS, 2002).

Quimicamente esta família se destaca pela enorme diversidade de metabólitos secundários, sendo caracterizada pela presença de terpenoides, flavonoides e poliacetilenos (ZDERO e BOHLMANN, 1990).

O gênero botânico *Arctium* pertence à família Asteraceae. E como representantes deste gênero, podemos citar as espécies: *Arctium lappa* L., *Arctium minus* (Hill) Bernhardt, *Arctium minus nemorosum* (Lej.) Syme, *Arctium pubens* B, *Arctium leosperum*, *Arctium tomentosum*. Das quais se destaca à *Arctium lappa* L. também conhecida como bardana devido ao seu uso na culinária e suas propriedades medicinais como antitumoral e antiviral (CORRÊA, 1894; SANTOS, 2007).

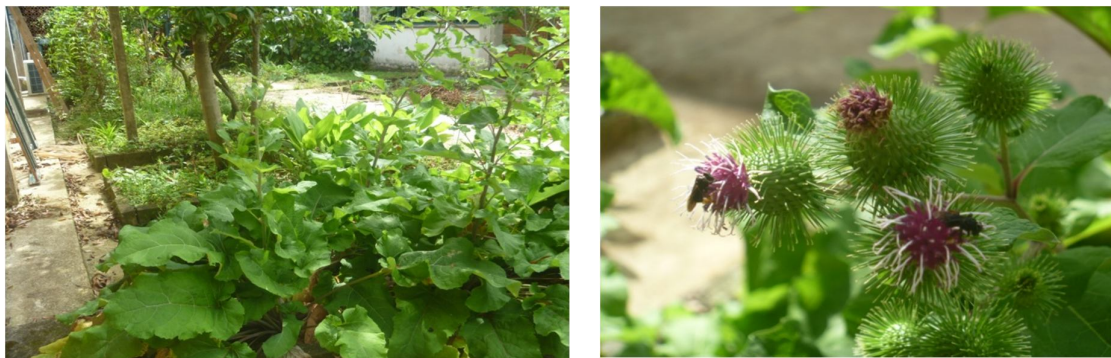
A *Arctium lappa* L. (Asteraceae), originária da Europa e Sibéria e encontrada em países como Portugal, França, Espanha, Alemanha, Itália, chegou ao Brasil por meio de imigrantes japoneses devido ao seu valor terapêutico e alimentar (MORGAN, 2003; MUNARIN et al., 2010). É conhecida por várias denominações de acordo com o país onde é encontrada: no Japão é conhecida como “Gobo” (KARDOŠOVA et al., 2003); “Lampazo” é a sua denominação nos países de língua espanhola; “Bardane” na França e “Burdock” nos países de língua inglesa (CORRÊA, 1984; MORGAN, 1997). No Brasil é chamada de “Bardana”, “Orelha-de-gigante”, “Bardana-maior”, “Pegamasso” e “Erva-dos-tinhosos” (CUNHA, 2003).

## Introdução

---

*A. lappa* L. é uma planta herbácea bienal, de fácil cultivo, capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e sombreados. Pode alcançar até 1,5 m de altura (FONT QUER, 1988) e possui folhas grandes, que atingem cerca de 40 cm de comprimento (CASTRO, 1981; FONT QUER, 1988; MOTA DA SILVA, 2010). As flores são rosadas ou púrpuras e a floração ocorre no verão (CORRÊA, 1984), sendo que suas flores (e os frutos também) são formadas após o segundo ano de cultivo (Fig. 16) (MORGAN, 1997; MOTA DA SILVA, 2010).

Os frutos possuem papilos de pêlos muito caducos. As raízes, que podem chegar a 1,2 m de profundidade, são carnosas, brancas internamente e pardas externamente (FONT QUER, 1988). Preferencialmente, devem ser coletadas antes da floração (CORRÊA, 1984), pois as raízes maduras apresentam suas propriedades terapêuticas reduzidas com o passar do tempo (MORGAN, 1997).



**Figura 16.** Folhas e frutos da *A. lappa* L. (Asteraceae). Fonte: Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foto: Autora (2012).

As indicações populares dos usos terapêuticos da Bardana são diversas, como antihipertensivo, no tratamento da gota, arteriosclerose, hepatite e como antiinflamatória (FERRACANE et al., 2010). Também utilizada pelas suas propriedades hipoglicemiantes (KARDOŠOVÁ et al., 2003), desintoxicante sanguínea e nos tratamentos de afecções cutâneas, como os eczemas (CHAN et al., 2011). Sua toxicidade ainda não é totalmente conhecida, mas potencialmente pode causar reações de sensibilização cutânea por contato. Seu consumo também não é recomendado para gestantes, devido ao estímulo da atividade uterina (CUNHA, 2003; RODRIGUEZ et al., 1995).

## Introdução

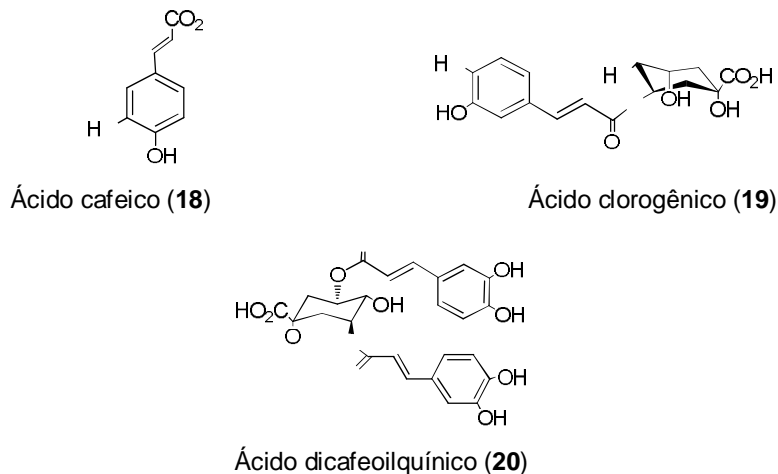
---

Vários estudos já foram realizados sobre as atividades biológicas da Bardana dentre os quais citamos: os efeitos antitussígenos e imunomoduladores produzidos pelos polissacarídeos presentes no extrato das raízes desta planta (KARDOŠOVÁ et al., 2003). Estudos demonstraram que a fração hexânica das folhas da Bardana apresenta atividade antimicrobiana frente a microrganismos orais, tais como: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Pseudomonas aeruginosa* (PEREIRA et al., 2005; SOUZA, 2004). Por outro lado, os constituintes fenólicos presentes na Bardana tais como o ácido cafeico (estrutura **18**, Fig. 17) e o ácido clorogênico (estrutura **19**, Fig. 17) possuem forte efeito inibitório sobre herpesvírus (HSV-1, HSV-2) e adenovírus (ADV-3, ADV-11) (CHAN et al., 2011). A arctigenina (estrutura **29**, Fig. 19), um das lignanas presentes na bardana, demonstrou atividades *in vivo* e *in vivo* contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (EICH et al., 1996; SCHRODER et al., 1990).

O efeito antialérgico da Bardana foi atribuído, em estudos realizados por Knipping e Colaboradores (2008), aos seus efeitos de inibição da liberação de mediadores químicos, bem como sobre a inibição da biossíntese de leucotrienos pelos basófilos. Os mesmos pesquisadores, em outro estudo realizado em 2008, mostraram que a ação anti-inflamatória do extrato da bardana ocorre principalmente pela sua capacidade de inibir a produção de enzima óxido nítrico sintase (iNOS).

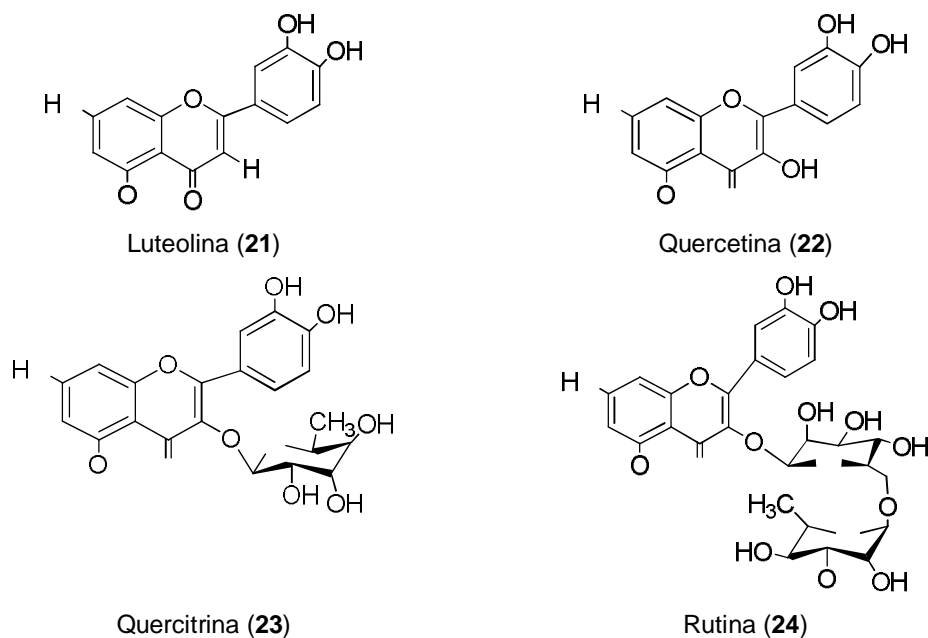
A Bardana também apresenta muitos relatos sobre a sua atividade antioxidante. Estudos *in vitro* demonstraram que a ação antioxidante da Bardana é resultado da redução das espécies reativas ao oxigênio (ROS) e dos danos ao DNA celular (LEONARD et al., 2006). Esta ação antioxidante foi considerada como o mecanismo responsável pela hepatoproteção observada após a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno e pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (LIN et al., 2000), e após a hepatotoxicidade induzida pelo etanol e potencializada pelo CCl<sub>4</sub> (LIN et al., 2002). Esta ação, que vem sendo atribuída devido à presença dos ácidos fenólicos como: ácido cafeico (estrutura **18**, Fig. 17), ácido clorogênico (estrutura **19**, Fig. 17) e ácido dicafeoilquínico (estrutura **20**, Fig. 17).

## Introdução



**Figura 17.** Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos presentes na *A. lappa* L.: ácido cafeico (18), ácido clorogênico (19) e ácido dicafeoilquínico (20).

E também dos flavonóides: luteolina (estrutura 21, Fig. 18), quercetina (estrutura 22, Fig. 18), quercitrina (estrutura 23, Fig. 18) e rutina (estrutura 24, Fig. 18) presentes nesta espécie.



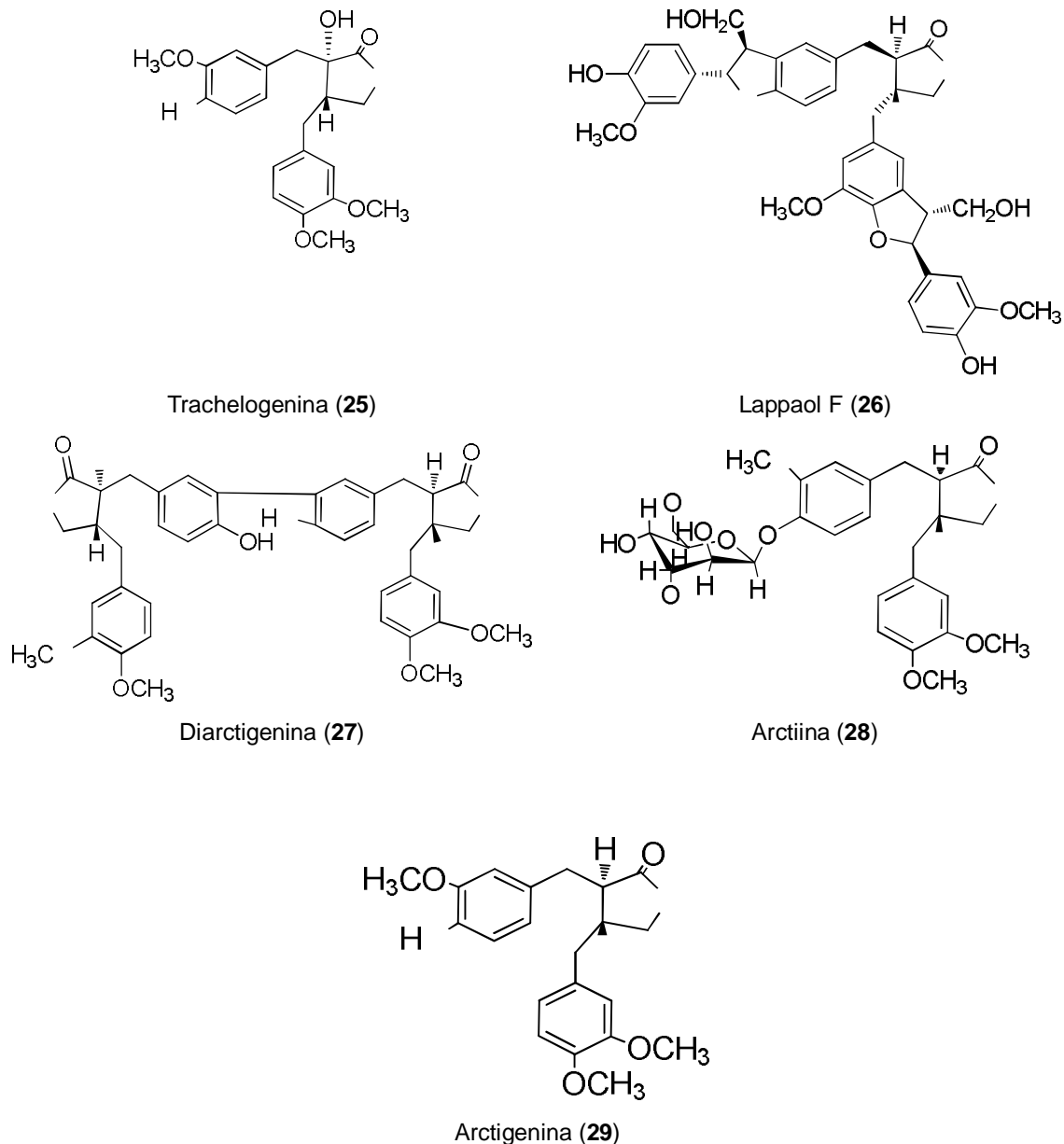
**Figura 18.** Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em *A. lappa* L.: luteolina (21), quercetina (22), quercitrina (23) e rutina (24).

## Introdução

---

Estudos fitoquímicos demonstram que as lignanas e neolignanas são os principais metabólitos presentes nos frutos e sementes da *A. lappa* L. (Asteraceae). Dentre estas, se destacam a presença das lignanas dibenzilbutirolactônicas: trachelogenina (estrutura **25**, Fig. 19), Lappaol F (estrutura **26**, Fig. 19), diarctigenina (estrutura **27**, Fig.19), arctiina (estrutura **28**, Fig.19) e arctigenina (estrutura **29**, Fig.19) (CHAN et al., 2011; WU, et al., 2009).





**Figura 19.** Estruturas químicas de algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas presentes nos frutos e sementes da *Arctium lappa* L.: trachelogenina (25), Lappaol F (26), diarctigenina (27), arctiina (28) e arctigenina (29)

A arctigenina (29) é uma das principais lignanas encontrada nas sementes, frutos e folhas da Bardana. Estudos mostram que esta substância apresenta grande potencial para o tratamento de algumas doenças antiinflamatórias, já que é capaz de inibir a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos (CHAN et al., 2011; WANG et al., 2007). Além disso, trabalhos têm

## Introdução

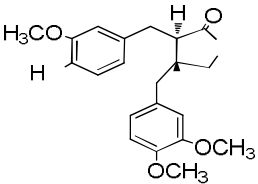
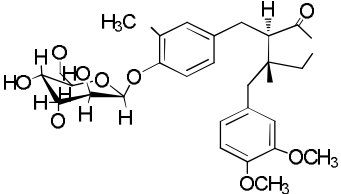
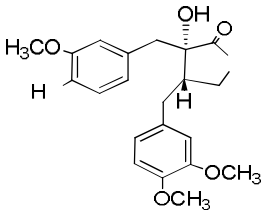
---

demonstrado que a arctigenina (**29**) tem a propriedade de privar as células cancerosas de nutrientes essenciais, como a glicose, levando-as à morte (AWALE et al., 2006; CHAN et al., 2011). Ainda, são descritas outras propriedades biológicas para esta lignana, como atividade *in vivo* e *in vitro* em inibir a replicação do vírus HIV-1 (CHAN et al., 2011; CHO et al., 2004; EICH et al., 1996; VLIETINCK et al., 1998).

Já para a arctiina (**28**), o heterosídeo da arctigenina (**29**), foi descrita a ação anticancerígena, confirmada pelo teste de indução de tumores cutâneos induzidos pelo 7,2 di-metil-benzatraceno em ratos (WANG et al., 2005).

## Introdução

**Tabela 1.** Principais classes de metabólitos especiais e substâncias químicas presentes na *A. lappa* L. e suas atividades biológicas reportadas pela literatura.

Classe de Metabólito Especial	Substância	Partes da Planta	Atividade Biológica
Lignanas	<b>Arctigenina</b> 	Folhas, frutos, sementes e raízes.	Supressor do choque térmico, antitumoral e antivírus influenza.
	<b>Arctiina</b> 	Folhas, frutos e raízes.	Atividade antitumoral, atividade quimiopreventiva, atividade antiproliferativa frente a células de hibridoma B e células MH 60.
	<b>Trachelogenina</b> 	Frutos	Atividade antagonista dos canais de Ca <sup>2+</sup> , propriedades anti-HIV.

## Introdução

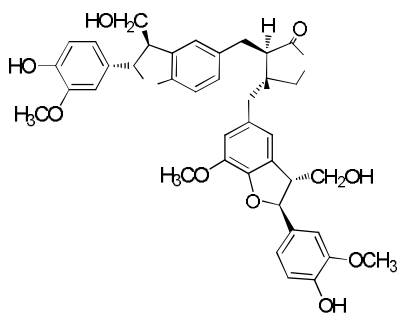
Continuação da **Tabela 1**. Principais classes de metabólitos especiais e substâncias químicas presentes na *A. lappa* L. e suas atividades pela literatura.

**Lappaol F**

Frutos e sementes

Inibição da produção de

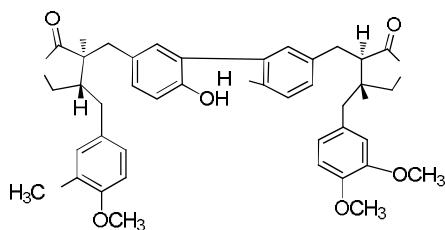
**Lignanas**



**Diarctigenina**

Frutos, raízes e sementes.

Inibição da produção de

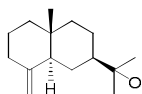


**Beta-eudesmol**

Frutos

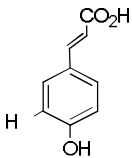
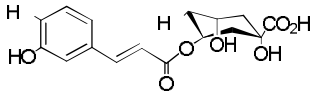
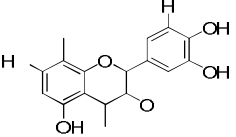
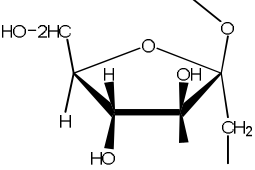
Antibacteriano e anti-an

**Terpenóides**



## Introdução

Continuação da **Tabela 1**. Principais classes de metabólitos especiais e substâncias químicas presentes na *A. lappa* L. e suas atividades pela literatura.

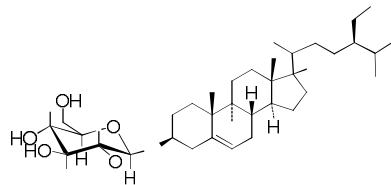
	Ácido cafeico	Estemas, folhas e pele das raízes.	Atividade antioxidativa e
			
<b>Polifenóis</b>	Ácido clorogênico	Folhas e pele das raízes	Atividade neuroprotetora, anti-HIV.
			
	Taninos	Raízes	Atividade antitumoral, hialuronidase.
			
	Inulina	Raízes	Eficácia prebiótica, antidiabéticas.
<b>Frutoses</b>			

## Introdução

---

Continuação da **Tabela 1**. Principais classes de metabólitos especiais e substâncias químicas presentes na *A. lappa* L. e suas atividades pela literatura.

### Esteróides



Raízes

Efeito na alfa-DNA polim

Fonte: CHAN et al., 2011.

## Introdução

---

Tendo em vista a importância da descoberta de protótipos naturais ativos frente a *S. mansoni*, ensaios iniciais de triagem e bioprospecção para descoberta de extratos brutos vegetais ativos, recentemente realizados, demonstraram atividade esquistossomicida para o extrato hidroalcoólico dos frutos de *Arctium lappa* L. (Asteraceae). Esta amostra foi capaz de promover, em baixas concentrações (300 µg/mL), a separação e/ou a morte de casais adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni*.

Desta forma, considerando a atividade inicial apresentada pelo extrato hidroalcoólico dos frutos da Bardana, bem como o potencial esquistossomicida demonstrado pelas lignanas dibenzilbutirolactônicas, o prosseguimento dos trabalhos tornou-se imprescindível com a realização do isolamento e identificação do(s) metabólito(s) secundário(s) ativo(s) presente(s) no extrato hidroalcoólico dos frutos da *A. lappa* L. e a avaliação esquistossomicida *in vitro* deste extrato e dos seus constituintes principais.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1. Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar as atividades esquistossomicidas *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto e de substâncias majoritárias isoladas dos frutos de *A. lappa* L., visando encontrar moléculas e/ou protótipos naturais com potencial esquistossomicida.

Para esses propósitos, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Obter o extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *Arctium lappa* L.;
- Realizar o estudo fitoquímico dos frutos da *Arctium lappa* L. visando o isolamento, a purificação e a identificação das principais substâncias presentes no extrato hidroalcoólico, principalmente os lignóides;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *Arctium lappa* L. em diferentes concentrações, uma vez que sua atividade esquistossomicida já foi identificada em triagem preliminar realizada por este grupo de pesquisa.
- E realizar também o ensaio esquistossomicida *in vitro* de seus principais metabólitos secundários isolados e identificados.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1. Instrumentação e materiais cromatográficos:

O Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, dispôs dos seguintes equipamentos para a realização deste trabalho:

- Rotaevaporador (Fisaton<sup>®</sup>, modelo 558); bomba à vácuo (Primatec<sup>®</sup>, modelo 121) e Banho Ultratermostático (Cientec<sup>®</sup>, modelo CT-281-28)
- Aparelho de Soxhlet com manta aquecedora Marconi<sup>®</sup>.
- Bomba *Bunchi V-700*.
- Câmara de Ultravioleta 254e 366 nm (U.V. SL-204, Solab Científica<sup>®</sup>).
- Balança semi-analítica (BL 320, Marte<sup>®</sup>).
- Balança analítica (AY 220, Marte<sup>®</sup>).

O Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, disponibilizou a utilização do espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/300 que opera em campo magnético de 300 MHz (RMN <sup>1</sup>H) e 75 MHz (RMN <sup>13</sup>C).

Para a realização do ensaio esquistossomicida, foram utilizados:

- Agitador de tubo, tipo Vortex (modelo AP 56, Phenix<sup>®</sup>, Ltda.)
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Revco<sup>®</sup>, Thermo Electron Corporation)
- Estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon<sup>®</sup>).
- Microscópio Confocal de Varredura a laser (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Carl Zeiss Inc.)

Nos processos cromatográficos, o tipo de fase estacionária utilizada variou conforme a separação desejada:

- para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel GF<sub>254</sub>, com espessura de 25 mm (TLC Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm, Merck®).

- para cromatografia em coluna clássica (CC) utilizou-se como adsorvente sílica gel (porosidade de 60 Å, 40-63 µm, Aldrich®) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

- para cromatografia em coluna clássica (CC) no preparo das amostras utilizou-se como adsorvente sílica gel (porosidade de 60 Å, 70-230 mesh, Aldrich®).

- para cromatografia em coluna *flash* (CF) utilizou-se como adsorvente sílica gel (40-60 µm, Silicycle®) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

#### 3.1.1. Materiais e Reagentes:

O grau de pureza dos solventes, reagentes e meios de cultura utilizados variou de acordo com a finalidade:

- para as extrações, partições e sistemas cromatográficos, utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas *Vetec*, *Cromato Produtos Químicos LTDA*, *Quemis*, *Isofar* e *Alphatec* e grau técnico previamente submetido à destilação fracionada;

- para a realização dos ensaios biológicos *in vitro*, utilizou-se meios de culturas e reagentes de pureza adequada, dos seguintes fornecedores, *Merck*, *Cultilab*, *Sigma-Aldrich*).

- Para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas utilizaram-se vapores de iodo, solução de anisaldeído sulfúrico, solução de vanilina em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm).

- Nas análises espectroscópicas utilizou-se clorofórmio deuterado: CHOLOFORM-D (D, 99,8%), Cambridg Isotope Laboratories, Inc.

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

O material vegetal foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia - UFJF, no município de Juiz de Fora – MG (21°46'39.48" S; 43°22'00.10" O). A coleta do material foi realizada no mês de fevereiro de 2011.

A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número de tombo 37.197, sigla VIC e identificada por Fernanda Souza, farmacêutica do Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

### **3.3. Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *Arctium lappa* L.:**

Após a separação dos frutos, este material vegetal foi submetido à secagem por 15 dias em temperatura ambiente. Foram obtidos 243,0 g de frutos secos.

A pulverização dos frutos foi realizada em moinho de facas e o pó obtido (236,0 g) foi submetido à maceração, por período de 72 horas, em solução hidroalcoólica (etanol: água 96:4 v/v), seguido de filtração. Este processo foi repetido até esgotamento do material vegetal verificado pela clarificação do macerado. Foram obtidos 2 L de extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L.

As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas e transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e, então, concentradas com auxílio de rotaevaporador. O extrato obtido foi transferido para frasco previamente pesado, resultando em 20,27 g de extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *Arctium lappa* L. (AL).

### **3.4. Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto utilizando processo de partição líquido-líquido:**

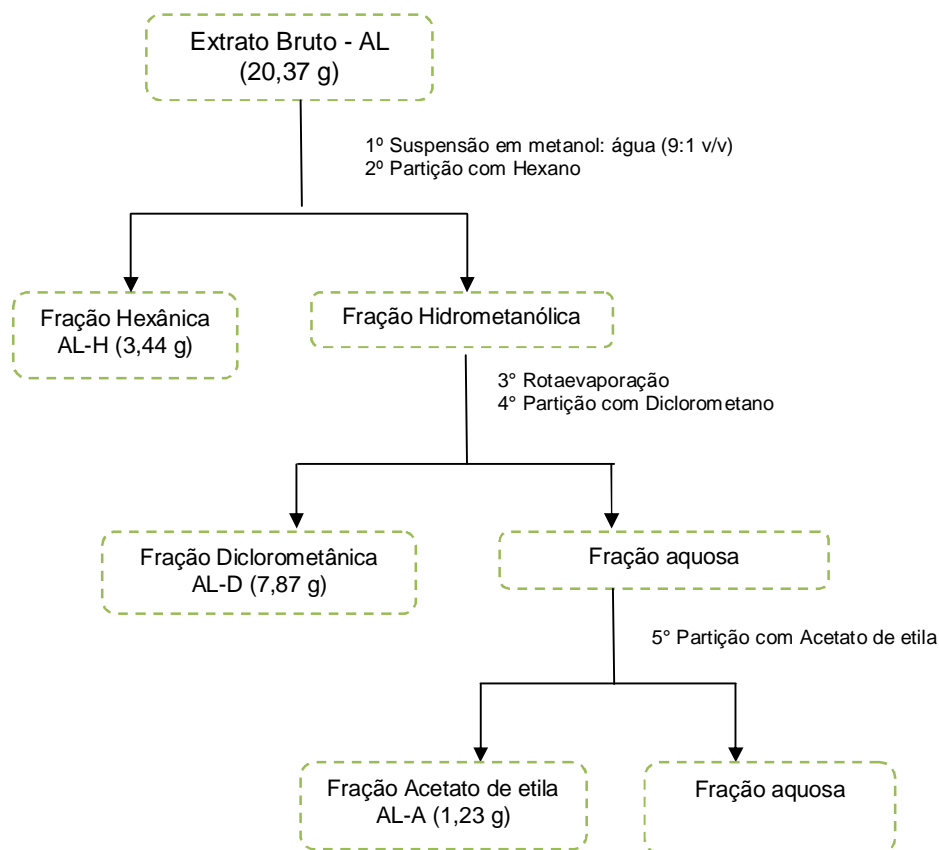
Com a finalidade de separação inicial de seus constituintes, o extrato hidroalcoólico bruto foi submetido a partições com solventes orgânicos (Fig. 20).

Assim, o extrato foi ressuspensionado em mistura de metanol e água (90:10 v/v). Cada 1 g do extrato foi ressuspensionado em cerca de 10 mL da mistura metanol-água. Após ressuspensão, este foi transferido para funil de separação e extraído com hexano por processo de partição líquido-líquido. A partição foi realizada até a clarificação da solução hexânica. A solução hexânica obtida foi adicionada sulfato de sódio anidro para eliminação da água e, em seguida, estas foram filtradas para balão de fundo redondo e foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40 °C, sendo em seguida transferidas para frascos previamente pesados e denominados de fração hexânica (AL-H).

A solução hidrometanólica restante foi inicialmente concentrada em rotaevaporador para eliminação de parte do metanol e, em seguida, particionada com diclorometano (totalizando 2 L). Às soluções diclorometânicas obtidas foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação da água. Em seguida, as soluções foram filtradas para balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40° C, sendo em seguida transferidas para frascos previamente pesados e denominados de fração diclorometânica (AL-D).

As soluções aquosas remanescentes foram particionadas com acetato de etila (2 L). As fases orgânicas em acetato de etila foram concentradas até a eliminação do solvente. O concentrado foi transferido para frascos previamente pesados e denominados de fração acetato de etila (AL-A). A solução aquosa restante foi acondicionada sob refrigeração.

O processo de fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto está resumido na figura 20.



**Figura 20.** Esquema geral do procedimento de partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos da *A. lappa* L.

As frações obtidas por meio de partição com solventes orgânicos foram analisadas por CCD, utilizando-se diversos sistemas de eluentes e diferentes tipos de reveladores (vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico e vapores de iodo), com a finalidade de se obter o perfil cromatográfico das substâncias presentes em cada fração. De acordo com a análise cromatográfica das frações obtidas no processo de partição líquido-líquido, a fração diclorometânica (AL-D) revelou a presença de compostos fluorescentes em UV (254 e 366 nm) e coloração com os diferentes tipos de reveladores sugerindo a presença de substâncias aromáticas.

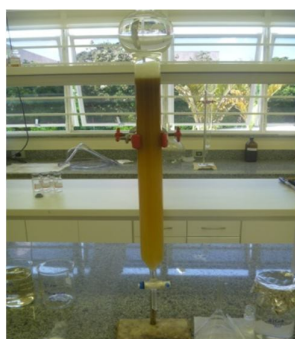
Sendo assim, a fração AL-D foi selecionada para o estudo fitoquímico para a separação e isolamento de seus constituintes (Fig. 22).

### 3.5. Estudo da fração diclorometânica - AL- D:

Parte desta fração (1,0 g) foi destinada a realização de ensaios biológicos e o restante (6,87 g), submetida à cromatografia em coluna (CC), com o intuito de se isolar os principais constituintes.

Assim, a fração AL-D (6,87 g) foi solubilizada em diclorometano e aplicada em coluna cromatográfica de 4 cm de diâmetro por 36 cm de altura e empacotada com 190 g de sílica gel até a de altura de 14,5 cm, conforme figura 21.

Utilizou-se como fase móvel misturas de diclorometano: metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ) em gradiente crescente de polaridade.



**Figura 21.** Cromatografia em Coluna da Fração AL-D. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN) - Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autora (2012).

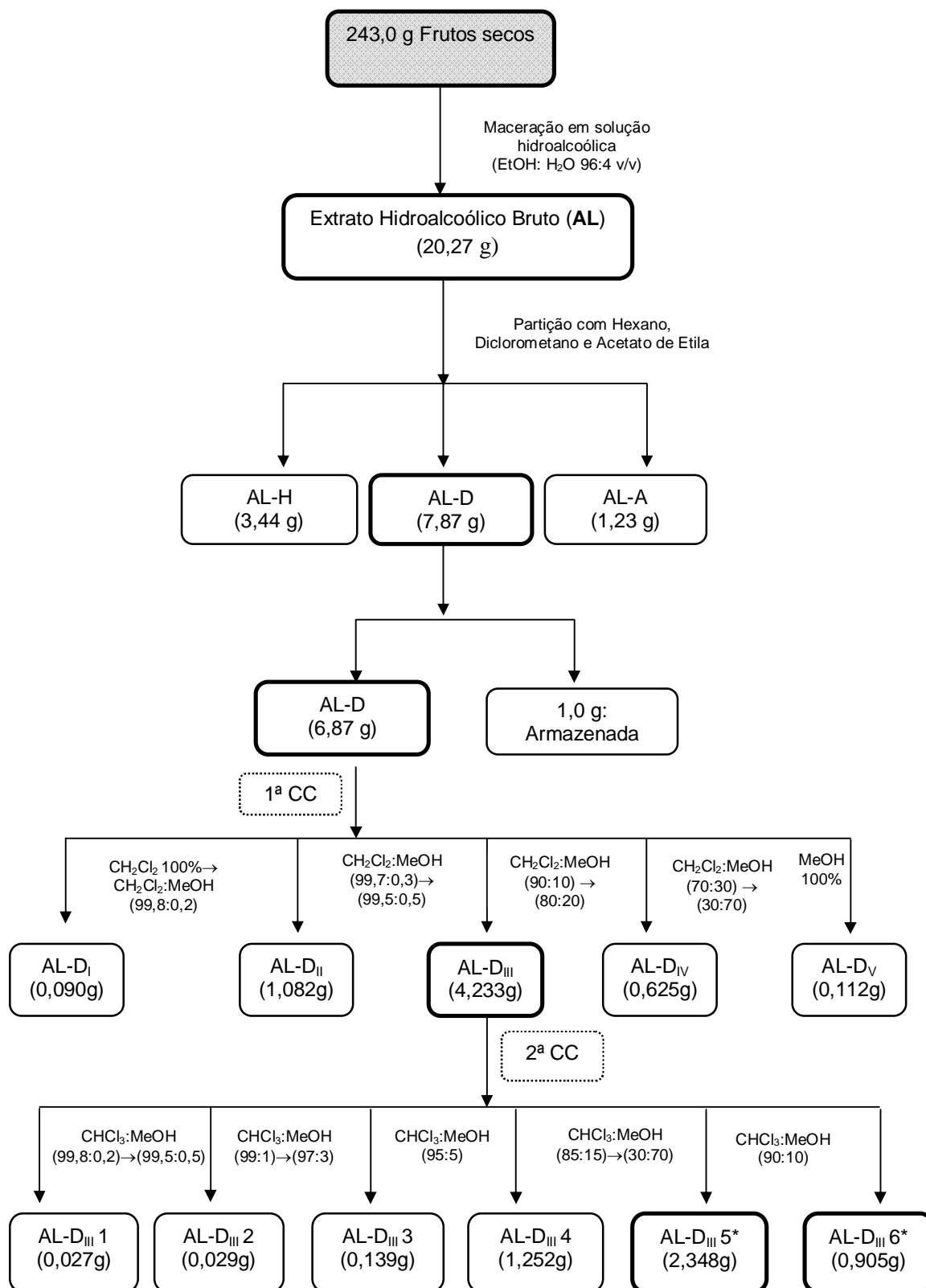
Foram coletadas 11 frações de 500 mL cada e, após análise por CCD das mesmas, foi possível agrupá-las em cinco novas frações, conforme a tabela 2 a seguir.

**Tabela 2.** Frações obtidas por CC da fração AL-D.

Eluentes	Frações	Massa (g)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 100% → $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99,8:0,2)	AL-D <sub>I</sub> (1-3)	0,090
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99,7:0,3) → (99,5:0,5)	AL-D <sub>II</sub> (4,5)	1,082
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (90:10) → (80:20)	AL-D <sub>III</sub> (6,7)	4,233
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (70:30) → (30:70)	AL-D <sub>IV</sub> (8-10)	0,625
MeOH 100%	AL-D <sub>V</sub> (11)	0,112

Fonte: Autora.

## Materiais e Métodos



**Figura 22.** Fluxograma do isolamento e purificação dos principais metabólitos dos frutos da *A. lappa* L.

### 3.5.1. Estudo da fração diclorometânica - AL- D<sub>III</sub>:

De acordo com o perfil cromatográfico obtido em CCD e, com o objetivo de se isolarem os compostos de interesse, a fração AL-D<sub>III</sub> foi submetida à cromatografia em coluna clássica. Assim, a fração AL-D<sub>III</sub> (4,233 g) foi solubilizada em mistura de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (99,8:0,2 v/v) e aplicada em coluna de 4 cm de diâmetro por 12,5 cm de altura de sílica, empacotada com 130 g de sílica gel. Foram coletadas 38 frações de 200 mL cada, utilizando-se como eluentes misturas de solventes com polaridades crescentes, conforme tabela 3.

As frações obtidas foram agrupadas conforme a semelhança do perfil cromatográfico apresentado em CCD (Tabela 3). Sendo que duas destas frações codificadas como AL-D<sub>III</sub> 5\* e AL-D<sub>III</sub> 6\*, por apresentarem apenas uma única mancha para cada fração na análise por CCD foram novamente agrupadas em AL-D<sub>III</sub> 5\* (3,253 g) e enviadas para identificação de sua estrutura química por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C.

**Tabela 3.** Frações obtidas por CC de AL-D<sub>III</sub>.

Eluentes	Subfrações	Massa (g)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (99,8:0,2) →(99,5:0,5)	AL-D <sub>III</sub> 1 (a-d)	0,027
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (99:1) →(97:3)	AL-D <sub>III</sub> 2 (e-g)	0,029
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (95:5)	AL-D <sub>III</sub> 3 (h-h')	0,139
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (85:15) →(30:70)	AL-D <sub>III</sub> 4 (j-q)	1,252
CHCl <sub>3</sub> :MeOH (90:10)	<b>AL-D<sub>III</sub>5*</b> (r,r')	3,253

Fonte: Autora.

#### 3.5.1.1. Hidrólise da substância isolada AL-D<sub>III</sub> 5\*:

A substância majoritária isolada do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Arctium lappa* L., denominada arctiina, é uma lignana dibenzilbutirolactônica que se caracteriza como o glicosídeo da arctigenina (ZHAO et al., 2009). Com o objetivo de se obter a aglicona deste heterosídeo foi realizada uma hidrólise ácida na substância AL-D<sub>III</sub> 5\* obtida e identificada anteriormente, conforme método descrito por (CHATURVEDULA e PRAKASH., 2011), com algumas modificações.



Cerca de 3 g da amostra foram solubilizadas em 250 mL de metanol 100%. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionada de igual volume de ácido sulfúrico a 5%. Esta mistura foi submetida a refluxo por 6 horas à temperatura de 35°C (Fig. 23).



**Figura 23.** Hidrólise sob refluxo da substância AL-D<sub>III</sub> 5\*. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN) - Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autora (2013).

Após refluxo e arrefecimento da solução, adicionou-se 20 g de carbonato de sódio e solução de hidróxido de sódio a 2M, suficiente para neutralizar a solução hidrolisada.

A solução neutralizada foi filtrada em papel de filtro e particionada com clorofórmio. A fração clorofórmica obtida foi concentrada em rotaevaporador obtendo-se 1,803 g de hidrolisado.

#### 3.5.1.2. Purificação da aglicona obtida a partir da hidrólise:

A fração hidrolisada (3,0 g) foi submetida à cromatografia *flash*, utilizando coluna de vidro (4 cm de diâmetro por 60 cm de altura) previamente empacotada com 90 g de sílica gel e como fase móvel a mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH em gradiente crescente de polaridade, sendo recolhidas frações de 50 mL cada. Os dados estão resumidos na tabela a seguir. Foram:

**Tabela 4.** Frações obtidas por CF do hidrolisado de AL-D<sub>III</sub> 5\*

Eluentes	Frações	Massa (g)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (98:2)	AL- H A <sup>(1-9)</sup>	0,011
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (98:2)	AL- H B <sup>(10-20)</sup>	0,945
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (97:3)	AL- H C <sup>(21-23)</sup>	0,923
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (95:5)	AL- H D <sup>(24-30)</sup>	0,021
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (90:10)	AL- H E <sup>(31-33)</sup>	0,062
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :EtOH (9:1) → CHCl <sub>3</sub> 100%	AL- H F <sup>(32-36)</sup>	0,008

Fonte: Autora.

A fração hidrolisada e purificada cromatograficamente foi reunida conforme perfil em CCD. Uma das frações purificadas, denominada, AL- H B foi escolhida para ser submetida à análise espectroscópica de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para a confirmação de sua identidade química.

### 3.5.2. Estudo da Fração Diclorometânica - AL-D<sub>II</sub>:

Dando prosseguimento ao isolamento de outras substâncias a fração AL-D<sub>II</sub> (1,082 g) foi submetida à cromatografia em coluna clássica. A amostra foi solubilizada em CHCl<sub>3</sub> e incorporada em 3g sílica gel utilizada como adsorvente. Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente até a secura com a eliminação do solvente. E assim, depositada no topo da coluna cromatográfica de vidro de 4 cm de diâmetro, empacotada com 180 g de sílica gel em 16 cm de altura.

Foram coletadas 85 frações de 100 mL cada, utilizando-se como eluentes misturas de solventes com polaridades crescentes, conforme Tabela 5.

Após análise por CCD, reuniram-se as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes (Tabela 5).

Tabela 5. Frações obtidas por CC de AL-D<sub>II</sub>.

Eluentes	Subfrações	Massa (g)
Hex:AcOEt (80:20)	AL-D <sub>II</sub> 1 <sup>(1,2,4)</sup>	0,020
Hex:AcOEt (80:20)	AL-D <sub>II</sub> 2 <sup>(3)</sup>	0,009
Hex:AcOEt (80:20)	AL-D <sub>II</sub> 3 <sup>(5-7)</sup>	0,007
Hex:AcOEt (80:20) →(75:25)	AL-D <sub>II</sub> 4 <sup>(8-19)</sup>	0,032
Hex:AcOEt (7,5:2,5) →(6,5:3,5)	AL-D <sub>II</sub> 5 <sup>(20-45)</sup>	0,126
Hex:AcOEt (65:35) →(50:50)	<b>AL-D<sub>II</sub> 6</b> <sup>(46-58)</sup>	0,138
Hex:AcOEt (40:60) →(20:80)	AL-D <sub>II</sub> 7 <sup>(59-69)</sup>	0,151
AcOEt 100%	<b>AL-D<sub>II</sub> 8</b> <sup>(70-73)</sup>	0,234
AcOEt 100%	AL-D <sub>II</sub> 9 <sup>(74-80)</sup>	0,162
AcOEt:MeOH (90:10)	AL-D <sub>II</sub> 10 <sup>(81-85)</sup>	0,066

Fonte: Autora.

De acordo com perfil em CCD sob luz UV a fração AL-D<sub>II</sub> 6 foi selecionada para dar continuidade aos procedimentos de isolamento.

### 3.5.2.1. Estudo da fração diclorometânica - AL-D<sub>II</sub> 6:

A fração AL-D<sub>II</sub> 6 (0,138 g) foi solubilizada em CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO (9,5:0,5 v/v), mistura esta também utilizada como fase móvel inicial da CF.

Em seguida, aplicou-se a amostra solubilizada na FM, diretamente numa coluna *flash* de vidro (2 cm de diâmetro por 60 cm de altura), anteriormente empacotada com 47 g de sílica gel *flash* que atingiram 15 cm de altura na dentro da coluna de vidro.

Foram coletadas 117 frações de 10 mL cada, utilizando-se como eluentes misturas de solventes com polaridades crescentes, conforme Tabela 6.

Após análise por CCD, reuniram-se as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes (Tabela 6).

A substância isolada codificada como AL-D<sub>II</sub> 6-2 foi submetida à análise espectroscópica de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C para a identificação de sua estrutura química.

Tabela 6. Frações obtidas por CF de AL-D<sub>II</sub> 6.

Eluentes	Subfrações	Massa (g)
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO (95:5)	AL-D <sub>II</sub> 6-1 <sup>(1-8)</sup>	0,001
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO (95:5)	<b>AL-D<sub>II</sub> 6-2</b> <sup>(9-15)</sup>	0,046
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO (95:5)	AL-D <sub>II</sub> 6-3 <sup>(16-19)</sup>	0,004
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO (95:5) →(93:7)	AL-D <sub>II</sub> 6-4 <sup>(20-76)</sup>	0,023
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO (93:7) → Me <sub>2</sub> CO 100%	AL-D <sub>II</sub> 6-5 <sup>(77-117)</sup>	0,001

Fonte: Autora.

### 3.6. Avaliação *in vitro* da atividade esquistossomicida do extrato hidroalcoólico bruto e das substâncias isoladas dos frutos de *A. lappa* L.:

O extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *Arctium lappa* L. (AL) e as substâncias isoladas AL-D<sub>III</sub> 5\* (arctiina), AL-D<sub>II</sub> 6-2 e a hidrolisada, AL- H B (arctigenina) foram avaliadas quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* a frente dos vermes adultos de *S. mansoni*.

O ensaio esquistossomicida foi realizado pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo sob a coordenação e responsabilidade do Dr. Josué de Moraes e do Dr. Pedro Silva Pinto.

#### 3.6.1 Animais Utilizados e Manutenção do Ciclo Evolutivo do *Schistosoma mansoni*:

##### 3.6.1.1 Linhagem de Origem do Parasito:

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

##### 3.6.1.2 Animais Hospedeiros:

Os caramujos (hospedeiros intermediários) foram mantidos em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) com cerca de 20 litros de água decolorada, em

temperatura de 24 °C, e alimentados com alface fresca; os aquários eram arejados com bombas de 1,5 W (MORAES et al., 2009).

Os hamsters (hospedeiros definitivos) foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Adolfo Lutz. Eles foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica, alimentados com ração e água *ad libitum*. Esses roedores eram recém-desmamados, de um único sexo, com massa de aproximadamente 20 g aos 21 dias de idade. Os animais foram acomodados em maravalha com duas trocas semanais.

### 3.6.1.3 Manutenção do Ciclo Evolutivo de *Schistosoma mansoni*:

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com Pellegrino e Katz (1968). Os hamsters foram infectados subcutaneamente (com seringa de 1 ml) com cerca de 150 cercárias. Após 49 dias, os roedores foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada dos ovos presentes no fígado e, posteriormente obtermos os 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.

Após lavagens dos ovos por decantações sucessivas, 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 utilizou-se 8 miracídios por caramujo. Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de cultura de células de 24 poços contendo água filtrada. A exposição do molusco aos miracídios foi realizada sob a luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W) a uma distância de aproximadamente 30 cm, durante 3 a 4 horas. Tal procedimento promove aumento da temperatura para cerca de 30 °C.

Após 35 a 40 dias, os caramujos foram examinados, colocando-os individualmente em placas de 24 poços e expostos à luz artificial para a eliminação das cercárias, durante 2 a 3 horas. Os exemplares infectados foram protegidos da

luz com a colocação de papel escuro em torno do aquário para evitar a liberação de cercárias (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

Para infecção do hospedeiro definitivo, cerca de 30 caramujos infectados foram transferidos para um recipiente de vidro tipo Becker contendo água dechlorada e expostos à luz artificial para liberação de cercárias. Para concentração cercariana, os parasitas foram transferidos para tubos de ensaio em vidro com capacidade de 40 ml parcialmente protegidos da luz com papel alumínio, de modo que a entrada de luz era somente no ápice. As cercárias foram utilizadas na infecção dos hamsters (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

#### 3.6.1.4. Recuperação dos Vermes Adultos de *S. mansoni*:

Os vermes adultos de *S. mansoni*, com 49 dias de idade, foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático como descrito por Smithers e Terry (1965). A perfusão foi realizada com meio RPMI 1640 contendo L-glutamina e vermelho de fenol (pó para preparo de 1 L) e heparina sódica 5 UI/mL. Os hamsters foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, foi realizada uma secção longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. A veia porta foi seccionada e, com o auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica, foi injetado meio de cultura diretamente no coração do animal para coleta dos vermes adultos (SMITHERS e TERRY, 1965).

#### 3.6.2. Preparo das Amostras e Materiais Utilizados no Ensaio Esquistossomicida:

As amostras testadas no ensaio esquistossomicida *in vitro* foram: o AL (100,9 mg) e a substância isolada AL-D<sub>III</sub> 5\* (arctiina), AL-D<sub>II</sub> 6-2 e AL- H B (arctigenina - 1,5 mg), todas inicialmente foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 100% (DMSO). Posteriormente adicionou-se DMSO 5% (v/v) em meio RPMI até a concentração de 5 mg/mL do AL e 5 µM para a arctiina e arctigenina. A solubilização das amostras foi feita em agitador de tubo, tipo Vortex®.

Durante o preparo do meio "Roswell Memorial Park Institute" (RPMI 1640), 20 g de dextrose foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada esterilizada. Em seguida, adicionada ao mesmo sob agitação constante, completando-se o volume

com água para 1000 mL. Como agente tamponante acrescentou-se 2 g de bicarbonato de sódio para ajustar o pH em 7,4. O meio RPMI 1640 contém L-glutamina e vermelho de fenol (pó para preparo de 1L).

Para a esterilização, o meio foi submetido à filtração, sob vácuo, em membrana de 0,22 µm.

O filtrado foi recolhido em frascos de vidro estéreis, que foram vedados com filme plástico e envolvidos em papel alumínio. O meio foi então armazenado a 4 °C até a sua utilização.

### 3.6.3. Ensaios *in vitro* com Vermes Adultos de *Schistosoma mansoni*:

Os ensaios *in vitro* com os vermes adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os pares de vermes obtidos dos hamsters por perfusão foram lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640, esterilizado por filtração, contendo penicilina 200 UI/mL, estreptomicina 200 µg/L e anfotericina B 2 µg/mL; procedimento este feito em placa de Petri de polietileno estéril (90 mm x 15 mm).

Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos para placa de cultura de células com 24 poços, cada qual contendo um casal de verme em 2 ml de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 µM. (DE MORAES et al., 2011; 2013a, 2013b, 2013c, MORAES et al., 2011; MORAES, 2012).

O AL foi diluído nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, em meio RPMI 1640 contendo 5% de DMSO (v/v), sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. Da mesma forma, a substância isolada AL-D<sub>III</sub> 5\* foi diluída nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µM, também em meio de RPMI 1640 contendo 5% de DMSO (v/v) e a concentração final de DMSO também não foi superior a 0,5%.

O Praziquantel 10 µM foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 0,5% foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%

e foram monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (DE MORAES et al., 2011; 2013a, 2013b, 2013c, MORAES et al., 2011; MORAES, 2012).

#### 3.6.4. Avaliação do Ensaio Esquistossomicida:

As culturas de vermes adultos foram continuamente monitoradas por microscopia ou lupa. Para avaliar a toxicidade do extrato e das substâncias testadas sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: mortalidade, atividade motora (motilidade) e alterações morfológicas no tegumento (MORAES, 2012).

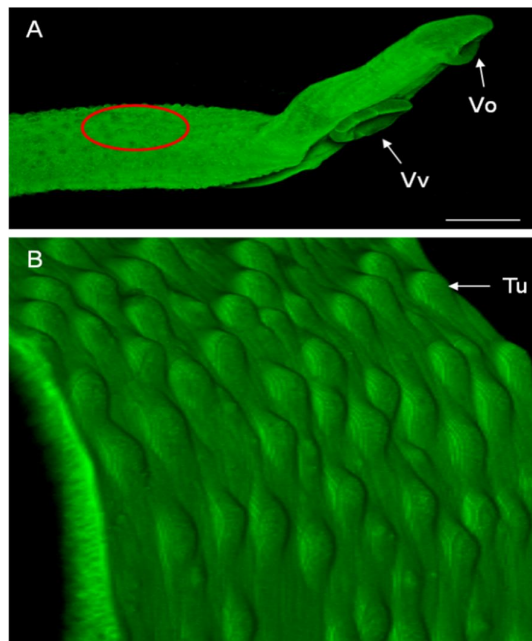
A mortalidade dos vermes foi julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos (MORAES, 2012). No término do período de incubação (5 dias) ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados e analisados em microscopia confocal.

A redução da atividade motora e as alterações morfológicas foram qualitativamente avaliadas como “leve” ou “significativa”. No primeiro caso utilizou-se um estereomicroscópio, enquanto que, no segundo, um microscópio invertido, usando técnica de campo claro ou contraste de interferência (DE MORAES et al., 2011; MORAES et al., 2011, MORAES, 2012).

O efeito das amostras testadas sobre o tegumento de adultos de *S. mansoni* foi monitorado com microscópio confocal de varredura a laser. 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) como descrito por Moraes et al. (2009, 2011). A solução AFA consiste em uma mistura de ácido acético glacial, formaldeído, etanol (95%) e água destilada nas proporções, respectivamente (2: 9: 30: 59 v/v) (MORAES, 2012).

Durante a análise microscópica foram capturadas imagens tridimensionais usando o software LSM Image Browser (Zeiss). Pelo menos três áreas distintas do mesmo parasita foram analisadas, conforme ilustrado na figura 24.





**Figura 24.** Região dorsal de um macho de *Schistosoma mansoni*, onde é avaliado o efeito de compostos 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, o local que é feita a contagem dos tubérculos. Barra = 500  $\mu\text{m}$ . **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: Moraes (2012).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 4.1. Isolamento e purificação dos metabólitos de interesse:

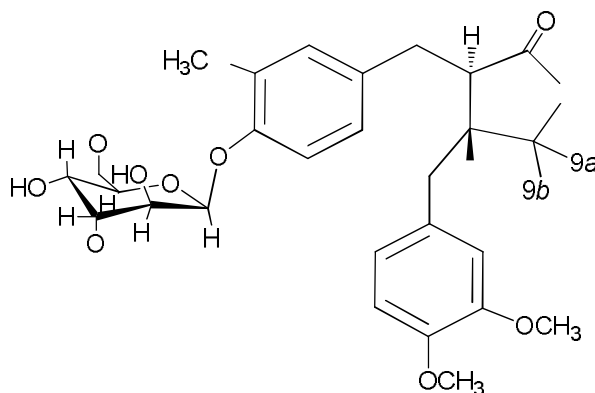
Após produção do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L. (AL), foi realizada partição líquido-líquido deste extrato para obtenção de suas frações orgânicas. Dando prosseguimento ao processo de isolamento e purificação dos metabólitos de interesse, a fração diclorometânica selecionada foi submetida a vários processos cromatográficos, resultando no isolamento das substâncias AL-D<sub>III</sub>-5\* (3,253 g) e AL- D<sub>II</sub> 6-2 (0,046 g). Uma parte da substância isolada AL-D<sub>III</sub>-5\* foi submetida à hidrólise, obtendo-se a aglicona, a qual foi codificada como AL- H B.

As substâncias: AL-D<sub>III</sub>-5\*, AL- D<sub>II</sub> 6-2 e AL- H B foram submetidas às análises espectroscópicas e identificadas, conforme descrito a seguir.

### 4.2. Determinação e identificação estrutural das substâncias isoladas:

A identificação estrutural das substâncias anteriormente descritas foi realizada mediante a análise dos dados espectroscópicos obtidos e comparação com os dados publicados na literatura.

#### 4.2.1. Substância isolada AL- D<sub>III</sub>-5\*:



**Figura 25.** Estrutura química da substância isolada AL-D<sub>III</sub>-5\* e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctigenina 4'-O-glicosídeo).

Esta substância, isolada a partir da fração diclorometânica do AL, teve sua identidade determinada a partir da análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$ , (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e confirmada por meio da comparação com dados de referência obtidos na literatura (RAHMAN et al., 1990).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da AL- DI<sub>III</sub>-5\* (Fig. 26) permitiu observar um multipeto centrado em  $\delta$  2,5 ppm, integrado para 4 H, sendo atribuído aos hidrogênios metilênicos H-7 e metínicos H-8 e H-8' (Tabela 7). Já os hidrogênios metilênicos H-7' ocorrem como um simpleto largo em  $\delta$  2,81 ppm. Esta atribuição está de acordo com os dados previamente publicados, os quais descrevem os deslocamentos químicos para esta substância (CSAPI et al., 2010; WANG et al., 2009). O sinal presente em  $\delta$  4,09 (1H, t) foi atribuído ao hidrogênio metilênico H-9a, enquanto H-9b ocorre ao redor de  $\delta$  3,7 ppm. No entanto, este sinal no espectro parece estar sobreposto aos sinais dos hidrogênios da glicose (CSAPI et al., 2010; WANG et al., 2009; WEBER, 2005). De acordo com a literatura, o deslocamento químico distinto para os hidrogênios H-9 indica a orientação *trans* assumida pelas posições 8-8' do anel lactônico (ZHAO et al., 1999). Pode-se observar também a ocorrência de três simpletos, com integração para três hidrogênios cada, em  $\delta$  3,64; 3,76 e 3,82, os quais são característicos de grupos metoxilas ligados a anéis aromáticos. Já o duplete em  $\delta$  4,79 ppm (Glc-1, 1H,  $J= 7,1$ ) foi atribuído ao hidrogênio da ligação o-glicosídica. Os demais hidrogênios da molécula de glicose (Glc-2 a Glc-6) encontram-se com os sinais sobrepostos aos das metoxilas, entre  $\delta$  3,80 e 3,60 ppm (CSAPI et al., 2010; RAHMAN et al., 1990; WANG et al., 2009).

Ainda, pode-se observar a presença de sinais na região de  $\delta$  6,90 - 6,50 ppm, os quais foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos. Pode-se observar a ocorrência de dois dupletos, integrados para 1H cada, em  $\delta$  6,89 ( $J= 8,00$  Hz) e em  $\delta$  6,74 ( $J= 8,29$  Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-5' e H-5, respectivamente. Já os hidrogênios H-6 e H-6' ocorrem como um duplete em  $\delta$  6,55 ppm (2H,  $J= 10,72$  Hz), enquanto os hidrogênios H-2' e H-2 aparecem como dois simpletos em  $\delta$  6,52 e  $\delta$  6,48, respectivamente. (RAHMAN et al., 1990).

## Resultados e Discussão

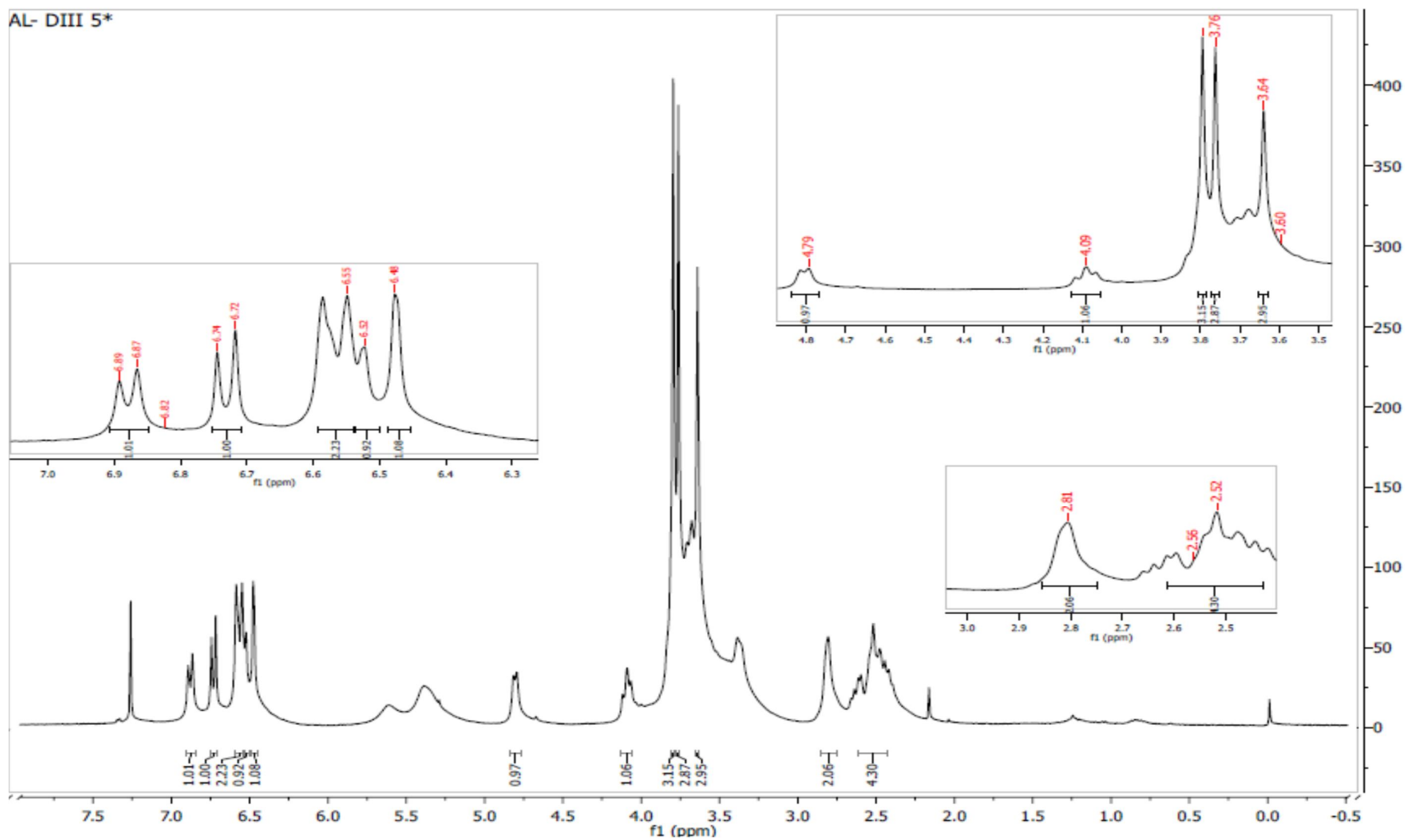


Figura 26. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância AL- DIII 5\* (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## Resultados e Discussão

**Tabela 7.** Dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , da substância AL- DI<sub>III</sub>-5\*, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm, multiplicidade),  $J$  em Hz.

Hidrogênios	AL- DI <sub>III</sub> -5*	Arctiina <sup>a</sup>
		(arctigenina 4'-O-glicosídeo)
<b>2</b>	6,48 (s, 1H)	6,48 (s, 1H)
<b>2'</b>	6,52 (s, 1H)	6,59 (s, 1H)
<b>5</b>	6,74 (d, 1H; $J=8,3$ )	6,74 (d, 1H; $J= 8,1$ )
<b>5'</b>	6,89 (d, 1H; $J= 8,0$ )	6,90 (d, 1H; $J= 8,1$ )
<b>6, 6'</b>	6,55 (d, 2H; $J= 10,7$ )	6,54 (d, 1H; $J= 8,2$ ; H-6); 6,57 (d, 1H; $J= 8,2$ ; H-6')
<b>7</b>	2,52 (m, 2H)	2,48 (m, 2H)
<b>7'</b>	2,81 (s, 2H)	2,81 (m, 2H)
<b>8, 8'</b>	2,52 (m, 2H)	2,52 (m, 2H)
<b>9a</b>	4,09 (t, 1H; $J= 7,9$ )	4,10 (t, 1H; $J=7,9$ )
<b>9b</b>	-	3,69 (1H, dd, $J_1= 8,9$ e $J_2= 2,0$ )
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	3,82; 3,76; 3,64 (s, 3H)	3,80; 3,77; 3,65 (s, 3H)
<b>Glc-1</b>	4,79 (d, 1H; $J= 7,1$ )	4,82 (d, 1H; $J= 6,3$ )

<sup>a</sup> CSAPI et al., 2010. Fonte: Autora.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) desta substância (Fig. 27), permitiu observar vinte e cinco sinais na região entre  $\delta$  34,5 e 178,8 ppm (Tabela 8). Destes, doze sinais pertencem a carbonos aromáticos, indicando a ocorrência de dois anéis aromáticos distintos. Outros seis sinais foram atribuídos aos carbonos da glicose presentes nesta substância. Além disso, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  demonstrou a presença de um sinal em  $\delta$  71,3 ppm, o qual foi atribuído ao C-9, bem como um sinal em  $\delta$  178,8 ppm, o qual é característico do carbono carbonílico C-9' do anel butirólactônico. Já os carbonos metínicos C-8 e C-8' apresentam-se com deslocamentos químicos de  $\delta$  41,3 e  $\delta$  46,5 ppm, respectivamente, enquanto os carbonos metilênicos C-7 e C-7' ocorrem em  $\delta$  38,0 e  $\delta$  34,5 ppm, respectivamente. Os sinais referentes aos grupos metoxílicos ocorrem ao redor de  $\delta$  56,0 ppm.

Destacamos ainda o carbono Glc-1, que faz parte da ligação o-glicosídica ocorre em  $\delta$  101,8. Devido à ligação com o oxigênio, átomo eletronegativo, que promove a desblindagem dos elétrons do núcleo, este carbono apresenta valor

de deslocamento químico mais alto do que os demais carbonos da glicose ( $\delta$  61,5 e  $\delta$  76,2 ppm) (CSAPI et al., 2010; RAHMAN et al., 1990; WANG et al., 2009).

## Resultados e Discussão

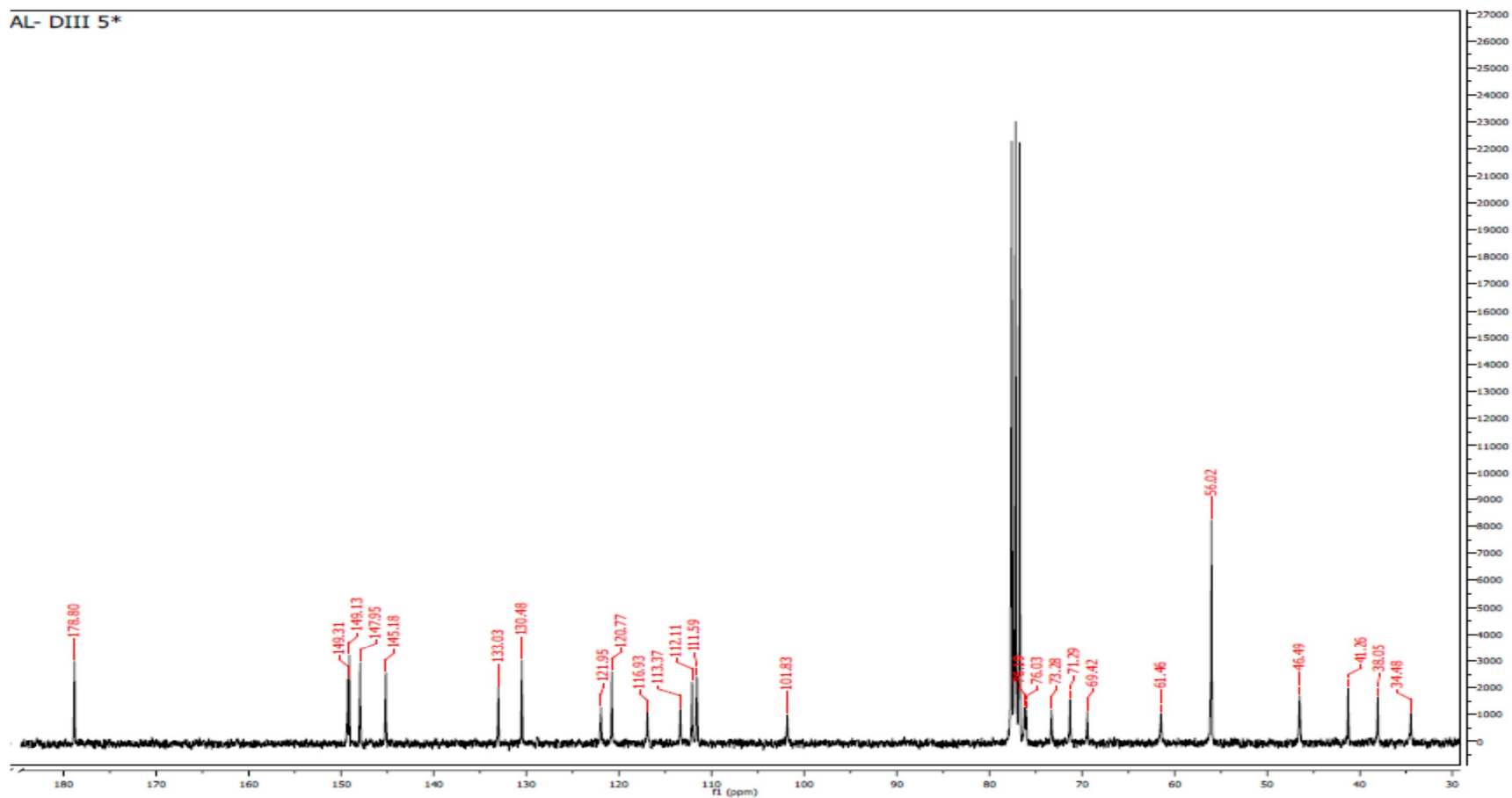


Figura 27. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AL- D<sub>III</sub>-5\* (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

*Resultados e Discussão*

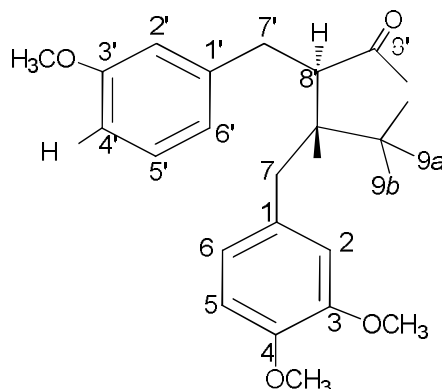
**Tabela 8.** Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , da substância AL- DI<sub>III</sub>-5\*, a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm).

Carbono	AL- DI <sub>III</sub> -5*	Arctiina <sup>a</sup> (arctigenina 4'-O-glicosídeo)
1	130,5	130,4
1'	133,0	133,1
2	112,1	112,1
2'	113,4	113,3
3	149,3	149,3
3'	149,1	149,1
4	147,9	147,9
4'	145,2	145,2
5	111,6	111,6
5'	117,0	113,3
6	120,8	120,7
6'	122,0	121,8
7	38,0	37,9
7'	34,5	34,4
8	41,3	41,1
8'	46,5	46,4
9	71,3	71,2
9'	178,8	178,6
O-CH <sub>3</sub>	56,0	55,3; 55,3; 55,5
Glc-1	101,8	101,9
Glc-2	73,3	73,2
Glc-3	76,0	76,7
Glc-4	69,4	69,4
Glc-5	76,2	76,9
Glc-6	61,5	61,5

<sup>a</sup>WANG et al., 2009. Fonte: Autora.

De posse desde dados e comparações com aqueles previamente publicados na literatura, podemos inferir que a substância isolada AL- DI<sub>III</sub>-5\* se trata da lignana dibenzilbutirolactônica arctiina (arctigenina 4'-O-glicosídeo).



4.2.2. Substância isolada AL- D<sub>II</sub> 6-2:

**Figura 28:** Estrutura química da substância isolada AL-D<sub>II</sub> 6-2 e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctigenina.

A substância AL-D<sub>II</sub> 6-2 teve sua estrutura determinada a partir da análise espectroscópica dos dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), bem como comparação com dados previamente publicados na literatura (RAHMAN et al., 1990).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de AL-D<sub>II</sub> 6-2 (Fig. 29) (Tabela 9) evidencia a presença de um multipletto, integrado para 4H, centrado em  $\delta$  2,5, o qual foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-7 e aos hidrogênios metínicos H-8 e H-8'. Já os hidrogênios H-7' ocorrem com um duplodupletto em  $\delta$  2,92 ppm (2H,  $J=$  10,71 e 5,2 Hz) (CSAPI et al., 2010; WANG et al., 2009). Similarmente, os hidrogênios H-9a e H-9b ocorrem, como duplodupletos, com deslocamentos químicos em  $\delta$  4,14 e  $\delta$  3,90 ppm, respectivamente.

De acordo com a literatura, esta diferença no deslocamento químico entre os hidrogênios H-9 indica a orientação *trans* assumida nas posições 8-8' do anel lactônico (WEBER, 2005, ZHAO et al., 1999). Já os dois simpletos, ao redor de  $\delta$  3,8 ppm, foram atribuídos aos três grupos metoxilas presentes na estrutura (RAHMAN et al., 1990).

Os hidrogênios aromáticos H-5' e H-5 podem ser observados como dupletos em  $\delta$  6,80 ppm (1H,  $J=$  7,9 Hz) e  $\delta$  6,73 ppm (1H,  $J=$  8,2 Hz),

respectivamente, enquanto os hidrogênios H-2 e H-2' ocorrem como dupletos em  $\delta$  6,62 ppm (H-2',  $J= 1,9$  Hz) e 6,45 ppm (H-2,  $J= 2,0$  Hz). Já os hidrogênios H-6 e H-6' ocorrem como duplodubletos em  $\delta$  6,55 ppm (1H,  $J= 8,2$  e  $1,9$  Hz) e  $\delta$  6,59 (1H,  $J= 8,1$  e  $J= 1,9$  Hz), respectivamente. Estas atribuições estão de acordo com os dados espectroscópicos previamente publicados para esta substância (KOUBAA et al., 1999; RHAMAN et al, 1990; ZHAO et al., 1999; WANG et al., 2009).

## Resultados e Discussão

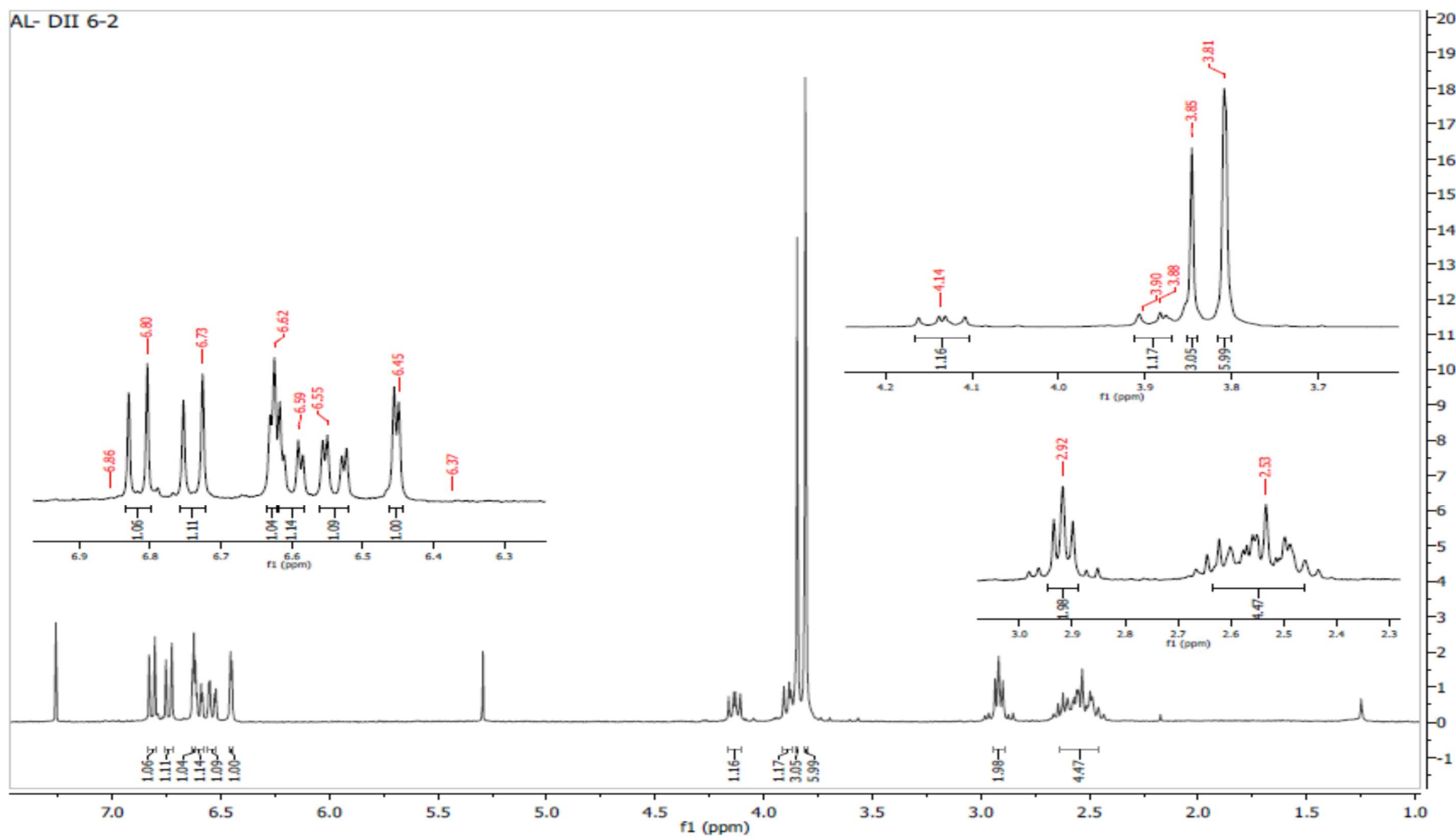


Figura 29: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância AL- DII 6-2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 9.** Dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , das substâncias AL- D<sub>II</sub> 6-2, a 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm, multiplicidade),  $J$  em Hz.

Hidrogênio	AL- D <sub>II</sub> 6-2	Arctigenina <sup>a</sup>
<b>2</b>	6,45 ( <i>d</i> , 1H, $J=2,0$ )	6,46 ( <i>d</i> , 1H, $J=2,0$ )
<b>2'</b>	6,62 ( <i>d</i> , 1H, $J=1,9$ )	6,64 ( <i>d</i> , 1H, $J=2,0$ )
<b>5</b>	6,73 ( <i>d</i> , 1H; $J=8,2$ )	6,74 ( <i>d</i> , 1H; $J=8,2$ )
<b>5'</b>	6,80 ( <i>d</i> , 1H; $J=7,9$ )	6,82 ( <i>d</i> , 1H; $J=7,9$ )
<b>6</b>	6,55 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=8,2$ e $J_2=1,9$ )	6,54 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=8,2$ e $J_2=2,0$ )
<b>6'</b>	6,59 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=8,1$ e $J_2=1,9$ )	6,61 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=7,9$ e $J_2=2,0$ )
<b>7</b>	2,53 ( <i>m</i> , 2H)	2,55 ( <i>m</i> , 2H)
<b>7'</b>	2,92 ( <i>dd</i> , 2H; $J_1=10,71$ e $J_2=5,2$ )	2,94 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=9,3$ e $J_2=6,7$ )
<b>8, 8'</b>	2,53 ( <i>m</i> , 2H)	2,55 ( <i>m</i> , 2H)
<b>9a</b>	4,14 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=9,0$ e $J_2=6,8$ )	4,15 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=9,3$ e $J_2=6,7$ )
<b>9b</b>	3,90 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=9,2$ e $J_2=7,1$ )	3,89 ( <i>dd</i> , 1H; $J_1=9,3$ e $J_2=7,1$ )
<b>O-CH<sub>3</sub></b>	3,85 ( <i>s</i> ; 3H); 3,81( <i>s</i> ; 6H)	3,85 ( <i>s</i> ; 3H); 3,81( <i>s</i> ; 6H)

<sup>a</sup> KOUBAA et al., 1999. Fonte: Autora.

Pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 30) pode-se observar a presença de dezenove sinais na região entre  $\delta$  34,2 – 178,5 ppm (Tabela 10), sendo que doze destes sinais foram atribuídos a carbonos aromáticos, indicando a ocorrência de dois anéis aromáticos distintos na molécula. O sinal em  $\delta$  71,0 ppm foi atribuído a C-9, enquanto o carbono carbonílico C-9' ocorre em  $\delta$  178,5 ppm. Já os carbonos metínicos C-8 e C-8' ocorrem, respectivamente, em  $\delta$  40,7 e  $\delta$  46,3 ppm, enquanto os carbonos metílicos dos grupamentos metoxila aparecem em torno de  $\delta$  55,6 ppm. Já os deslocamentos atribuídos aos carbonos metilênicos C-7 e C-7' apresentam-se mais próximos, com valores de  $\delta$  37,9 e  $\delta$  34,2 ppm, respectivamente.

A partir destas considerações e comparação com os dados já descritos na literatura (KOUBAA et al., 1999; RHAMAN et al, 1990; ZHAO et al., 1999; WANG et al., 2009) podemos inferir que a substância isolada AL- D<sub>II</sub> 6-2 seja a lignana dibenzilbutirolactônica arctigenina.

## Resultados e Discussão

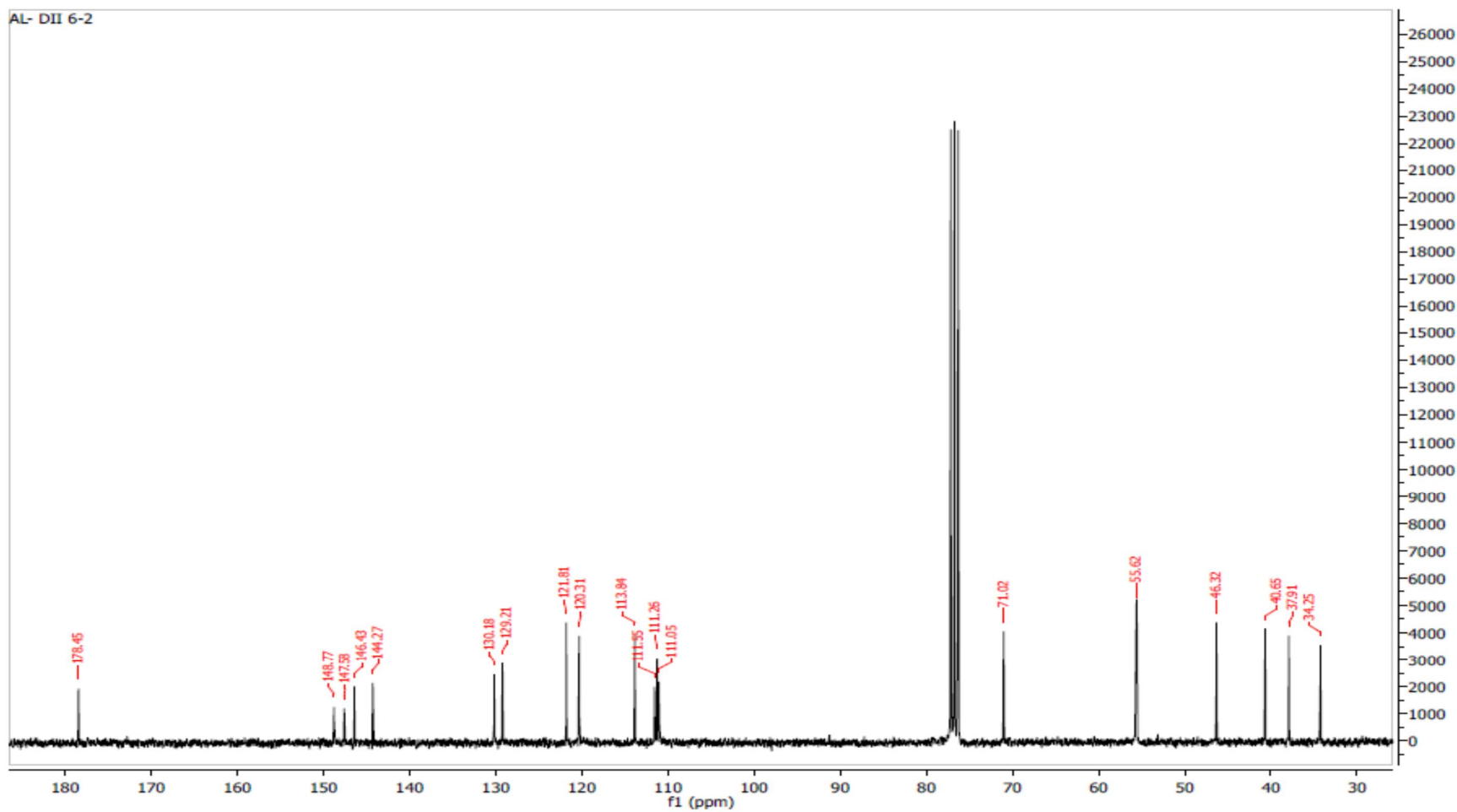


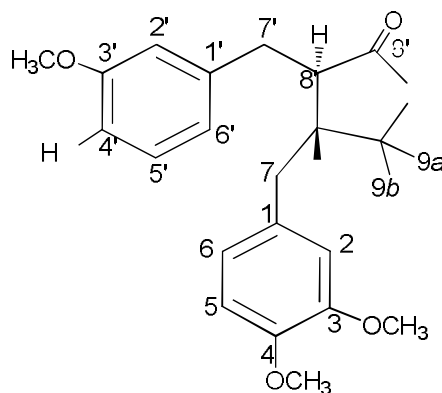
Figura 30: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AL- DII 6-2 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabela 10.** Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , das substâncias AL- D<sub>II</sub> 6-2 a 75 MHz em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm).

Carbono	AL- D <sub>II</sub> 6-2	Arctigenina <sup>a</sup>
1	130,2	129,5
1'	129,2	130,5
2	111,0	111,8
2'	111,5	111,6
3	148,8	147,8
3'	147,6	149,0
4	146,4	146,7
4'	144,3	144,6
5	111,3	111,3
5'	113,8	114,1
6	120,3	120,6
6'	121,8	122,1
7	37,9	38,2
7'	34,2	34,5
8	40,6	40,9
8'	46,3	46,6
9	71,0	71,3
9'	178,4	178,9
O-CH <sub>3</sub>	55,6	55,8; 55,9; 55,9

<sup>a</sup>KOUBAA et al., 1999. Fonte: Autora.

#### 4.2.3. Substância isolada AL- H B:



**Figura 31.** Estrutura química da substância isolada AL- H B e identificada como a lignana dibenzilbutirolactônica: arctigenina.

A substância AL- H B foi obtida a partir da hidrólise da AL- DI<sub>III</sub>-5\* (arctiina) apresentando-se na forma um sólido branco, conforme figura 32 (LIU et al., 2010). Após purificação, a estrutura química desta substância foi confirmada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e comparação com dados de referência obtidos na literatura (RAHMAN et al., 1990).



**Figura 32.** AL- H B: Sólido branco. Fonte: Núcleo de Investigação e Pesquisa de Produtos e Ativos Naturais (NIPPAN) - Faculdade de Farmácia/UFJF. Foto: Autora (2013).

A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Fig. 33) e <sup>13</sup>C (Fig. 34) obtidos para AL-H B, demonstrou que estes espectros são semelhantes àqueles obtidos para a substância AL-D<sub>II</sub> 6-2, anteriormente discutida no item 4.2.2. Sendo assim, a estrutura química de AL-H B foi identificada como a lignana arctigenina.

Desta forma, como esperado, foi alcançado êxito na hidrólise da arctiina (arctigenina 4'-O-glicosídeo) com a formação da aglicona desejada, a artigenina, a qual foi utilizada, posteriormente, em ensaios esquistossomicidas *in vitro* (KOUBAA et al., 1999; RHAMAN et al, 1990; ZHAO et al., 1999; WANG et al., 2009).

## Resultados e Discussão

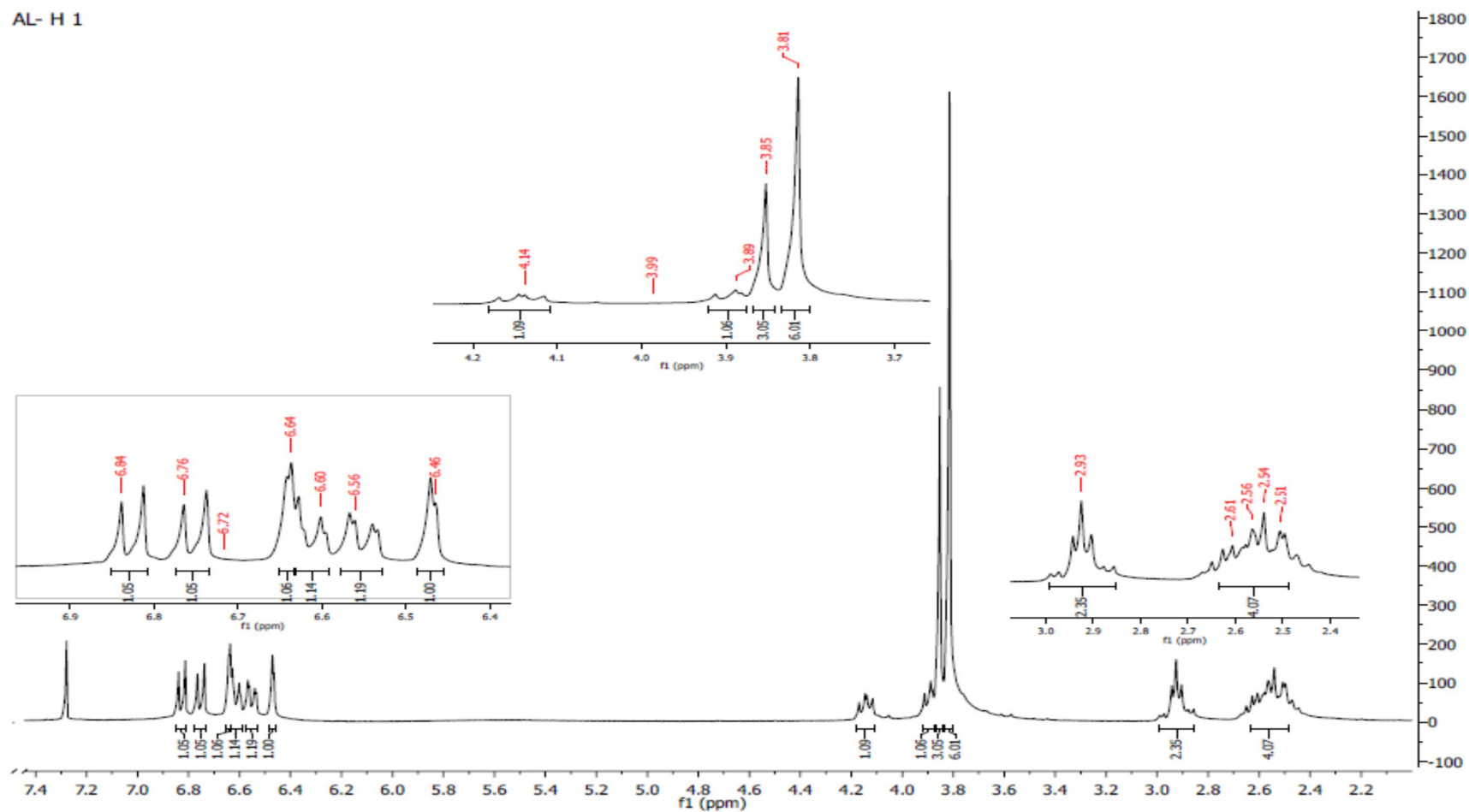


Figura 33: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância AL- H B (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



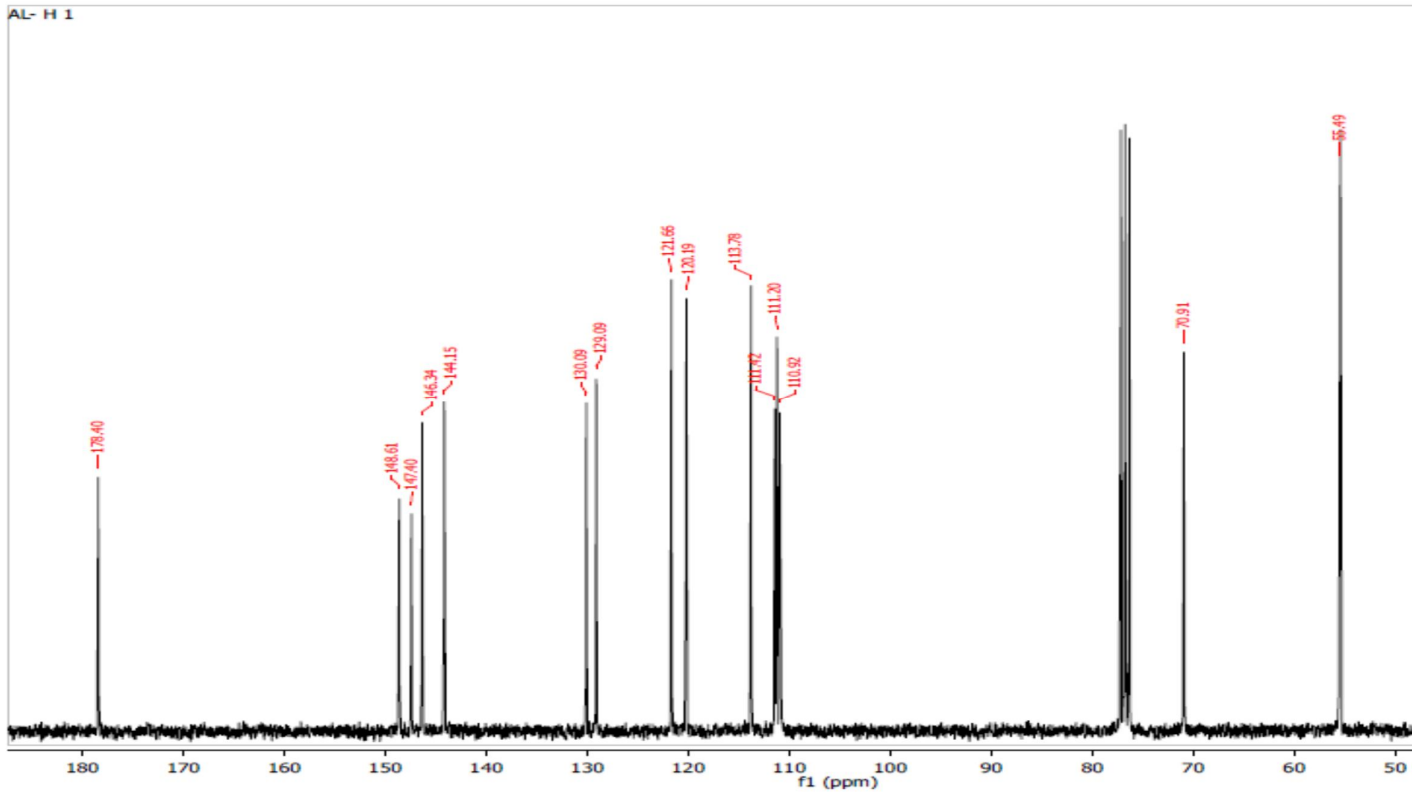


Figura 34: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AL- H B (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  em ppm).

#### **4.3. Atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L. (AL) frente a vermes adultos de *S. mansoni*.**

Diversos estudos já foram realizados sobre as atividades esquistossomicida de extratos brutos de plantas medicinais. Por exemplo, YOUSIF e Colaboradores (2007) testaram 346 extratos metanólicos, de diferentes espécies vegetais, contra vermes adultos de *S. mansoni*. Algumas das espécies avaliadas demonstraram promissora atividade esquistossomicida *in vitro*, entre elas os extratos metanólicos dos frutos do *Pinus canariensis* (Pinaceae) e da *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) que se demonstraram ativos frente aos vermes adultos de *S. mansoni* com  $LC_{50} = 12,80$  ppm e  $LC_{50} = 12,80$  ppm, respectivamente. Em 2011, KONÉ e Colaboradores realizaram a triagem da atividade biológica *in vitro* dos extratos de diversas plantas medicinais frente à esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni*. Vários extratos testados demonstraram potencial esquistossomicida, em especial o extrato hidroalcoólico das folhas de *Flabellaria paniculata* (Malpighiaceae), o qual foi capaz de causar a morte de 100% dos parasitos na concentração de 20 µg/mL.

No entanto, a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto e de metabólitos isolados de *A. lappa* L. ainda não foram relatados na literatura até o presente momento. Considerando o potencial esquistossomicida demonstrado pelas lignanas dibenzilbutirolactônicas, as quais estão presentes no extrato hidroalcoólico dos frutos da Bardana, este extrato foi avaliado *in vitro*, nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL, frente aos vermes adultos de *S. mansoni* (Tabela 11).

## Resultados e Discussão

**Tabela 11.** Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L. frente aos 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
Controle <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 10 µM	24	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
AL 200 µg/mL	24	0	0	100	100	0
	48	100	0	100	0	100
AL 100 µg/mL	120	100	0	100	0	100
	24	0	0	0	0	0
AL 100 µg/mL	48	0	0	100	100	0
	72	20	0	100	80	20
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
AL 50 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	96	0	50	0	0	0
AL 25 µg/mL	120	100	100	0	100	0
	24	0	0	0	0	0
AL 10 µg/mL	120	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 10 casais de vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI. <sup>c</sup> DMSO em meio RPMI.

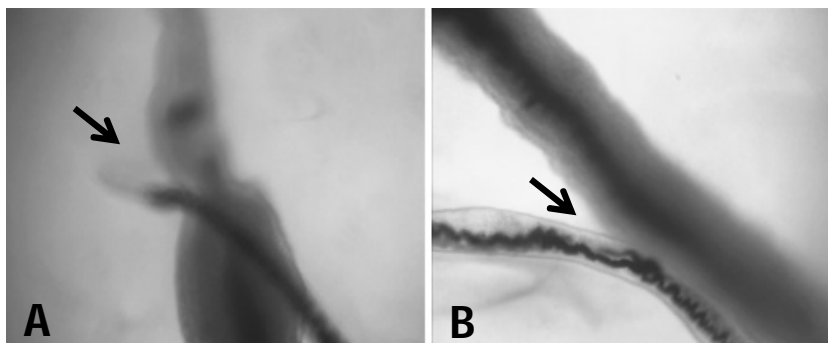
Os parâmetros mais comumente analisados durante um teste *in vitro* para helmintos são: desenvolvimento das lavas nos vermes adultos e a viabilidade dos adultos, em que são observadas a atividade motora, ovoposição, alterações tegumentares e em órgãos internos, acasalamento e morte dos parasitos (FREZZA, 2012). Neste ensaio foram observados os parâmetros de mortalidade, motilidade e alterações na morfologia do tegumento (MORAES, 2012).

O grupo controle negativo (meio RPMI 1640) e o DMSO 0,5 % não apresentaram qualquer alteração na atividade motora e no tegumento dos vermes adultos, conforme figura 35, comprovando que o meio e o veículo não exercem efeitos sobre os parasitos avaliados (DE MELO et al., 2011).

---

*Resultados e Discussão*

---



**Figura 35:** Controle negativo (meio RPMI 1640) e DMSO 0,5%: Em (A), casal de vermes adultos ainda acasalados. Em (A) marca as ventosas da porção oral e ventral. Em (B) a seta marca o tegumento de macho e fêmea, ainda translúcido. Aumento de 100x.

Com relação ao parâmetro de viabilidade, quando avaliado na concentração de 200 µg/mL, o extrato hidroalcoólico bruto de *A. lappa* L. (AL) foi capaz de causar a morte de 100% dos vermes adultos após 48 horas de incubação, com significativa alteração em seu tegumento. O mecanismo de ação do PZQ (1) não está completamente elucidado, mas provavelmente sua ação anti-helmíntica se deva à inibição da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> do *Schistosoma* sp., aumentando a permeabilidade da membrana do parasito aos cátions, principalmente ao cálcio, levando ao aumento da atividade muscular seguida de contração e paralisia. Tendo como consequência a separação dos vermes do tecido do hospedeiro. O praziquantel também causa a despolarização da membrana tegumentar do *Schistosoma* sp., redução do nível de ATP e da captura da glicose. No *S. mansoni* o PZQ (1) causa mudanças estruturais no tegumento, seguida pela vacuolização e destruição da superfície do mesmo o que resulta na exposição dos antígenos que sendo então, reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro causa a morte do parasito (ANDREWS, 1985; FREZZA, 2012).

Cabe ressaltar que o efeito apresentado pelo AL sobre a mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* foi semelhante ao observado pelo PZQ (1) a 10 µM, utilizado como controle positivo. No entanto, nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, o AL apresentou leve atividade, promovendo a morte total dos parasitos somente

## Resultados e Discussão

---

após 96 e 120 horas de incubação, respectivamente. Já na concentração de 10 µg/mL, o AL foi inativo. Resultado comparável ao obtido pela fração orgânica do extrato etanólico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), que nas concentrações mais altas de 400 e 200 µg/mL foram capazes de matar até 100% dos vermes adultos, enquanto que as concentrações menores de 100 e 50 µg/mL promoveram a morte de até 80% dos vermes adultos de *S. mansoni*, após 72 horas de incubação (FREZZA, 2012). Assim como em outros estudos *in vitro* realizados com extratos brutos de plantas brasileiras tais como: as pimentas (*Piper crassinerviun* e *Piper gaudichaudianum* - Piperaceae), na concentração inicial de 100 µg/mL e com *Potomorphe umbellata* (Piperaceae) conhecida como açariçoba e das pimentas: *Piper fuliginium*, *Piper diospyrifolium* e *Piper crassinerviun* na concentração de 50 µg/mL frente a vermes adultos de *S. mansoni* apresentaram mortalidade total dos vermes adultos após 120 horas de incubação. (MORAES, 2011; MORAES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010).

A literatura tem relatado efeitos semelhantes de outros extratos sobre a viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. De forma semelhante, por exemplo, os extratos alcoólicos brutos de *Artemisia annua* e *Artemisia absinthium* (Asteraceae) foram capazes de causar a morte de todos os vermes adultos de *S. mansoni* na mesma concentração do AL, a 200µg/mL (FERREIRA et al., 2011), sendo a atividade esquistossomicida destes extratos relacionada à presença de lactonas sesquiterpênicas, especialmente a artemisinina (3).

No único estudo encontrado com relação à atividade antiparasitária de *A. lappa* L., demonstrou que o extrato dos seus frutos, na concentração de 240,0 µg/mL, possui atividade anti-helmíntica frente ao *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea), um ectoparasita que compromete a criação de peixes em cativeiro (WANG et al., 2009).

Considerando o parâmetro de avaliação - redução da atividade motora dos vermes adultos foi avaliada, sendo classificada como leve ou significativa. Considerou-se redução leve quando a diminuição da movimentação dos vermes pouco diferiu dos movimentos analisados nos grupos controles negativos. E como redução significativa da atividade motora quando os movimentos dos vermes foram

raros, assemelhando-se a espasmos involuntários. Apesar de subjetivo esse critério é empregado por vários autores para analisar os testes *in vitro* (DE MORAES et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010; MORAES et al., 2011, 2012; PARREIRA et al., 2010).

A motilidade é um importante parâmetro a ser avaliado, pois sua inibição *in vitro* pode ser um indicativo da presença de efeito esquistossomicida *in vivo*. Sabe-se que, particularmente nos vermes machos de *S. mansoni*, entre o tegumento e as células tegumentares, encontra-se uma região de musculatura lisa, tipicamente organizada em camadas circulares e longitudinais. Esta musculatura longitudinal sendo importante para a motilidade do parasito, enquanto a musculatura circular teria como função primordial à manutenção do canal ginecóforo e, portanto do pareamento do casal de vermes do *S. mansoni* (NOËL, 2008).

A contração muscular normal também é um fator essencial para que o *S. mansoni* se mantenha afixado, pelas ventosas, à parede das vênulas mesentéricas terminais. Desta forma, quando a paralisia da musculatura é induzida, os casais de vermes adultos se desprendem das vênulas e são transportados passivamente até o fígado, onde permanecerem por tempo suficiente até serem eliminados pela resposta imune do hospedeiro (ANDREWS, 1985; CIOLI et al., 1995; WOOLHOUSE, 1979). A fim de que os parasitos permaneçam o tempo suficiente nos sinusóides hepáticos, a paralisia induzida pela droga deve ser duradoura. Concluindo, as substâncias que atuam por este mecanismo devem agir prolongadamente, já que os parasitos rapidamente se recuperam e retornam ao sítio original antes de sofrerem o ataque das células de defesa (WOOLHOUSE, 1979).

Contudo, outros estudos têm revelado que a atividade motora do *S. mansoni* está associada também com importantes neurotransmissores ou neuromoduladores, pertencentes ao grupo de mediadores do tipo amina tais como: serotonina, dopamina, acetilcolina, epinefrina e aos do tipo aminoácido: glutamato,  $\gamma$ -ácido aminobutírico (GABA) e aos neuropeptídios da família FMRF-amidas (FREZZA, 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

## Resultados e Discussão

---

Cada um desses neurotransmissores/neuromoduladores que atuam de formas diferentes na motilidade aumentando-a (serotonina), diminuindo-a (acetilcolina) ou mantendo-a constante (dopamina, noradrenalina, adrenalina, glutamato, GABA e FMRF-amidas). Assim, a partir da movimentação que o parasito adquire após a adição de uma amostra (extrato ou substância isolada) a ser testada, ocorrem evidências farmacológicas da presença desses neurotransmissores no meio de incubação (NOËL, 2008).

O AL avaliado nas concentrações de 100 e 200 µg/mL foi capaz de reduzir, significativamente, a atividade motora em 100% dos vermes adultos de *S. mansoni*, em 48 e 24 horas de incubação, respectivamente (Tabela 11). Assim, considerando a atividade apresentada por AL, é possível que a redução da atividade e morte dos parasitos esteja associada a alterações nos neurotransmissores ou nos sistemas neuromoduladores dos parasitos adultos causada pelo AL. Em estudos *in vitro* realizados com extratos brutos das espécies de pimentas (*Piper crassinerviun* e *Piper gaudichaudianum* - Piperaceae), na concentração inicial de 100 µg/mL e com *Potomorphe umbellata* (Piperaceae) conhecida como açariçoba, na concentração inicial de 50 µg/mL frente a vermes adultos de *S. mansoni* demonstraram a diminuição da atividade motora com o aumento da concentração de extrato testado (MORAES, 2011; MORAES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010).

Por outro lado, embora o PZQ (1) a 10 µM também tenha diminuído a atividade motora dos parasitos, o mesmo não promoveu a separação dos casais dos vermes adultos na concentração avaliada, causando a morte dos casais antes dos mesmos se separarem.

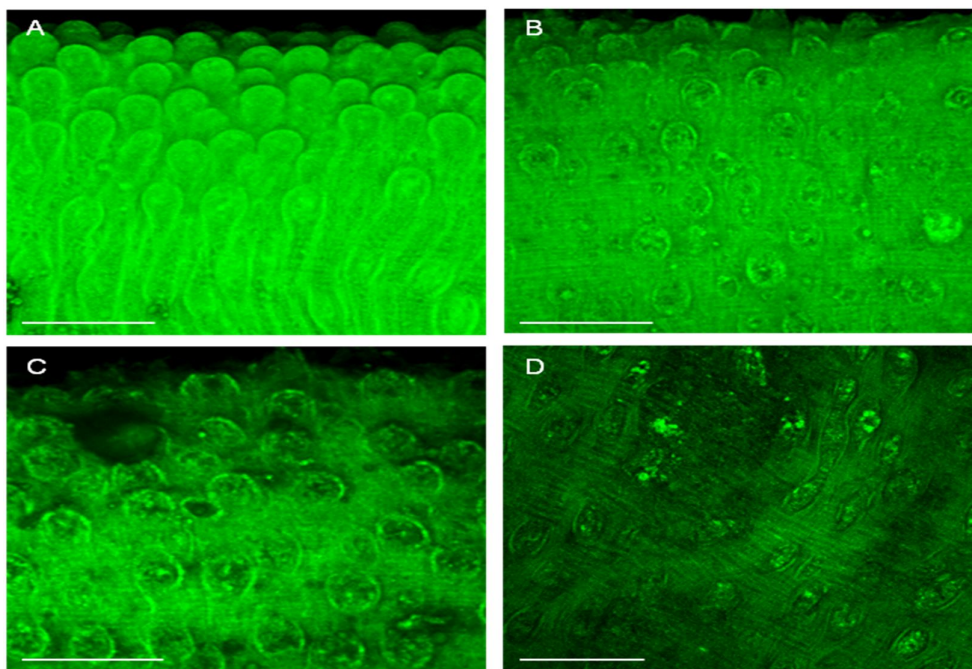
Com relação às alterações no tegumento, o AL avaliado nas concentrações de 200 e 100 µg/mL causou alterações tegumentares significativas nos vermes adultos de *S. mansoni* em 48 horas de incubação (DOENHOFF et al., 2008). Atividade semelhante foi observada para o extrato alcaloídico dos frutos da *Solanum lycocarpum* (Solanaceae), nas concentrações de 20, 32 e 50 µg/mL e pelo extrato metanólico das folhas de *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) na concentração de 130 µg/mL, os quais foram também capazes de provocar extensas

## Resultados e Discussão

alterações tegumentares nos parasitos adultos (DE OLIVEIRA et al., 2012; MIRANDA et al., 2012; NDJONKA et al., 2013).

A superfície do *S. mansoni* é constituída por um complexo sincicial que representa a principal rota de absorção de nutrientes, excreção de metabólitos e proteção ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Assim, o tegumento representa um alvo crucial de ação dos fármacos esquistossomicidas. Este dado é de grande relevância, uma vez que, o dano tegumentar pode comprometer a nutrição, evasão imune, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais nos vermes. Assim a longevidade dos esquistossomos no sistema circulatório é conferida pelo tegumento (FREZZA, 2012).

Para melhor observação das alterações tegumentares causados pelo AL nos parasitos, foi realizada a fixação dos mesmos em solução de AFA e analisados detalhadamente pela técnica de microscopia confocal de varredura a laser (Fig. 36).



**Figura 36.** Efeito do AL no tegumento dos machos de *S. mansoni*. Os pares de vermes acasalados incubados em meio RPMI contendo o extrato em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal de varredura a laser. A: controle negativo (sem adição do extrato). B: controle positivo (Praziquantel 10 µM). C: 50 µg/mL. D: 100 µg/mL. A-D: Imagens tridimensionais. Barras = 50 µm.



## Resultados e Discussão

---

A partir destas imagens, conclui-se que os danos tegumentares dos helmintos são diretamente dependentes da concentração, uma vez que, na maior concentração ilustrada (100 µg/mL, Fig. 36 - imagem D) o dano aos tubérculos foi mais evidente do que na menor concentração (50 µg/mL, Fig. 36 – imagem C).

Devido à importância do tegumento para o parasito, pesquisadores têm dedicado ao estudo proteômico da superfície tegumentar dos vermes. Neste contexto, pesquisadores purificaram e caracterizaram a enzima ATP-difosfohidrolase presente na superfície externa do tegumento do *S. mansoni*. Esta enzima por clivar o ATP ou ADP, liberado mediante os danos causados pelos vermes no hospedeiro, possivelmente está relacionado ao mecanismo de escape do parasito à resposta imunológica (FARIA-PINTO et al, 2004, 2008; VASCONCELOS et al.; 2008). Assim a descoberta de inibidores desta enzima pode constituir um dos possíveis mecanismos de ação de substâncias esquistossomicidas.

Embora neste estudo não tenha sido avaliada a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico bruto obtido dos frutos da *A. lappa* L., dados da literatura revelam que os extratos hidrometanólicos brutos dos frutos da bardana demonstram atividade antiproliferativa potente frente às células de hibridoma B (MH60). Os autores sugerem que esta ação esteja relacionada à presença da arctigenina (**29**) no extrato (MATSUMOTO et al., 2006). Além disso, o extrato diclorometânico de *A. lappa* L., apresentou efeito citotóxico significativo sobre algumas células humanas cancerosas, como as de hepatoma humano (HepG2) e de pulmão (A549) (PREDES et al., 2011; RYU, 1995).

Assim, de acordo com os resultados experimentais obtidos pelo extrato hidroalcoólico bruto dos frutos da *A. lappa* L. no ensaio esquistossomicida, o AL foi particionado em solventes orgânicos de diferentes polaridades e, tendo em vista o isolamento das lignanas dibenzilbutirolactônicas, a fração diclorometânica (AL-D) foi selecionada para o prosseguimento aos estudos fitoquímicos.

#### 4.4. Atividade esquistossomicida *in vitro* das substâncias isoladas dos frutos de *A. lappa* L. frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Em estudos recentes têm-se explorado as atividades antiparasitárias de alguns lignóides, como a ação tripanocida, frente às formas tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, das lignanas tetraidrofurânicas veraguensina e grandisina, isoladas da *Virola surinamensis* (Myristicaceae) e das lignanas dibenzilbutirolactônicas hinoquinina e kusunoquinina, isoladas da *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae). Da mesma forma que algumas lignanas tetraidrofurânicas isoladas da *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) que já demonstravam atividade tripanocida também exibem atividade *in vitro* antimalárica e leishmanicida (DA SILVA et al., 2005; DA SILVA FILHO et al., 2004, 2008; DE SOUZA, 2005; **Patente PI 0503951-7**; SCHMIDT et al., 2012).

Após o isolamento das lignanas a partir da fração diclorometânica do extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L., codificadas como AL- D<sub>III</sub>-5\*, AL- D<sub>II</sub> 6-2 e AL- H B, identificadas respectivamente, como arctiina (**28**) e arctigenina (**29**), estas foram submetidas ao ensaio *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 12.

## Resultados e Discussão

**Tabela 12.** Atividade *in vitro* das lignanas arctiina e arctigenina frente aos 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
Controle <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Praziquantel 10 µM	24	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Arctiina - 25 µM (13,36 µg/mL)	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Arctiina - 50 µM (26,73 µg/mL)	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
Arctiina - 100 µM (53,45 µg/mL)	24	0	0	60	0	0
	48	50	0	60	0	0
	120	50	0	60	0	0
Arctiina - 200 µM (106,91 µg/mL)	24	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
Arctigenina - 100 µM (37,24 µg/mL)	24	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0

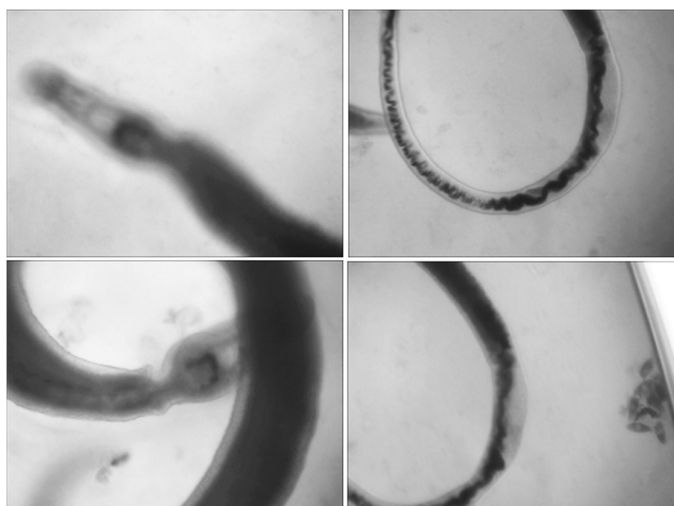
<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 10 casais de vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI. <sup>c</sup> DMSO em meio RPMI.  
Fonte: Autora.

A arctiina (**28**), na concentração de 100 µM (equivalente a 53,45 µg/mL), foi capaz de causar a morte em 50% dos parasitos em 48 horas de incubação, com redução significativa de 60% na atividade motora em 24 de incubação, mas sem demonstrar alteração tegumentar. De forma semelhante, relatos literatura descrevem a ação da neolignana diidrobzofurânica licarina A (**19**), que em mistura racêmica, na concentração de 100 µM, apresentou efeito significativo sobre os parasitos adultos, sendo capaz de provocar a morte dos mesmos, além de reduzir a atividade motora e causar alterações tegumentares nos vermes adultos de *S. mansoni* (PEREIRA et al., 2011).

## Resultados e Discussão

Devido à atividade esquistossomicida *in vitro* apresentada pela arctiina (**28**) na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , a mesma foi avaliada em outras concentrações. A partir dos dados descritos na tabela acima, observa-se que a arctiina (**28**), avaliada nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  (equivalente a 13,36  $\mu\text{g/mL}$ ) e 50  $\mu\text{M}$  (correspondente a 26,73  $\mu\text{g/mL}$ ), não foi capaz de causar morte, redução significativa na atividade motora ou alterações tegumentares nos vermes adultos, mesmo após as 120 horas de incubação.

A arctiina (**28**) inicia seu efeito sobre os parasitos adultos a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Este efeito pode ser ainda observado na figura 37. Como observado nesta figura (em A e B) os vermes adultos machos de *S. mansoni*, após a incubação da arctiina (**28**), na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , os parasitos apresentam tegumento íntegro com ventosa ventral translúcida, sem observação de danos aparentes, apesar de observada redução na motilidade destes vermes na análise de microscopia. De forma semelhante, como observado nas imagens em (C) e (D), as fêmeas do parasito não apresentarem alterações morfológicas significativas quando expostas à ação da arctiina (100  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 37.** Vermes adultos de *S. mansoni* incubado com adição *in vitro* da substância AL- D<sub>III</sub>-5\* (arctiina) a 100  $\mu\text{M}$ . Em (A) e (B), machos tratados com 100  $\mu\text{M}$  de arctiina. A seta marca a porção que contém a ventosa ventral ainda translúcida, mas os vermes apresentaram redução da atividade motora sem aparente lesão do tegumento. Em (C) e (D), as fotos mostram fêmea incubadas com 100  $\mu\text{M}$  de AL- D<sub>III</sub>-5\*. O tegumento se apresenta translúcido, houve redução da atividade motora (D).

## Resultados e Discussão

---

Somente com os dados do ensaio esquistossomicida *in vitro* torna-se inviável a elucidação do possível mecanismo da redução da atividade motora causa pela arctiina (**28**) aos parasitos sem que estudos adicionais sejam realizados.

Conforme observado na tabela 12, a arctiina (100  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de promover a morte de 50% dos parasitos adultos em 48 horas de incubação, afetando de forma significativa a atividade motora, sem, contudo, causar alterações tegumentares significativas.

Quando avaliada na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (equivalente a 106,91  $\mu\text{g/mL}$ ), a arctiina (**28**) causou redução total da atividade motora e extensivas alterações tegumentares, além de provocar a morte de 100% dos vermes adultos de *S. mansoni* em 24 de incubação. Efeitos estes podem ser comparados àqueles provocados pelo AL na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Em estudos similares da atividade esquistossomicida *in vitro*, anteriormente realizados com lignanas e neolignanas, efeito semelhante foi observado para a neolignana diidrobenzofurânica licarina A (**19**), que em mistura racêmica, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  foi capaz de levar a morte 100% dos vermes adultos de *S. mansoni* provocando extensivas lesões tegumentares do mesmo. Outras lignanas, como a cubebina (**14**), presente nas sementes da *Piper cubeba* (Piperaceae), também foram capazes de causar a morte de 100% dos parasitos adultos após 24 de incubação (BARBOSA DE CASTRO et al., 2013; DA SILVA et al., 2005; DA SILVA FILHO et al., 2008; DE SOUZA, 2005; **Patente PI 0503951-7**).

Além de apresentar atividade esquistossomicida, algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas também apresentam atividade *in vivo* e *in vitro* frente a outros parasitos. O metilpluviatolídeo (**15**), por exemplo, demonstrou ser efetivo frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ . Já a hinoquinina (**16**), demonstrou promissora atividade *in vitro* frente às formas amastigotas livres do *T. cruzi*, exibindo valores de  $\text{IC}_{50}$  próximos a 0,7  $\mu\text{M}$  (SCHMIDT et al., 2012).

## Resultados e Discussão

---

Em relação às atividades biológicas, não há relatos na literatura descrevendo a atividade antiparasitária do extrato bruto de *A. lappa* L. ou das lignanas arctigenina (**29**) e arctiina (**28**). Por outro lado, foram publicados vários trabalhos relatando a atividade antiviral e antimicrobiana para o extrato e metabólitos secundários desta espécie (CHAN et al., 2011; EICH et al., 1996; SCHRODER et al., 1990).

Tendo em vista a o efeito esquistossomicida da arctiina (**28**) outros estudos estão sendo realizados com esta substância. Como por exemplo, o experimento que avalia a porcentagem de inibição da atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase frente à arctiina (**28**), no intuito de esclarecer os possíveis mecanismos de ação desta substância (FARIA-PINTO et al, 2004, 2008; VASCONCELOS et al.; 2008).

Já a arctigenina (**29**) não apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* na concentração de 100 µM avaliada neste ensaio. Apesar de não possuir atividade esquistossomicida, esta substância apresenta atividade antiparasitária contra o *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea), um ectoparasita frequente em piscicultura, sendo até mais efetiva do que o mebendazol (WANG et al., 2009).

## 5. CONCLUSÕES

- Neste trabalho, foi obtido o extrato hidroalcoólico bruto dos frutos de *A. lappa* L. (AL), o qual foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, demonstrando ser ativo e capaz de matar 100% dos vermes adultos na concentração de 200 µg/mL em 48 horas de incubação, além de causar significativa redução da atividade motora e lesões tegumentares no parasito.

- Considerando sua atividade esquistossomicida apresentada pelo extrato hidroalcoólico dos frutos de *A. lappa* L., o mesmo foi submetido ao fracionamento cromatográfico, resultando no isolamento e identificação das lignanas dibenzilbutirolactônicas artigenina e arctiina, sendo esta o metabólito majoritário deste extrato.

- Entre as substâncias isoladas, a arctigenina não demonstrou atividade esquistossomicida *in vitro* quando avaliada na concentração de 100 µM.

- Já a arctiina evidenciou atividade esquistossomicida *in vitro* nas concentrações de 100 e 200 µM, sendo nesta capaz de causar extensas alterações tegumentares e 100% de morte dos parasitos em 24 horas de incubação.

- Considerando os resultados obtidos, a atividade esquistossomicida *in vitro* demonstrada pelo extrato hidroalcoólico dos frutos de *A. lappa* L. pode estar relacionada à presença da arctiina.

- Contudo, estudos adicionais se fazem necessários para se conhecer os mecanismos de ação da arctiina frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados obtidos neste estudo, aliados aos já alcançados pelo nosso grupo de pesquisa corroboram com o grande potencial das lignanas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDIN, M. Z.; ISRAR, M.; REHMAN, R. U.; JAIN, S. K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Medica**, v. 69, p. 289–299, 2003.

ALI, S. A. Natural Products as Therapeutic Agents for Schistosomiasis. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2011.

ANDREWS, P. Praziquantel: Mechanisms of Anti-schistosoman Activity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 129-156, 1985

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 462–468, 2005.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. Activity of the artemether in experimental *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 185-188, 1991.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. Avaliação terapêutica do artesunato na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 7-12, 1999.

ARAÚJO, N. **Associação de Fármacos na Terapêutica Esquistossomose mansoni**, 2010. Tese (Doutorado em Ciências – área Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

AWALE, S.; LU, J.; KALAUNI, S. K.; KURASHIMA, Y. T.; KADOTA, S.; ESUMI, H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. **Câncer Research**, v. 66, p. 1751–1757, 2006.



---

*Referências*

---

BARBOSA DE CASTRO, C. C.; DIAS, M. M.; PESSOA DE REZENDE, T.; MAGALHÃES, L. G.; DA SILVA FILHO, A. A. Natural Products with Activity Against *Schistosoma* Species. Chapter 8. In: MA HENDRA KUMAR RAI E KATERYNA VOLODYMYRIVNA KON (Org.). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components**. Londres: 1. ed. Elsevier, 2013. p. 109-134.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASSO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. 1. ed. v.2. Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

BERETTA, M. E.; FERNANDES, A. C.; SCHNEIDER, A. A.; RITTER, M. R., A Família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, rio Grande do SUL, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 189-216, 2008.

BRAGUINE, C. G.; COSTA, E. S.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, p. 793–797, 2010.

BREMER, K. **Asteraceae - Cladistics & Classification**. 1. ed. Portland, Oregon: Timber Press, 1994, 752p.

CASTRO, J. L. **Medicina Vegetal**, 2. ed. Publicações Europa-América, 1981, 134-135p.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA-JR. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, supl: 1, p. 98-106, 2008.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal Drugs: Past, present ... and future? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 35–85, 1995.

---

**Referências**

---

- CHAN, Y-S.; CHENG, L-N.; WU, J-H.; CHAN, E.; KWAN, Y-W.; LEE, S. M-Y.; LEUNG, G. P-H.; YU, P. H-F.; CHAN, S-W. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 245-254, 2011.
- CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. Acid and Alkaline Hydrolysis Studies of Stevioside and Rebaudioside A. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 8, p. 104-108, 2011.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The Global Status of Schistosomiasis and its Control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 41-51, 2000.
- CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221–249, 2002.
- CHO, M. M.; JANG, M. K.; KIM, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF-alpha inhibition. **International Immunopharmacology**, v.4, n.10-11, p.1419-1429, 2004.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. 53-59, 2003.
- CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. 1. ed. Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, v.1, 1984, 269p.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, (Suppl. I), p. 13-19, may, 2004.
- COUTO, F. F. B.; COELHO, M. Z.; ARAÚJO, N.; KUSEL, J. R.; KATZ, N.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; MATTOS, A. C. A. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails.

---

Referências

---

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 153-157, mar. 2011.

CSAPI, B.; HAJDÚ, Z.; ZUPKÓ, I.; BERÉNYI, A.; FORGO, P.; SZABÓ, P.; HOHMANN. Bioactivity-guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea arenaria*. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1664-1669, marc. 2010.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, 2003. 701p.

DA SILVA FILHO, A. A., ALBUQUERQUE, S., SILVA, M. L. A. E., EBERLIN, M. N., TOMAZELA, D. M.; BASTOS, J. K. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 42–45, 2004.

DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1307–1310, 2008.

DA SILVA, R.; DE SOUZA, G. H. B.; DA SILVA, A. A.; DE SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. DE A.; E SILVA, M. L. A.; DONATE, P. M.; DE MATOS ARAÚJO, A. L. S.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1033–1037, 2005.

DAVID, J. P.; DA SILVA, E. F.; MOURA, D. L. Lignanas e Triterpenos do Extrato Citotóxico de *Eriope blanchetti*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, mar. 2001.

DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differentialeffect of single or combines formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. **Parasitology Research**, v. 78, p. 648-645, 1992.

---

### Referências

---

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

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M.; LEITE, J.R.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 548-558, 2011.

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

DE MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NACIMENTO, C.; YAMAGUSHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 301-309, 2013a.

DE MORAES, J. CARVALHO, A. A. L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A. C.; MARQUES, T. H. C., ANDRADE, L. N. FREITAS, R. M.; SOUZA, D. P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603-607, 2013b.

DE MORAES, J.; NUNES, L. C. C.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; LIMA, T. C.; NAKANO, E.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anthelmintic activity of a natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, p. 253-258, 2013c.

DE OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; PIRES, M. G.; DA SILVA, G. L.; MANFREDINI, V.; VARGAS, C. R.; GNOATO, S. C.; DE OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera*

---

*Referências*

---

presentes anti-inflammatory and antioxidante activities. **Molecules**, v. 17, p. 1113-1123, 2012.

DE SOUZA, V. A.; DA SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. D. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; DE SOUZA, G. H. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; E SILVA, M. L. A. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 303–307, 2005.

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

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M. R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y. (-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 86-95, 1996.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 77-83, 1995.

FALLON, G. P. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resistance**, v.1, n. 4, p. 236–241, 1998.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N. L.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, p. 51-57, jan. 2004.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O. C.; GOMES, J. A. S.; ENK, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M. Z.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and

---

*Referências*

---

parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v.135, p. 943-953, mar. 2008.

FERRACANE, R.; GRAZIANI, G.; GALLO, M.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 399-404, 2010.

FERREIRA, J.; PEADEN, P.; KEISER, J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1585–1592, 2011.

FISCHBACH, M. A.; CLARDY, J. One pathway, many products. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 353–355, 2007.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El Discórides renovado**. 11. ed. Barcelona: Labor S.A., 1988.

FREZZA, T. F. **Ação de *Cordia verbenacea* sobre *Schistosoma mansoni***. 2012. Tese (Doutorado em Biologia, área de Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012.

GÖNNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Parasitology Research**, v. 52, p. 129–150, 1977.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. The search for biologically active secondary metabolites. **Pesticide Science**, v. 51, p. 471-482, 1997.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.

---

*Referências*

---

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

KARDOŠOVÁ A.; EBRINGEROVÁ A.; ALFÖLDI J., NOSÁL'OVÁ S.; FRAŇOVÁ S.; HRÍBALOVÁ V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, 135-140, jul. 2003.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**, v. 108, p. 72-78, 2008.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p. 55–62, 2003.

KING, C. H.; Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **ActaTropica**, v.113, p. 95-104, 2009.

KONÉ, W. M.; VARGAS, M.; KEISER, J. Anthelmintic activity of medicinal plants used in Côte d'Ivoire for treating parasitic diseases. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2351-2362, dec. 2011.

KNIPPING, K.; VAN ESCH, E. C. A. M.; WIJERING, S. C.; VAN DER HEIDE, S.; DUBOIS, A. E.; GARSSSEN, J. *In Vitro* and *In Vivo* Anti-allergic Effects of *Arctium lappa* L. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 1469-1477, 2008.

KOUBAA, I.; DAMAK, M.; MCKILLOP, A.; SIMMONDS, M. Constituents of *Cynara cardunculus*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 212-213, 1999.

KRON, M.; YOUSIF, F.; RAMIREZ, B. Capacity building in anthelmintic drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, p. 75–82, 2007.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. IN: SIMÕES, C. M. O. (org.).

---

*Referências*

---

**Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 1999.

LEONARD, S. S.; KEIL, D.; MEHLMAN, T.; PROPER, S.; SHI, X.; HARRIS, G. K. Essiac tea: scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 288-296, 2006.

LESCANO, S. Z.; CANHASSI, R. R.; CHIEFFI, P. P. Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 1, p. 71-75, 2004.

LOPES, N. P; YOSHIDA, M.; KATO, M. J. Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 53-57, jan./mar., 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** 1. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002, 544p.

LO VERDE, P.T.; NILES, E.G.; OSMAN, A.; WU, W. **Gender-specific biology of *Scistosoma mansoni*: male/female interactions.** In: World Class Parasites: Schistosomiasis, Boston: Springer Science, 2005.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G.H. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1207–1220, 1984.

MACHADO, F. B.; YAMAMOTO, R. E.; ZANOLI, K.; NOCCHI, S. R.; NOVELLO, C. R.; SCHUQUEL, I. T. A.; SAKURAGUI, C. M.; LUFTMANN, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Evaluation of the Antiproliferative of the Leaves from *Arctium lappa* by a Bioassay-Guided Fractionation. **MOLECULES**, v. 17, p. 1852-1859, feb. 2012.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. In vitro activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worm. **Parasitology Research**, v. 106, p. 395–401, 2009.



---

*Referências*

---

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

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

MATSUMOTO, T.; HOSONO-NISHIYAMA K.; YAMADA, H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells, **Planta Medica**, v. 72, n. 2, p. 276-278, 2006.

MELO, A.; COELHO, P. **Shistosoma mansoni**, **Parasitologia Humana**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MIRANDA, M.; MAGALHÃES, L.; TIOSSI, R.; KUEHN, C.; OLIVEIRA, L.; RODRIGUES, V.; MCCHESENEY, J.; BASTOS, J. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology Research** [Epub ahead of print], 2012.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: Na evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais, **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

---

*Referências*

---

MORAES, J.; SILVA, M. P.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 77-82, 2009.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 357-364, 2011.

MORAES J. **Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens**, In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. ed. Current Topics in Tropical Medicine. InTech. Rijeka, p. 333-358, 2012.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8. ed. São Paulo, SP: Hemus, 1997.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 9. ed. São Paulo, SP: Hemus, 2003. 555p.

MOTA DA SILVA, L. **Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito Gastroprotetor do Extrato Etanólico de *Arctium lappa* L. em Úlceras Gástricas Crônicas Induzidas por Ácido Acético em Ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, área de Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

MUNARIN, E. E. O.; HEREDIAZÁRATE, N. A.; VIEIRA, M. C.; ROSA, Y. B. C. J.; RODRIGUES, E. T. Espaçamentos entre plantas e cobertura do solo com cama-de-frango na produção da bardana (*Arctium lappa* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 141-148, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

---

*Referências*

---

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

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 823-847.

OLIVEIRA, R. O.; VAZ, A. B. M.; ALVES, R.O.; LIARTE, D.B.; DONNICI, C.L.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. p. 169-173, marc. 2006.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) – (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). **Preventive chemotherapy in humana helminthiasis**. Genebra: WHO, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) – (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). **Schistosomiasis**. In: **Media Center – Fact sheets**. Genebra: WHO, 2011a. Acesso: 10/03/2013 . Disponível em: <http://www.who.int/mediacenter/factsheet/fs115/index.html>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) – (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). **The global atlas on schistosomiasis**. Genebra: WHO, 2011b. Acesso: 10/03/2013. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) – (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). **Model list of essencial medicines**. In: **Essencial**

---

*Referências*

---

**medicines.** Genebra: WHO, 2011c. Acesso: 10/03/2013. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publication/essencialmedicines/en /index.html>.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAIS, D. R.; CAIXETA, S.C.; DE SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; da SILVA FILHO, A. A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993–1001, 2010.

PASA, M. G. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 6, n. 1, p. 179-196, 2011.

PATENTE PI 0503951-7: SILVA, M. L. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, V.; PEREIRA, O. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; DONATE, P. M., et al. Process to obtain syntetic and semi-syntetic lignan derivates, their syntetic and semi-syntetic derivates, their analgesic and anti-inflammatory activities, topical and/or systemic formulations containing said lignans and their respective therapeutic method. WHO 2007/009201 A2; 2007.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemoterapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, p. 233-290, 1968.

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

PEREIRA, A. C.; MAGALHÃES, L. G.; GONÇALVES, U. O.; LUZ, P. P.; MORAES, A. C. G.; RODRIGUES, V.; DA MATTA GUEDES, P. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D.; E SILVA, M. L. A. Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1424-1430, may. 2011.

---

*Referências*

---

PEREIRA, J.V. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de constituintes e de medicação intracanal à base de *Arctium lappa***. 2004. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP, 2005.

PONTIN, K.; DA SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, F. F.; SILVA, M. L. A .E.; CUNHA, W. R.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; DE ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, p. 487–492, 2008.

PREDES, F. S.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A.; DOLDER, H. Antioxidative and *in vitro* antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.1, p. 25, 2011.

RAHMAN, M. M. A.; DEWICK, P. M.; JACKSON, D. E.; LUCAS, J. A. Lignans of *Forsythia intermedia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1971-1980, sept. 1990.

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

RODRIGUEZ, P.; BLANCO, J.; JUSTE, S. Allergic contact dermatitis due to burdock. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 134-5, 1995.

ROKNI, M. B.; ALLEGRETTI, S. M.; DE OLIVEIRA, C. N. F.; DE OLIVERIRA, R. N.; FREZZA, T. F.; REHDER, V. L. G. The use of Brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*. **Schistosomiasis**. InTechOpen, p. 27-10, 21012.

Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/the-use-of-brazilian-medicinal-plants-to-combat-schistosoma-mansoni>.

Acesso: 21-12-1012.

RYU, S.; AHN, J.; KANG, Y.; HAN, B. Antiproliferative effect of arctigenin and arctiin, **Archives of Pharmacology Research**, v. 18, n. 6, p. 462-463, 1995.

---

*Referências*

---

SANTOS, A. C., **Mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da Bardana (*Arctium lappa* L.) sobre o trato gastrointestinal**, 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, área de Ciências Biológicas)- Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**, 1. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005, 20p.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v.14, p. 407-412, 2008.

SCHRODER, H. C.; MERZ, H.; STEFFEN, R. Differential *in vitro* anti-HIV activity of natural lignans. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 45, p. 1215-1221, 1990.

SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. DE N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Protozoan Neglected Diseases – Part II. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176-2228, jan. 2012.

SHAPIRO, T. A.; TALALAY, P. *Scistosoma mansoni*: Mechanism in Regulation of Glycolysis. **Experimental Parasitology**, n. 54, p. 379-390, 1982.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

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

---

*Referências*

---

SOUZA, G. H. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. DE A.; E SILVA, M. L. A.; DA SILVA, R.; DONATE, P. M.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **Farmaco**, v. 2, p. 55–61, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado pra identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. 1 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411– 425, 2006.

TRAZZI, G.; **Síntese de Lignanias a Partir de Adutos de Morita-Baylis-Hillman: Uma visão Geral de Acesso a Lignanias Biologicamente Ativas**, 2008. Tese (Doutorado em Química, área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

UTZINGER, J.; SHUHUA, X.; N'GORAN, E. K.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 1549–1562, 2001.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. Combination Chemotherapy of Schistosomiasis in Laboratory Studies and Clinical Trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1487–1495, 2003.

VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; RESENDE-SOARES, F. A.; PENIDO, M. L. O.; COSTA, S. C. G.; COELHO, P. M. Z. Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetal and Cereal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-8, sept. 2008.

---

*Referências*

---

- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232–238, 1998.
- VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Medica**, v. 64, n. 2, p. 97-109, 1998.
- VUORELLA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELAA, P.; RAUHAD, J. P.; WENNEBERGE, T.; VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-1389, 2004.
- WANG, B. S.; YEN, G. C.; CHANG, L. W. Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 101, p. 729–738, 2007.
- WANG, G-X.; HAN, J.; FENG, T-T.; LI, F-Y.; ZHU, B. Bioassay-guided isolation and identification of active compounds from Fructus Arctii against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 106, p. 247-255, oct. 2009.
- WANG, X.; LI, F.; SUN, Q.; YUAN, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of arctiin from Fructus arctii. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 247–251, 2005.
- WARD, R. S. Lignans, neolignans and related compounds. **Natural Product Reports**, v. 16, p. 75-96, 1999.
- WEBER, A.D. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***, 2005. Dissertação (Mestrado em Química, área de Química Orgânica)-Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.



---

**Referências**

---

WHITING, D. A. Lignans, neolignans, and related compounds. **Natural Product Reports**, v. 2, p. 191-192, 1985.

WOOLHOUSE, N. M. Biochemical and Pharmacological Effects in Relation to the Mode of Action of Antischistosomal Drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 2413-2418, 1979.

WU, J-G.; WU, J-Z.; SUN, L-N.; HAN, T.; DU, J.; YE, Q.; ZHANG, H.; ZHANG, Y-G. Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1033-1041, 2009.

XIAO, S.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. **Acta Tropica**, v. 75, p. 341-348, 2000a.

XIAO, S.; SHEN, B.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; TANNER, M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 1125-1132, 2000b.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Scistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1557-1562, 1989.

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

ZHAO, F.; WANG, L.; LIU, K. *In vitro* anti-inflammatory effects of arctigenin a lignin from *Arctium lappa* L. through inhibition on iNOS pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 457-462, 2009.

---

*Referências*

---

ZHAO, Y.; NOOKANDE, A.; SCHNEIDER, B.; SUN, X.; SCHMITT, B.; STÖCKIGT, J. Lignans from *Torreya jackii* identified by stopped-flow high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 83-91, dec. 1999.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the *Compositae*, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, v. 171, p. 1-14, 1990.